

## 論文の内容の要旨

課程博士

氏名 岡島 公司 (おかじま こうじ)  
学位 博士 (学術)

学位記番号

学位授与年月日

論文題目

Analysis of cyanobacterial BLUF type photoreceptor PixD

(シアノバクテリアにおける BLUF 型光受容体 PixD の解析)

### 背景

生物にとって光の感知は重要であり、多様な光応答現象が報告されている。光応答にかかわる光受容体は光を吸収する発色団とアポタンパク質から構成される。光照射によって発色団の状態が変わり、アポタンパク質との相互作用が変化し、シグナルが下流に伝達される。これまでに多様な発色団を結合した光受容体が見ついている。Rhodopsin はレチナール、Xanthopsin はクマル酸、Phytochrome は開環テトラピロールを結合している。これらの発色団は光照射により二重結合で構造異性化 (E/Z 異性化) をおこし、アポタンパク質との相互作用が変化する。

一方、フラビンを発色団として結合した光受容体では、フラビンのイソアロキサジン環が構造的に E/Z 異性化は起きないため、特殊な光反応でアポタンパク質との相互作用の変化がおこる。Cryptochrome の FAD は光照射によって近傍のアミノ酸残基から電子が移動する (光によるフラビンの還元) と考えられる。Phototropin の FMN は光照射によってシステイン残基との間に共有結合 (Cys-アダクト) を形成する。

近年、BLUF タンパク質が新規のフラビン結合光受容体としてみついている。BLUF タンパク質は青色光照射によってフラビン由来の吸収スペクトルが約 10 nm 長波長側にシフトする変化を示す。この変化は、Cryptochrome の光によるフラビンの還元や Phototropin の Cys-アダクトとは異なる新規の光受容機構であると考えられるが詳細は解っていない。ミドリムシ *Euglena gracilis* の PAC は光驚動反応に関わり、光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の AppA は青色光による光合成遺伝子の発現制御をしている。BLUF タンパク質をコードする遺伝子は一部の真核単細胞生物や多くのバクテリア

に存在し、数種のシアノバクテリアにも見つかっている。( TePixD、TII0078 : *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 ; SyPixD、Slr1694 : *Synechocystis* sp. PCC 6803 )

光合成を行うシアノバクテリアでは多くの光応答現象が報告されている。そのゲノム上には多くの異なる種類の光受容体の候補遺伝子が見つかり、これらによる複雑な調節を介して光応答が起きていると考えられる。光環境の感知に特化したシアノバクテリアの光応答機構の解明は、生物の光環境応答の解明には重要である。それらの複雑な調節機構の解明には光受容体それぞれの性質を解析する必要がある。本研究ではシアノバクテリアの BLUF タンパク質 PixD の光受容機構とその機能の解明を目指した。

## 結果と考察

### 第一章 PixD の生化学的性質の比較

TePixD と SyPixD の全長をそれぞれ大腸菌で His タグ融合タンパク質として発現、精製した。ゲル濾過カラムの解析により TePixD および SyPixD はそれぞれ約 100 kDa で 5~6 量体、40 kDa で、2 量体を形成していた。タンパク質に結合しているフラビンと遊離のフラビンの蛍光強度の違いを利用してタンパク質の熱安定性を検討した。好熱菌由来である TePixD は 90°C, 10 min の処理でも安定であるのに対し、SyPixD は 60°C, 5 min の処理で変性した。TePixD と SyPixD は青色光照射によって吸収スペクトルが約 10 nm 長波長側にシフトし、その後暗所で数秒の半減期で元の状態に戻った。これらの光反応は BLUF ドメインに特徴的な変化とほぼ同じであった。TePixD と SyPixD に結合しているフラビンのジチオナイトによる還元を測定したところ、メチルピオローゲンが共存したときのみ速やかに還元された。これはフラビンのイソアロキサジン環がタンパク質の疎水的環境に存在することを示す。以上の結果は、PixD が他の BLUF タンパク質と同様に青色光受容体として機能していることを示唆している。また、好熱性シアノバクテリア由来の TePixD は熱的に非常に安定であり、構造解析や生化学的解析に適していることを示している。

### 第二章 結晶構造に基づく部位特異的変異導入タンパク質の解析

< TePixD の結晶構造 > 熱的に安定な TePixD を大腸菌でタグなしで発現、精製し、X 線結晶構造解析により 2.0Å の分解能で構造を共同研究により明らかにした。TePixD は環状の 5 量体が面と面で重なった 10 量体を形成していた。BLUF ドメインは 5 本のシートとそれに平行な 2 本のヘリックスで構成されていた。C 末端側のドメインは 2 本の平行なヘリックスからなり、シートに直交している。フラビンのイソアロキサジン環は BLUF ドメインの 2 本のヘリックスの間に挟まり、保存されたアミノ酸残基で保持されていた。特に、イソアロキサジン環の反応性を左右する N5, O4, O2 はそれぞれ Gln50 と Asn32、Asn31 と水素結合で相互作用し、Gln50 は Tyr8 とも相互作用していた。この構造はフラビン結合ドメインとして新規であるが、ヘリックスとシートの間隙に挿入されたイソアロキサジン環が O4 や O2 で Asn 残基と水素結合をつくる基本構造は Phototropin とよく似ており、一種の収斂進化と考えられる。

< 変異導入解析及び分光学的解析 > 野生型 (WT) の過渡吸収と FT-IR (フーリエ変換赤外分光) スペクトルの解析から、TePixD では約 10 nm 長波長シフト状態が光励起後 50 ns 後には形成されていた。また、光照射時にフラビンのイソアロキサジン環の O4 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た。構造をもとに、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 (Y8A, Y8F, Q50A, Q50N, N32A, N32Q, N31A, N31Q) を作製し、その光反応の分光学的解析を行った。暗状態での吸収スペクトルは WT と比べ Y8A, Q50A ではあまり変わらず、N31A や N32A では変化が見られた。暗状態ではフラビンとの相互作用は Gln50 では弱く、Asn31 や Asn32 では強いと考えられる。Asn31 と Asn32 の変異導入タンパク質は WT と同様に光照射による吸収スペクトルの長波長シフトを示した。FT-IR の測定でも WT と同様の C4=O の伸縮振動バンドの変化が見られた。Asn31 と Asn32 は光による長波長シフトにはかかわらないと考えられる。Q50A では光に対する反応性が低下したことから、Gln50 が光による長波長シフトに重要なアミノ酸残基であると考えられる。Y8A, Y8F, Q50N は定常光照射により長波長シフトではなくフラビンのブリーチを示した。また、過渡吸収スペクトルでは、光照射後 50 ns で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た。以上の結果は、光照射によって Gln50 の側鎖と O4 との水素結合が強くなること (水素結合の改変) を示唆している (図 1)。BLUF ドメインの光反応性は、Tyr8 と強い相互作用をしている Gln50 とフラビンのイソアロキサジン環の反応性に深くかかわる O4、N5 との水素結合 (Tyr8-Gln50-O4/N5(flavin) ネットワーク) によって決定していると考えられる。

### 第三章 *Synechocystis* sp. PCC 6803 における機能解析

< 酵母ツーハイブリッドによる相互作用タンパク質の探索 > PixD は BLUF ドメインと C 末端側に 40~50 アミノ酸から成る 2 つの  $\alpha$ -ヘリックスが付加している。この領域も含めて既知のアウトプットドメインはなく、タンパク質-タンパク質相互作用によって光シグナルを他へ伝えていると予想した。*Synechocystis* のゲノムの酵母ツーハイブリッドを行い SyPixD と相互作用する相手を探索した結果、Slr1693 (SyPixE) との相互作用が認められた。また、青色光照射下で同様の酵母ツーハイブリッドを行うとこの相互作用は弱くなった。SyPixE はシアノバクテリアで見ついている PatA 型のレスポンスレギュレータであり、類似の PatA 型タンパク質として走光性や線毛形成の調節に関わる PixG や PilG が知られている。

< プルダウンアッセーによる光依存的相互作用 > タグのない SyPixD と His タグを融合した His-SyPixE を別々の大腸菌で発現させ、両者を混ぜた破碎液の上清からニッケルアフィニティーカラムを用いて His-SyPixE を単離した。暗所でクロマトグラフィーを行った場合 His-SyPixE とともに SyPixD がおよそ 1:2 の割合で結合したものが単離されたが、青色光照射下で行った場合 His-SyPixE しか単離されなかった。また、光照射した後、暗所に戻した上清から暗所で同様の作業を行うと SyPixD と His-SyPixE の両方が単離された。これらの結果は、暗所では基底状態の SyPixD は、SyPixE と複合

体を形成し、青色光照射下では励起状態の SyPixD が SyPixE から解離することを示しており、SyPixD が青色光依存的に SyPixE との相互作用を調節していると考えられる。

< 遺伝子破壊株の解析 > *Synechocystis* の野生株は寒天プレート上で赤色光に対して光源に向かって進む正の走光性を示す。この赤色光への走光性に対して方向性のない青色光照射を行うと正の走光性が抑制をされた。一方、*pixD* 遺伝子破壊株は青色の有無に関わらず赤色光から逃げる負の走光性を示した。これらの結果は下記のモデルを考えると一応の説明ができる(図1)。 *Synechocystis* 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。赤色光下では、青色光受容体 SyPixD は基底状態で SyPixE と結合し、負の走光性を抑制しているため、野生株は正の走光性を示す。*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。青色光下では SyPixD は SyPixE と結合できず、負の走光性を抑制できなくなり、正の走光性が弱くなる、または負の走光性が現れる。もし、このモデルが正しいとすれば、SyPixD は青色の有無で負の走光性を調節する光受容体と考えられる。

#### まとめ

本研究ではシアノバクテリアの BLUF 型光受容体 PixD の光受容機構とシグナル伝達機構、*Synechocystis* の遺伝子破壊株の解析を行った。BLUF ドメインの光受容には Tyr8-Gln50-O4/N5(flavin) ネットワークが重要であり、水素結合の改変というフラビンにおける新規の光受容機構であることを明らかにした。SyPixD が *Synechocystis* において走光性を調節する光受容体であることを明らかにし、新しい走光性の調節経路 (SyPixD-SyPixE) をみいだした。

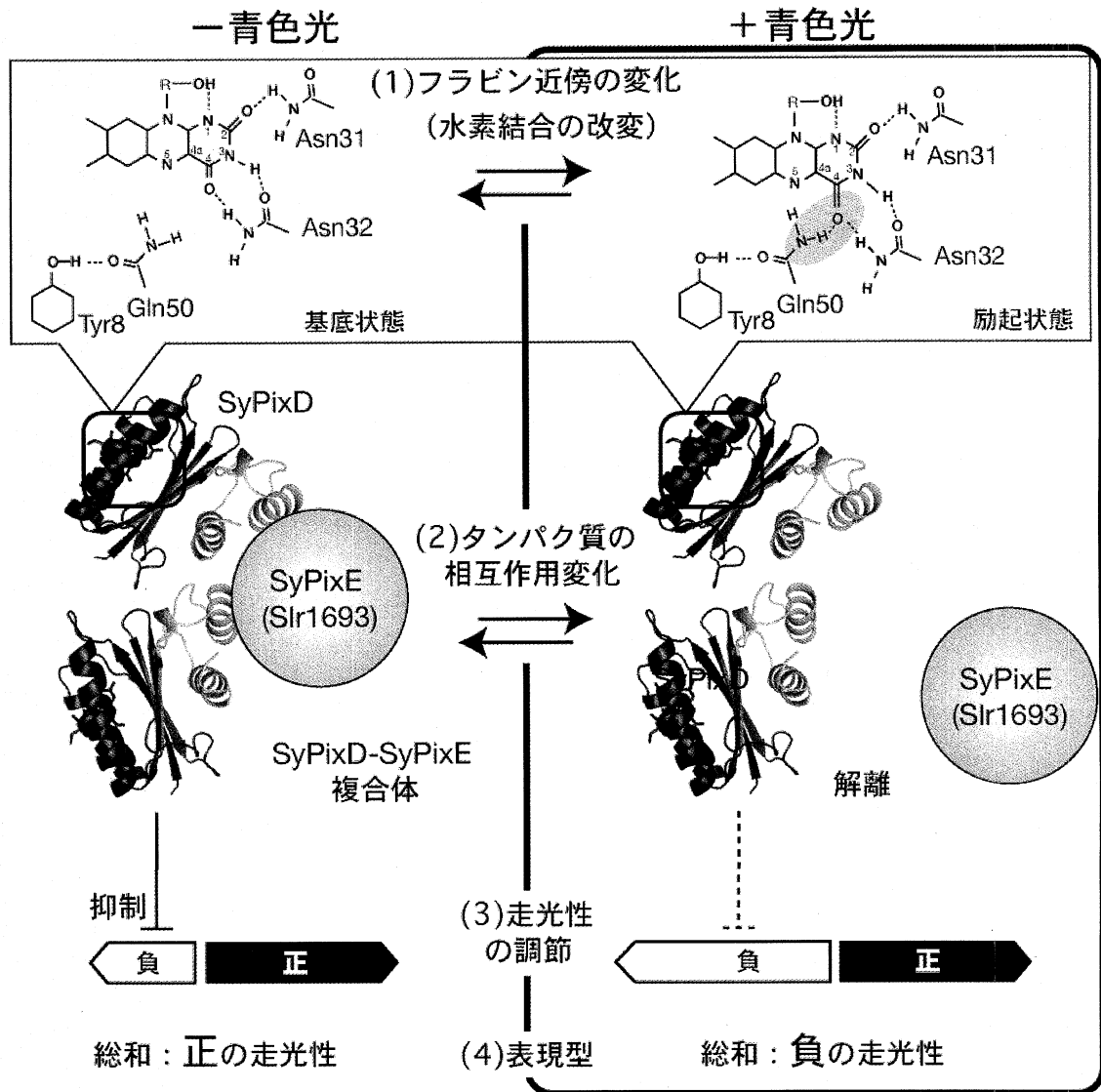


図1 *Synechocystis* sp. PCC 6803 における SyPixD が調節する走光性のモデル

(1)フラビン近傍の変化: SyPixD は青色光によって水素結合の改変が起こり、Gln50 とフラビンの O4 との間の水素結合が強くなる (励起状態)。(2)タンパク質の構造変化: SyPixD は青色光がない基底状態では SyPixE と 2:1 で複合体を形成している。SyPixD は青色光により励起状態になると SyPixE から解離する。(3)走光性の調節: 走光性は正と負の2つの制御系で調節される。SyPixD-SyPixE 複合体は負の走光性を抑制する。青色光によってこの抑制はなくなる。(4)表現型: 赤色下では SyPixD は基底状態であり、負の走光性を抑制するため、総和として正の走光性を示す。青色光がある場合、負の走光性の抑制がなくなるため、正の走光性が弱くなるか、または負の走光性を示す。