

TOPICS

シアノバクテリアの走光性を制御する青色光受容体 PixD の
X線結晶構造解析から見てきた光受容機構大阪府立大学理学部
岡島公司

青色光シグナルは多くの生物で利用され、その受容体としてPhototropinやCryptochromeなどのフラビンを結合したタンパク質が知られている。光合成を行うシアノバクテリアは光環境に適応するために数多く光応答現象がみられ、また多種の光受容体候補遺伝子をもっていることがゲノム解析によってわかってきた。しかし、それらのシグナル受容、伝達機構について詳細は不明である。シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の SyPixD (*Synechocystis* positive phototaxis factor, Slr1694) はBLUF (sensor of blue light using FAD) ドメインを含む、152個のアミノ酸残基の小さいタンパク質で、走光性の光受容体として機能している¹⁾。BLUFドメインは近年、ミドリムシの光驚動反応のセンサーであるPACタンパク質や、光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* でアンチリプレッサーとして働く AppA で見つかったフラビンを結合する青色光受容ドメインである。バクテリアのゲノム上に広く分布する BLUF タンパク質の機能についてはほとんど解っていない。大腸菌で発現させた SyPixD と TePixD (好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 PixD,

T110078) はフラビンを結合し、青色光照射によってフラビンの吸収がおよそ 10nm長波長側にシフトし、暗所でもとに戻るフォトサイクルを示す。このような BLUFドメインのフォトサイクルは他のフラビン結合光受容体 (PhototropinやCryptochrome) とは異なるため、その光受容機構は新規のものであると考えられたが、構造や光受容機構は明らかにされていなかった。我々はBLUFドメインタンパク質として初めて TePixDの構造を明らかにし、それに基づいた変異導入タンパク質の解析によりTePixDの光受容機構の解明を行った。また、*Synechocystis*におけるSyPixDの機能についての解析を行った。

好熱性由来のTePixDは95°C、10分の処理でもフラビンを結合しており、SyPixDより熱的に非常に安定であった¹⁾。そこで全長のTePixDのX線結晶構造解析を行い 2.0Åの分解能で構造を明らかにした(京都大学、三木研究室との共同研究)²⁾。TePixDは単量体が環状に並んだ5量体が二つ重なった10量体を形成している(図1-A)。この10量体は溶液でのゲル濾過による分子量の測定においても確認でき、シアノバクテリアの細胞内でも10量体を形成していると考えられる

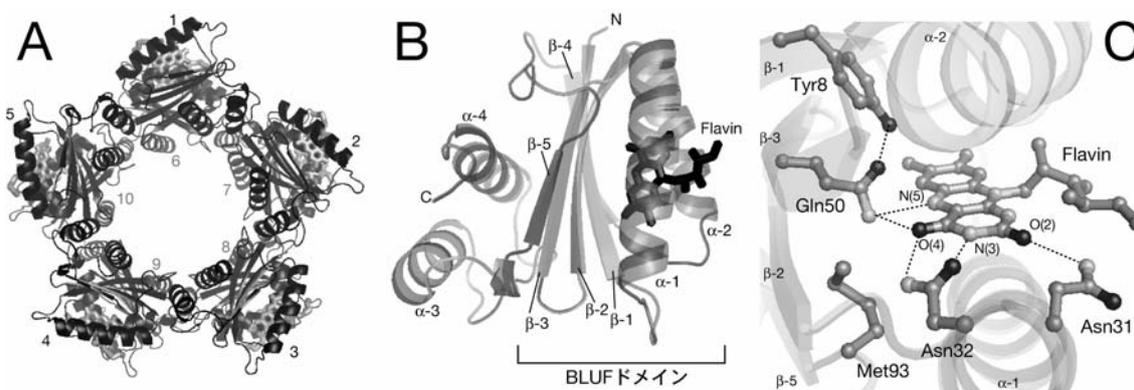


図1 (A) TePixDの結晶構造 (2.0 Å)、10量体の構造。(B) 単量体の構造。(C) フラビン近傍の構造。破線は水素結合を表す。

が、高次構造の働きなどはまだ解っていない。単量体の構造をみると、BLUFドメインは5本のβ-ストランドからなるシートとそれに平行な2本のα-ヘリックスで構成され、このヘリックスの間にフラビンが挟まっている。C末端側の領域は2本のα-ヘリックスを形成し、フラビンポケットとはβ-シートを挟んで反対側に交錯している(図1-B)。フラビンの反応性に影響を与えるN(5), O(4), O(2)原子はそれぞれβ-3上のGln50の側鎖とα-1上のAsn32、Asn31の側鎖と水素結合で相互作用している。Gln50の上と下には保存されたTyr8とMet93があり、特にGln50とTyr8との間には強い水素結合がみられる(図1-C)。TePixDの構造が決定したすぐ後、ほとんど同様な構造がAppAのBLUFドメインの結晶構造解析から明らかにされている³⁾。

この構造を基に、フラビンと調節的な相互作用している可能性があるアミノ酸残基Tyr8、Gln50、Asn32、Asn31の変異導入タンパク質を作製し、その光反応の分光学的解析を行った(名古屋大学、伊藤研究室との共同研究)^{2, 4, 5)}。光照射によって野生型(WT)で

はフラビンの吸収が長波長にシフトする。Gln50をAlaに置換したQ50Aは暗所の吸収はWTと変わらないが、定常光照射でも、過渡吸収スペクトルの測定でも光に対する反応性はほとんどなかった(図2)。Tyr8をPheに置換したY8Fは暗所の吸収はWTとほとんど変わらないが、定常光照射によって長波長シフトではなくフラビンのブリーチを示した。過渡吸収の測定では、WTが光励起後50 ns後には長波長シフト状態を形成しているのに対し⁴⁾、フラビンの三重項励起状態の形成が見られ、WTとは初期過程から反応が全く異なっていた。このようなフラビンの三重項の形成とブリーチはGln50をAsnに置換したQ50Nでもみられた。一方、Asn31とAsn32についてAlaに置換したN31A、N32Aの暗所のスペクトルはピークの位置がシフトしているため、これらの残基とフラビンとの間には強い相互作用があると考えられる。しかし、光照射によりWTと同様の長波長シフトを示したことから、Asn31とAsn32はフォトサイクルにはかかわらないことが示唆された。これらの結果はTyr8-Gln50-O(4)/N(5)

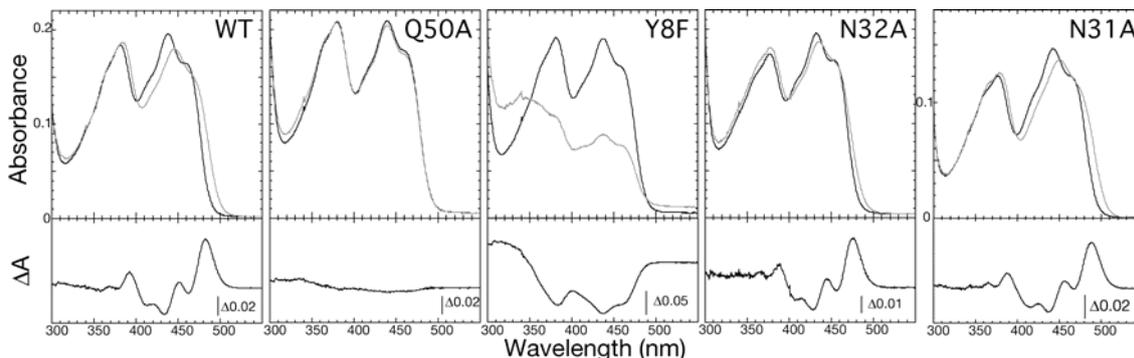


図2 His-TePixDの変異導入タンパク質の定常光照射による吸収スペクトル変化。上段、暗状態(黒線)と定常光照射時(灰色)の吸収スペクトル。下段、明-暗の差スペクトル。

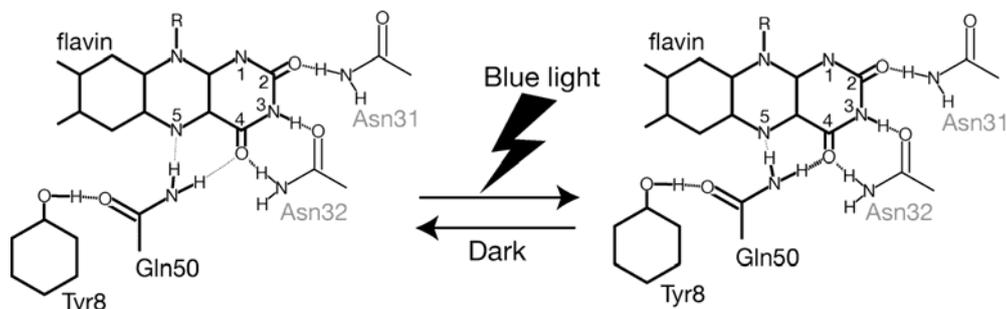


図3 TePixDの光反応のモデル。破線は水素結合を表す。

(flavin)水素結合ネットワークがTePixDの光反応に重要であることを示している。特にTyr8によって固定された Gln50 のフラビンのN(5)に対しての配向がTePixDのフラビンの光反応性を決定していると考えられる。FT-IR (フーリエ変換赤外吸収) スペクトルの解析からBLUFドメインでは光照射時にフラビンのO(4)とアポタンパク質との間の水素結合が強くなっていることが示唆されており⁶⁾、我々も同様のFT-IRスペクトルをTePixDで得ている(筑波大学、野口研究室との共同研究)。これらの結果をあわせると、TePixDでは光照射によってGln50のアミド基とO(4)との間に強い水素結合が形成され、この状態が長波長シフト状態であることを強く示唆している(図3)。

この光によるGln50とO(4)の水素結合の形成がどのようにシグナルとして下流に伝わるのだろうか? PixDには既知のシグナルドメインがない。そのため、タンパク質-タンパク質相互作用によるシグナルの伝達が考えられた。*Synechocystis*のSyPixDと相互作用するタンパク質を酵母ツーハイブリッドスクリーニングによって探索し、シアノバクテリアに特有なPatA型のレスポンスレギュレーターであるSyPixE(Slr1693)が見つかった(かずさDNA研究所、佐藤修正博士との共同研究)¹⁾。大腸菌で発現させたHis-SyPixEとタグのないSyPixDとのプルダウンアッセイを行うと、暗状態でSyPixDがSyPixEと2:1の割合で複合体を形成し、青色光照射によってSyPixDがSyPixEから解離した。光照射によってGln50とフラビンのO(4)との間に強い水素結合ができた結果、SyPixDの構造変化が引き起こされSyPixEとの複合体ができなくなったと考え

られる。このようなタンパク質-タンパク質相互作用の変化によって以下に述べるような走光性の制御をしていると考えられる。

Synechocystis は寒天プレート上で細胞表面にある線毛(pili)と呼ばれる構造体をつかって運動する。赤色光をプレートの横から当てると、光源に向かって進む正の走光性を示す(この光受容体はわかっていない)。この赤色光への走光性に対してプレートの上から方向性のない青色光照射を行うと光から逃げる負の走光性を示す。一方、*SypixD* 遺伝子破壊株は青色の有無にかかわらず赤色光から逃げる負の走光性を示した(図4)。このことはSyPixDが青色による赤色光への走光性に対しての調節にかかわることを示唆している。これらの結果から *Synechocystis* の走光性におけるSyPixDによる調節について以下のようなモデルが考えられる(図5)。*Synechocystis*の赤色光への走光性は正と負の2つの制御系のバランスによって決まっていると考えられる。青色光がないとき、SyPixDはSyPixEと複合体を形成し、この複合体が負の走光性を抑制する(図5①)か、正の走光性を促進する(図5②)ため、正の走光性を示す。もしくは、青色光があるとき、SyPixDはSyPixEを解離し、この解離したSyPixEが負の走光性を促進する(図5③)か、正の走光性を抑制する(図5④)ため負の走光性を示す。*pixD*破壊株ではこの抑制がないため総和として負の走光性を示すと考えられる。*SypixE* 遺伝子破壊株の解析によりこのようなモデルを検証することで、*Synechocystis*の走光性の複雑な調節機構の全貌を明らかにできると考えている。

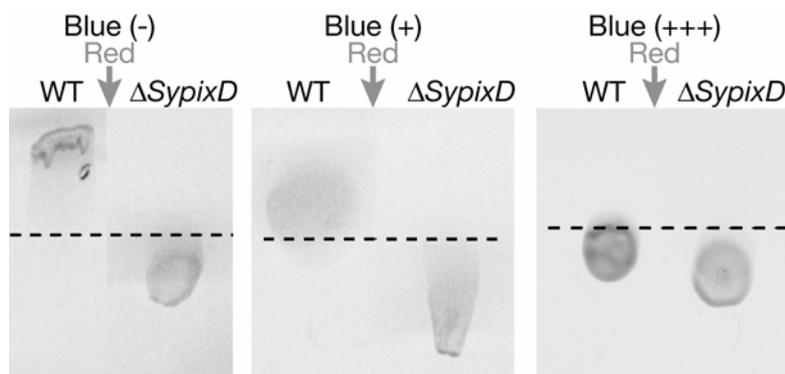


図4 寒天プレート上にスポットした *Synechocystis* の野生株 (WT) と *SypixD* 遺伝子破壊株 ($\Delta SypixD$) の赤色光 (矢印) への走光性に対する青色光の影響。破線は初期のスポットの中心位置。

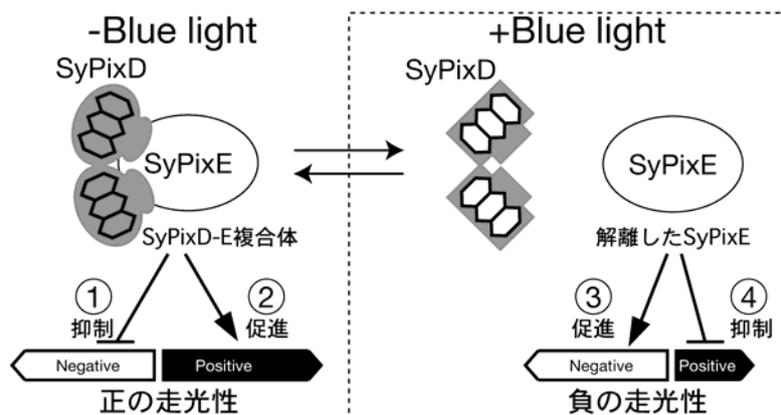


図5 SyPixDの調節する走光性のモデル

本研究で明らかになった BLUF ドメインの構造はフラビン結合ドメインとしては新規である。 α -ヘリックスと β -シートの間隙にイソアロキサジン環が挿入されていることや、それらの N(5)、O(4)、O(2)が Gln、Asn 残基と水素結合をつくる基本構造はフラビン結合光受容体である Phototropin の LOV ドメインの構造とよく似ている。しかし、両者で光反応が全くことなることは非常に興味深い。PixD の光反応には Gln50 と Tyr8 が必須であり、Gln50 とフラビンの間の水素結合が光によって強くなるのがタンパク質の構造変化を引き起こし、シグナルを伝えることが明らかになった。今後、SyPixD と SyPixE の相互作用にかかわる他のアミノ酸残基や部位を決定することで分子内及び、分子間シグナル伝達機構の詳細を解明できると考えている。

謝辞

本研究は東京大学大学院総合文化研究科の池内昌彦教授のもとで、また、文中に記した多くの方々とともに行われました。これらの方々には深く感謝申し上げます。

文献

1. Okajima, K., Yoshihara, S., Fukushima, Y., Geng, X., Katayama, M., Higashi, S., Watanabe, M., Sato, S., Tabata, S., Shibata, Y., Itoh, S. and Ikeuchi, M. (2005) Biochemical and functional characterization of BLUF-type flavin-binding proteins of two species of cyanobacteria. *J.*

Biochem. (Tokyo) **137**: 741-50.

2. Kita, A., Okajima, K., Morimoto, Y., Ikeuchi, M. and Miki, K. (2005) Structure of a cyanobacterial BLUF protein, Tll0078, containing a novel FAD-binding blue light sensor domain. *J. Mol. Biol.* **349**: 1-9.

3. Anderson, S., Dragnea, V., Masuda, S., Ybe, J., Moffat, K. and Bauer, C. (2005) Structure of a novel photoreceptor, the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **44**: 7998-8005.

4. Fukushima, Y., Okajima, K., Shibata, Y., Ikeuchi, M. and Itoh, S. (2005) Primary intermediate in the photocycle of a blue-light sensory BLUF FAD-protein, Tll0078, of *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Biochemistry* **44**: 5149-5158.

5. Okajima, K., Fukushima, Y., Suzuki, H., Kita, A., Ochiai, Y., Katayama, M., Shibata, Y., Miki, K., Noguchi, T., Itoh, S. and Ikeuchi, M. (2006) Fate determination of the flavin photoreceptions in the cyanobacterial blue light receptor TePixD (Tll0078). *J. Mol. Biol.*, in press.

6. Masuda, S., Hasegawa, K., Ishii, A. and Ono, T. (2004) Light-induced structural changes in a putative blue-light receptor with a novel FAD binding fold sensor of blue-light using FAD (BLUF); Slr1694 of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* **43**: 5304-13.