2P265

水素結合ネットワーク改変による光受容蛋白質の蛍光スペクトル解析

○濱田 格雄¹、中村 亮介¹、市田 秀樹³、曾田 幸司²、松本 健吾²、兼松 泰男^{1,3}、徳永 史生^{1,2} (¹CREST(JST)、²阪大院理、³阪大VBL)

Photoactive Yellow Protein (PYP) は、発色団に *p*-クマル酸を持つ水溶性の光受容蛋白質である。この発色団のフェノール性水酸基は、蛋白質側鎖である Glu46、Tyr42、Thr50 と水素結合ネットワークを形成することにより安定化し、446nm の蛋白質の吸収スペクトルを示すこと知られている。また光によって励起された発色団がこの水素結合様式を変化させ異性化し、蛋白質の立体構造変化を誘引し、また元の水素結合を形成するという光反応サイクルを示す。さらに変異体を用いた水素結合ネットワーク改変が行われ結晶構造解析により発色団周りの構造は詳細に調べられている。

今回、この水素結合ネットワーク形成が蛋白質にどのような影響を与えているのかを検討するために発色団アナログ導入により水素結合ネットワークの改変を行い、蛍光スペクトル測定、時分割測定を行うことにより解析を進めた。その結果、水素結合を完全に破壊したアナログ PYP では、定常光蛍光スペクトルに励起波長依存性が観測された。定常光蛍光スペクトルでは、基底状態の安定構造を反映したスペクトルが得られることが考えられることから、これは発色団が蛋白質内部でさまざまな構造を取っているためであると推測される。さらに構造が報告されている別種のアナログ発色団導入 PYP を用いて蛍光スペクトル測定を行った。その結果、野生型アナログ PYP では報告されている結晶構造から予想される結果とは異なる結果を得た。しかし、違うアナログ PYP では、定常光蛍光スペクトルに励起波長依存性が観測され、推定される水素結合様式を反映して二状態的な変化挙動を示した。今回の結果と既知の結晶構造解析の結果から PYP における蛍光スペクトルから推測される水素結合ネットワークと蛋白質内における発色団の立体構造の関係を議論したい。

N.Hamada, R.Nakamura, H.Ichida, K.Soda, K.Matsumoto, Y.Kanematsu and F.Tokunaga : Analysis of fluorescence spectrum for photoreceptor protein by alteration of hydrogen bonding network

2P267

PpsR の会合状態と DNA 結合能に関する PAS ドメインの役割

○福角 勇人、山崎 洋一、上久保 裕生、今元 泰、片岡 幹雄 (奈良先端大・物質)

PpsR は、光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* に由来する DNA 結合タンパク質であり、光合成遺伝子群の転写を抑制する機能をもつ。PpsR は全長 464 アミノ酸残基からなり、ドメイン構造は、N 末端領域 (1-121 残基)、Q リンカー (122-158 残基)、中心部分に 2 つの PAS ドメイン (159-392 残基)、C 末端 (393-464 残基) に DNA 結合モチーフである HTH をもつ。PAS ドメインは、細菌からヒトにいたるまで、様々な機能をもつタンパク質中に見出されており、会合体形成や、環境変化のセンシングに関与していると考えられている。しかし、その分子認識やセンサーとしての作用機構の詳細は分かっていない。PpsR による転写抑制能は、酸化還元状態によって異なり、酸化型で高い抑制能をもつ。また、DNA に結合するときは 4 量体を形成し、DNA から解離するときは 2 量体として、標的タンパク質 AppA と複合体を形成することが報告されている (1)。これらから PpsR は PAS ドメインの機能を理解する上で良いモデル系と考えられる。

本研究では N 末端側からドメインごとに欠損させた変異体 4 種を作製し、発現・精製を行った。これら各欠損変異体に対して、会合状態と DNA 結合能を評価するためにゲルろ過分離とゲルシフトアッセイを行った。その結果、N 末端欠損変異体は DNA 結合能を保持した。本年度では、他のドメイン欠損変異体についての測定を踏まえ、PpsR の会合状態と DNA 結合能 への PAS ドメインの役割について検討する。

(1)Cell, Vol.110, 613-623, 2002, S.Masuda & C. E. Bauer

H.Fuksumi, Y.Yamazaki, H.Kamikubo, Y.Imamoto and M.Kataoka : The role of PAS domain for oligomeric state and DNA binding activity of PpsR

2P266

分子動力学計算による Phot-LOV2 ドメインの基底状態と光反応中間体の動的構造

○鍋野 海香¹、神谷 成敏²、肥後 順一³、徳富 哲⁴、櫻井 実¹ (¹東工大・バイオ基盤センター、²生物分子工学研・生命情報、³東薬大・生命科学、⁴大阪府大・先端研)

植物の青色光受容体である LOV ドメインは、発色団の FMN(flavin mononucleotide) が光を吸収すると、FMN と Cys 残基との共有結合が形成され、光シグナル伝達を誘起する。しかし、X 線結晶解析によると、その共有結合形成後も LOV ドメインに大きな構造変化は生じず、シグナル伝達がどのように誘起されているのかという疑問がある。そこで本研究では、LOV ドメインのダイナミクスの変化がシグナル伝達に関与しているのではないかと予想し、光照射前後の LOV 2 ドメインの結晶構造を用いて分子動力学計算 (MD) を行い、共有結合の形成がタンパク質のダイナミクスに与える影響を調べた。MD は、結晶構造の周囲に水分子を球状に発生させた系を用い、NVT 一定の条件で行った。トラジェクトリーは 100 fs 毎にサンプリングし、解析を行った。基底状態の MD からは、Cys 残基のチオール基が、FMN の C4a 位に近づく場合と遠ざかる場合があり、反応に最適な Cys 残基のコンホメーションがタンパク質の揺らぎによって可能になることが見出された。また、平衡到達後にサンプリングした構造について C α 原子間の相関運動の解析や主成分解析を行い、タンパク質の大域的な揺らぎを解析した。その結果、中間体に特徴的な運動モードを見出した。それは、結晶構造では捉えられていなかった、発色団とタンパク質との相互作用の変化によるもので、中でも、FMN の末端のリン酸基と、近接する α ヘリックス上の Arg 残基との相互作用の変化が顕著で、タンパク質全体の揺らぎに対する影響が大きいと考えられる。LOV ドメインはタンパク質間相互作用を担うことが知られているが、共有結合の形成という局所的な変化によってタンパク質全体のダイナミクスが変化し、他のタンパク質との相互作用の切り替えを行っているのではないかと考える。

M.Nabeno, N.Kamiya, J.Higo, S.Tokutomi, M.Sakurai : MD Simulation Study of the Ground and Intermediate States of Phot-LOV2

2P268

紅色硫黄細菌 *Halorhodospira halophila* 由来 NifA のオリゴマー形成に関する研究

○對比地 久義、山崎 洋一、上久保 裕生、片岡 幹雄 (奈良先端大・物質)

ニトロゲナーゼ遺伝子の発現を制御する NifA は N 末端部に GAF ドメイン、中心に AAA⁺ ドメイン、C 末端部に HTH を持つエンハンサー結合蛋白質 (EBP) である。中心に存在する AAA⁺ ドメインは、原核生物から真核生物まで広く保存される ATPase ドメインであり、これまで多くの蛋白質で 6~7 量体からなるホモオリゴマーが環状構造を形成して機能することが示唆されている。しかし、EBP では N 末端ドメインを欠損させた AAA⁺ ドメインの環状構造が X 線結晶構造解析により明らかにされているものの、N 末端部を保持した状態での環状構造への変化を捉えた例はない。これは、NifA においても同様で、現在までに溶液中での構造は 4 量体で存在することが示唆されているのみである。そこで、本研究では、紅色硫黄細菌 *Halorhodospira halophila* より単離した NifA を用いて、溶液状態でのオリゴマー形成に着目して研究を行った。全長の NifA は非常に難溶性であり、精製が困難であった。これに対し、C 末端部の HTH を欠損させた NifA₁₋₄₆₁ は比較的安定であった。NifA₁₋₄₆₁ を用いて X 線溶液散乱実験及び HPLC での分析を行ったところ 2~3 量体で存在していた。また、ADP、ATP、ATP アナログである ATP γ S 存在下でも同様の結果となった。さらに、N 末端部の GAF ドメインを欠損させた NifA₁₉₁₋₄₆₁ を用いて HPLC での分析を行ったところ、NifA₁₉₁₋₄₆₁ は単量体で存在し、ヌクレオチド存在下においてもオリゴマーの形成は起こらなかった。これらのことから、これまでに報告されてきた AAA⁺ ドメインとはコンタクトサーフェイスが異なること、NifA は他の EBP と活性状態の構造が異なることなどが考えられた。年会では欠損の影響も考慮して議論する予定である。

H.Tsuihiji, Y.Yamazaki, H.Kamikubo and M.Kataoka : A study of oligomeric state of *Halorhodospira halophila* NifA