

平成 21 年 4 月 24 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008

課題番号：20870010

研究課題名（和文） 蛋白質内における光エネルギー変換反応の研究

研究課題名（英文） Photoreaction mechanisms in photoreceptor proteins

研究代表者

石北 央 (ISHIKITA HIROSHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00508111

研究成果の概要：、光受容体蛋白質 BLUF (blue light sensing using FAD, FAD: flavin adenine dinucleotide)の光反応機構を理論計算的手法で解析した。BLUF の蛋白質立体構造データに基づき、静電ポテンシャル計算によって BLUF 活性部位である flavin, Tyr-21 及び Trp-104 の酸化還元電位を計算し、BLUF の電子移動反応の駆動力を求めた。その結果、活性時の蛋白質コンフォメーションを反映している立体構造を同定できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1330000	399000	1729000
年度			
総計	1330000	399000	1729000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：5803

キーワード：生物物理、蛋白質、酵素反応、生体生命情報学、コンピューターシミュレーション

1. 研究開始当初の背景

将来の生体分子素子開発には、生体内反応の分子レベルでの解明が必要である。中でも電子移動反応・プロトン移動反応・酵素反応は、工学的な分子素子に求められる機能である。生体中では、植物の光合成反応に代表されるように、巧妙な分子制御により光エネルギーの変換が（工業的レベルでは達成できないほど）非常に高効率に行われている。本研究では、膜蛋白質として生体内のエネルギー変換に重要な役割を持つ蛋白質複合体 complex I、complex II、cytochrome *b_f* complex における電子移動・

プロトン移動反応の解明を念頭に置きつつ、そのための基礎研究として、光受容体 flavin 蛋白質である BLUF (blue light sensing using FAD, FAD: flavin adenine dinucleotide)の光反応機構の解明を行う。BLUF は比較的小さい蛋白質でありながらも、その光反応は未解明な部分が多く、また光合成反応との類似点も多いこと、さらに近年構造が分子レベルで解明されたことから、興味深い研究対象として注目されている。また、実験グループ間での研究結果における不一致な点もいくつか存在するので、理論計算の立場からどの主張が妥当なのか検証し、結論を導き出すことを目指した。

2. 研究の目的

BLUF は、青色光に反応し、光合成に関連する遺伝子発現を調節している。その中心反応部位に flavin と蛋白質由来の酸化還元活性 tyrosine 残基を持ち、他の光受容体蛋白質（例：rhodopsin, phytochrome, xanthopsin）とは独立した蛋白質ファミリーを形成している。BLUF の光活性化反応の本質は、flavin (FMN) と酸化還元活性な Tyr-21 間の電荷分離反応である。

flavin 近傍に存在する Gln-63 のアミノ酸側鎖の $-C=O$ 基と $-NH_2$ 基の位置が光照射によって $C_\delta-C_\gamma$ 軸に対して 180 度回転（反転）すると活性状態となる。これにより、Gln-flavin 間相互作用が変化し、吸収スペクトルが red shift (red-shift signaling state) する (図 1)。

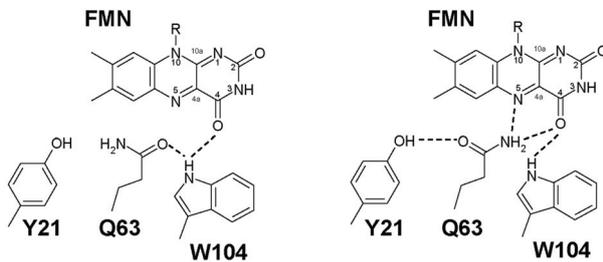


図 1 (左) dark state、 (右) light state
(Anderson et al. *Biochemistry* 44 (2005) 7998)

近年 X 線結晶構造によって Gln と flavin との位置関係が原子レベルで解明された (Anderson et al. *Biochemistry* 44 (2005) 7998, Jung et al. *J. Mol. Biol.* 362 (2006) 717, *PNAS* 102 (2005) 12350)。本研究では、蛋白質構造に基づいて理論計算を行うことにより、各々の反応中間体毎に、flavin-tyrosine 間の電子移動・プロトン移動の駆動力を算出・評価する。それによって、どの反応中間体を經由することが妥当かを総合的に評価し、BLUF の光反応機構の解明をめざす。また、BLUF に関するもう一つの重要な議論は、flavin 周辺の X 線結晶構造解析の結果が、解析を行った研究グループ毎に大きく異なることである。例えば、Anderson らの構造 (Anderson et al. *Biochemistry* 44 (2005) 7998) と Jung らの構造 (Jung et al. *J. Mol. Biol.* 362 (2006) 717, Jung et al. *PNAS* 102 (2005) 12350) では、dark state と light state の conformer の帰属が正反対である。また、Anderson らの構造では flavin に水素結合を形成できる距離 (W_{in}) に Trp104 が存在するのに対し (図 2a)、Jung らの構造では Trp104 は flavin からかなり離れたところ (W_{out}) に存在する (図 2b)。

これらの構造 (conformer) における酸化還元電位、pKa 値、系のエネルギー値を計算し蛋白質構造の妥当性を検証することにより、BLUF の反応機構について明らかにすることを旨とした。

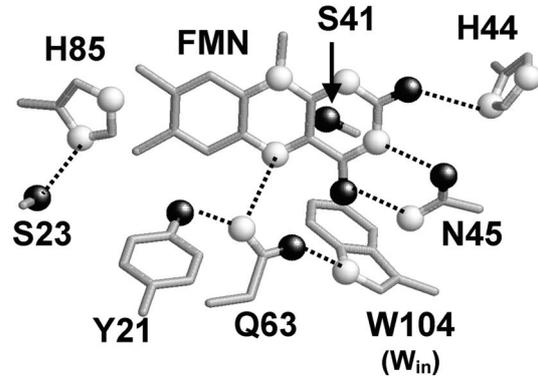


図 2a Anderson らの構造 (W_{in} 構造)

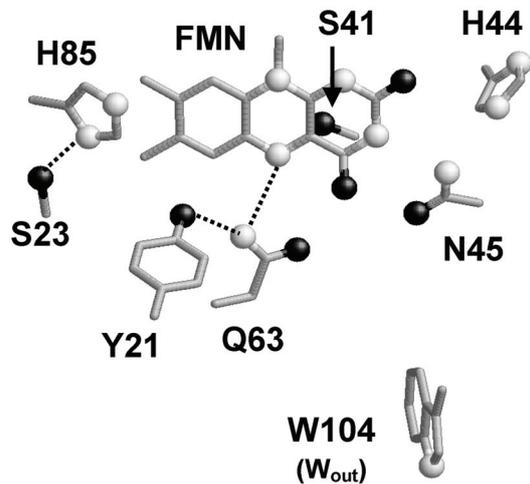


図 2b Jung らの構造 (W_{out} 構造)

3. 研究の方法

計算に用いる蛋白質の立体構造データは Protein Data Bank (www.rcsb.org) で得られるものを利用した。その構造に適用する force field、parameter set として、CHARMM、all-atom CHARMM22 (Brooks et al. *J. Comput. Chem.* 4 (1983) 187) を用いた。parameter set に含まれていない cofactor 等の部分電荷は、量子化学計算プログラムである Jaguar で計算したものをを用いた。蛋白質の titration に関しては、蛋白質立体構造を homogeneous な electrostatic continuum model として取り扱うことができるプログラムである MEAD (Bashford & Karplus, *Biochemistry* 29 (1990) 10219) によって、

linearized Poisson-Boltzmann 方程式を解くことを行った。さらにその output (intrinsic pKa や interaction term) をサンプリングすることによって酸化還元活性部位の redox probability、アミノ酸解離基の protonation probability を求めた。

4. 研究成果

- (1) BLUF 蛋白質に存在する Tyr-21、flavin、Trp-104 の酸化還元電位を静電ポテンシャル計算により算出した。計算に用いた構造は Anderson らの構造と Jung らの構造である。両構造では Gln-63 の側鎖の $-C=O$ 基と $-NH_2$ 基の帰属が正反対である。ここでは仮に、Anderson らの構造で帰属された light state と dark state の $-C=O$ 基と $-NH_2$ 基の配向を light state と dark state の構造と呼ぶことにする。
- (2) flavin 近傍に存在する Gln-63 はその側鎖が光を受けることで (=dark state から light state へ移り変わるとき) 180 度回転すると言われている。本研究による計算の結果、Gln-63 の 180 度回転により Tyr-21 の酸化還元電位は 150 mV 変化することがわかった。それにより、light state では Tyr-21 と flavin 間の電子移動の駆動力は dark state のそれに比べて大きくなる。つまり、電子移動は light state の構造で有利であることがわかり、光によって電子移動が起こるという BLUF に反応に矛盾しない。すなわち、(Jung らの構造ではなく) Anderson らの構造で帰属された Gln-63 の配向が妥当であることを示唆している。
- (3) Trp-21 と flavin 間の電子移動とは別に、BLUF では Trp-104 と flavin 間の電子移動の存在も示唆されている。Anderson らの構造で見られる W_m の位置に Trp-104 を持つ構造においては、 W^+ 状態を計算機上で発生させたところ、dark state 状態のコンフォメーションしか得ることができなかった。(light state 状態のコンフォメーションは Anderson らの構造ではエネルギーに非常に不安定であった。) このことは、実験的に示唆されていた「Trp-104 を介した電子移動は BLUF の light-sensing yield を下げる」ということを示すものである。また、Jung らの構造 (W_{out} の位置に Trp-104 を持つ構造) では、 W^+ 状態を計算機上で発生させても、light state、dark state 両コンフォメーション共に問題なく生じた。以上より、Anderson らの構造で見られるコンフォメーションは、Trp-104 の位置に関しても、蛋白質機能的に意味のある構造であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

(査読有)

1. H. Ishikita, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 30618-30623, "Light-induced hydrogen bonding pattern and driving force of electron transfer in AppA BLUF domain photoreceptor"

(査読無)

1. 石北 央、(分子シミュレーション研究会誌) アンサンブル 11 (2009) 7-12 「光合成反応中心蛋白質における電子移動・プロトン移動と蛋白質の分子制御」

[学会発表] (計 1 件)

1. 石北 央、日本生物物理学会第 46 回年会、「静電ポテンシャル計算による光合成反応中心蛋白質の電子移動現象の解明」、2008. 12. 3-5、福岡

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://userpage.chemie.fu-berlin.de/~hiro/en.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石北 央 (ISHIKITA HIROSHI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：00508111

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし