

論文の内容の要旨

Studies on cyanobacteriochrome TePixJ from a thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1

(好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 の
シアノバクテリオクロム TePixJ の研究)

石塚 量見

多くの生物にとって光は重要な環境要因であり、このため、生物は多種多様な光受容体を発達させている。特に光合成生物は光の変化によって重大な影響を受けるので、さまざまな感知・応答システムをもっている。しかし、これらのセンサーとして機能する分子や、シグナル伝達について詳しくは分かっていない。このようなセンサータンパク質の1つの大きなグループに植物が持つフィトクロムタンパク質がある。フィトクロムタンパク質は開環テトラピロールのフィトクロモビリン (P・B) を発色団に持ち、赤色光吸収型 (Pr 型) と遠赤色光吸収型 (Pfr 型) の光可逆変換を示す。この光可逆変換は P・B の C、D 環の間の二重結合が異性化することで起こると言われている。またフィトクロムは葉緑体の光定位、種子の光発芽、花芽の分化といった植物の光形態形成を調節していることも分かってきている。近年、フィトクロムと高い相同性を示す光受容体が原核生物にも見つかっており、フィトクロムと同じ吸収を示すこれらの光受容体タンパク質はバクテリオフィトクロムと総称されている。しかしバクテリオフィトクロムの多くはその機能が未知である。近年シアノバクテリアで新奇光受容体が見出されており、これらはシアノバクテリオクロムと総称される。シアノバクテリオクロムは発色団結合ドメイン (GAF ドメイン) を保持しているが、この GAF ドメインはフィトクロムの GAF ドメイン との相同性が低く、またシアノバクテリオクロムの GAF ドメインだけで1つのサブクラスターを形成している。その中のシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の SypixJ1 (sl10041) はシアノバクテリオクロムの1つで、本研究室の先行研究によって正の走光性に関係する光受容体であることが示されている。*Synechocystis* から精製された SyPixJ1 は青色光吸収型 (Pb 型) と緑色光吸収型 (Pg 型) の間で光可逆変換した。このように多くのシアノバクテリアがもつシアノバクテリオクロムはフィトクロムの吸収波長と異なることが分かってきている。本研究では、シアノバクテリオクロムがフィトクロムと異なる光の波長を吸収するメカニズムを明らかにするために、生化学的安定性が期待される好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 のホモログ TePixJ (T110569) タンパク質を材料にし、その解析を行った。

TePixJ タンパク質の解析

まず N 末端にポリヒスチジンタグを付加した TePixJ の GAF ドメインのみ (His-TePixJ_GAF) を発現するコンストラクトを作製し、シアノバクテリアに形質転換した。シアノバクテリアからの精製標品である His-TePixJ_GAF は青色光を吸収する Pb 型 ($\lambda_{\max} = 433 \text{ nm}$) と緑色光を吸収する Pg 型 ($\lambda_{\max} = 531 \text{ nm}$) の間で光可逆変換を示した。またフィトクロムと同様に開環テトラピロールが発色団として His-TePixJ_GAF に共有結合していることが分かった。質量分析を行い、発色団の分子量が 586 であること、発色団がシアノバクテリオクロムとフィトクロムで保存されたシステイン残基 (Cys522) と結合していることが分かった。次に酸性尿素を用いた変性実験を行

い発色団の同定を行った。開環テトラピロールは各種溶媒に固有の吸収スペクトルを示す。従って、酸性尿素で TePixJ を変性して測定した吸収スペクトルを過去の文献と比較して、開環テトラピロール種を同定できる。その結果 TePixJ の発色団は フィコビオロピリン (PVB: 分子量 586) であることが分かった。また His-TePixJ_GAF の FTIR 解析を行った。FTIR 解析からチオール基の伸縮運動を示す波数 2567cm^{-1} が Pb 型で消失し、Pg 型で出現することが分かった。PVB は 3 つの環 (B、C、D 環) で構成される共役二重結合系を持ち、緑色光を吸収するのに適したテトラピロールである。したがって、PVB がより短波長の青色光を吸収するには自身の共役二重結合系を短くする必要がある。またアミノ酸のアライメント配列から青色光と緑色光で光変換するシアノバクテリオクロムにだけ保存されるシステイン残基 (Cys494) が見出された。以上の結果は Pb 型において Cys494 が PVB 内で最も求電子性の高い炭素原子 C_{10} 位とチオエーテル結合を形成し、その結果 PVB は青色光を吸収するのに適した 2 つの環 (C、D 環) で構成された共役二重結合系に変わること、また Pg 型でこの結合が解離していることを示唆していた。

TePixJ タンパク質の再構成

PVB は一部の糸状性シアノバクテリアの集光装置に使われている発色団で、好熱性糸状性シアノバクテリア *Mastigocladus laminosus* では PecE と PecF がヘテロダイマーを形成し、シアノバクテリアの主要発色団であるフィコシアノピリン (PCB: 分子量 586) を異性化して PVB に変換することが報告されている。しかし、*T. elongatus* には PecE、PecF に相当する遺伝子が存在しない。また PCB を産生する大腸菌で TePixJ_GAF アポタンパク質を発現させると、精製標品は PVB が結合した TePixJ_GAF ホロタンパク質になることを確認した。以上より、私は TePixJ_GAF タンパク質自身が PCB を PVB に変換していると考え、これを検証するため PCB と TePixJ_GAF タンパク質の再構成実験を行った。

化学合成した PCB と大腸菌から精製した TePixJ_GAF アポタンパク質を試験管で混ぜると PCB が結合した TePixJ_GAF ホロタンパク質が得られた。この PCB 結合ホロタンパク質は青色光吸収型 ($\lambda_{\text{max}} = 430\text{ nm}$) と緑色光吸収型 ($\lambda_{\text{max}} = 545\text{ nm}$) で光変換するが、スペクトルが本来の TePixJ の光変換のスペクトルとは異なった。この PCB 結合ホロタンパク質を好熱性シアノバクテリアの至適温度の 50°C で保温すると TePixJ 内の PCB が PVB に効率よく変換した。また、それに伴いホロタンパク質の吸収スペクトルはシアノバクテリア精製標品の吸収スペクトルと一致した。つまり TePixJ は中間体である PCB 結合ホロタンパク質から最終産物の PVB 結合ホロタンパク質を自ら生成していることが結論できる。

TePixJ の結晶構造解析・点変異導入実験

まずセレノメチオニンを導入した His-TePixJ_GAF アポタンパク質を大腸菌で発現・精製し、その結晶構造を決めた。次に結晶化に成功した Pg 型の結晶構造をアポタンパク質の構造を用いた分子置換法で決めた。得られた Pg 型の構造は 2.0 \AA の解像度だった。結晶構造中の PVB は 2 つの水素結合ネットワークで固定されていた。1 つ目のネットワークは PVB の少し下に位置する水分子 (W12) を中心とするものだった。W12 は PVB の B、C 環の窒素原子と相互作用しており、また W12 と相互作用している 3 つのアミノ酸残基 Asp492 は D 環の窒素原子と、Glu497 は A 環の窒素原子と、Gln526 は B、C 環の窒素原子と相互作用していた。2 つ目のネットワークは PVB の上に位置する分子が形成するもので、Arg507、Gln509、His523、Asn535 は PVB のプロピオン酸と相互作用していた。

PVB はアミノ酸残基と疎水性相互作用もしていた。Ile461、Val473、Ile490、Leu530 は PVB の D 環のエチル基と、Leu527 は D 環のメチル基と相互作用していた。また Val537 は C 環のプロピオン酸の炭素原子と相互作用していた。Trp499 と His523 は PVB を上下から挟み込み安定させていた。D 環の付近に疎水性相互作用が多い結果はバクテリオフィトクロムの場合と同じであり、光変換時に回転する必要がある D 環を緩やかに固定していることが考えられる。

私は Asp492、Cys494、Glu497、His523 の 4 アミノ酸残基に着目し、各々アラニン残基に置換したホロタンパク質を PCB 産生大腸菌で発現、精製し解析した。Cys494Ala 変異体は赤色光を吸収し ($\lambda_{\text{max}} = 638\text{ nm}$) 光変換を示さなくなった。またその発色団は全て PCB だった。Asp492Ala 変異体は青色光と緑色光で光変換するが、その発色団はほとんど PCB だった。Glu497Ala 変異体は

正常な TePixJ_GAF ホロタンパク質とほとんど性質が変わらなかった。His523Ala 変異体は青色光と橙/赤色光で光変換するようになり、発色団としての PVB の割合は正常な TePixJ_GAF ホロタンパク質に比べてわずかに低かった。これらの結果は Cys494 は TePixJ が光変換することと PCB を PVB に異性化すること両方に必須なアミノ酸残基であることを示しており、Cys494 の C₁₀ への脱着が光変換を起こすのに重要であることを支持している。また PCB から PVB への異性化は PCB が TePixJ_GAF タンパク質の中に正確に収まっていないと進行しないと考えられる。

以上のように TePixJ の GAF ドメインは PCB を Cys522 に結合する活性、PCB を PVB に異性化する活性、発色団の C、D 環の間を光異性化する活性、光変換時に Cys494 の脱着を起こす活性、と4つの活性を合わせもった新奇の GAF ドメインと結論できる。またシアノバクテリオクロムは様々な波長の光を吸収するため、植物のフィトクロムと似た機構を保持しながら独自の進化を遂げた新奇光受容体群であることが推測される。