B689

FTIR 分光測定で検出された構造変化に基づくフォトロピンLOVドメインの機能分担

○岩田 達也^{1,2}、野崎 大¹、松岡 大介²、神取 秀樹¹、徳富 哲² (¹ 名工大・応用化学、² 大阪府大・先端研)

フォトリポピン (phot) は植物の光屈性、葉緑体光定位運動、気孔開口に関与する青色光受容体である。N 末端側に発色団であるフラビンモノヌクレオチド (FMN) 結合ドメインを二つ (LOV1、LOV2)、C 末端側に Ser/Thr キナーゼドメインをもつ。LOV ドメインの青色光受容によってキナーゼ活性が制御されると考えられている。高等植物には光感受性の異なる 2 種類の phot (phot1、phot2) が存在する。青色光受容の初発反応は、LOV ドメイン中のシステイン残基側鎖と FMN との付加物形成である。最近シロイヌナズナへの変異導入実験から、生理反応の発現には LOV2 の付加物形成反応のみが必要で、LOV1 は不要なことが示された¹。それでは phot は何故二つの LOV ドメインを持っているのか。これまでに、phot1、phot2 の LOV1 と LOV2 の光反応に関して以下の差異が明らかになっている。1) 付加反応の量子収率は大部分が約 0.3 であるのに対して、phot1LOV1 のみが約 0.03 と小さい。2) 付加物が開裂して元に戻る反応は一般に phot1 の方が phot2 よりも遅いが、LOV1 と LOV2 で異なる。これらの結果を考慮すると、LOV1 が LOV2 を介したシグナル伝達の感度調節に関与している可能性が考えられる。この点を明らかにするためには、上記 4 種類の LOV ドメインの光反応に伴うタンパク部分の構造変化を系統的に調べる必要がある。我々はこれまでに phot ファミリーの一つであるハウライシダ・フィトクロム 3 の LOV2 について低温 FTIR 分光法による測定を行い、結晶解析で検出されていない、タンパク質部分の構造変化を検出した²。同分光法により各 LOV ドメインの測定を行い、得られた結果の比較解析から LOV1 と LOV2 の機能の違いを考察する。

1. Christie et al. (2002) Plant J., 32: 205-21

2. Iwata et al. (2003) Biochemistry, in press

T.Iwata, D.Nozaiki, D.Matsuoka, H.Kandori and S.Tokutomi : Implication on different physiological roles of LOV domains in phototropins based on structural changes detected by FTIR spectroscopy

B691

バクテリオクロロフィルエピマー対の吸収スペクトルによる判別

○高橋 邦幸¹、秋山 満知子¹、木瀬 秀夫¹、原 正之²、井上和仁³、小林 正美¹ (¹ 筑波大・物質工学系、² 大阪府立大・先端研究所、³ 神奈川大・理学部)

高等植物の系 1 反応中心では、Chl *a* とそのエピマーである Chl *a'* からなるヘテロダイマーが光→電子エネルギー変換を行っている。本研究ではある種のシアノバクテリアに Chl *d'* が、ヘリオバクテリアに BChl *g'* が、緑色イオウ細菌に BChl *a'* が存在することを明らかにしてきた。しかし、これらのエピマー対は、吸収スペクトルでは判別できなかった。ところが、ある種のバクテリオクロリン型エピマー対が、HIM(*n*-hexane : 2-propanol : methanol = 100 : 2 : 0.3) 中で、Q_x バンドの形状が著しく異なることに偶然気づいた。

本研究では、この原因を明らかにすることを目的として、種々の光合成生物からクロロフィルを単離・精製し、様々な溶媒中で吸収スペクトルを測定・比較した。その結果、酸素発生型の光合成を行う植物に存在するクロリン型クロロフィル (Chl *a*, Chl *b* および Chl *d*) では、エピマー対間に吸収スペクトルの差はほとんど見られなかったが、バクテリオクロリン型クロロフィル (BChl *a*, BChl *b* および BChl *g*) では、HIM およびベンゼン中で、エピマー対の Q_x バンドの形状が異なることを初めて明らかにした。興味深いことに BChl *a* の中心金属 Mg が外れた BPhe *a* のエピマー対では吸収スペクトルに差が見られなかった。このことは、BChl のエピマー対で Q_x バンドのスペクトル形状を変化させるには、中心金属 Mg の存在が不可欠であることを強く示唆する。BChl における Mg の配位数は 5 配位または 6 配位であることから、BChl エピマー対間での Q_x バンドの形状の差は、Mg の配位数が異なることによると推定される。

K.Takahashi, M.Akiyama, H.Kise, M.Hara, K.inoue, M.Kobayashi : Absorption spectral distinction between bacteriochlorophyll epimers.

B690

新規青色光受容体 AppA の分光学的特性：フラビンタンパク質の新規光反応機構

○増田 真二、小野 高明 (理研 PDC・光生物 1)

紅色細菌より見つかった新規青色光受容体 AppA は、光合成遺伝子特異的な抗転写抑制因子として機能する¹。このタンパク質の青色光受容ドメインは、ミドリムシ及びシアノバクテリアの光走性に係わるタンパク質にも存在し、その他ゲノム塩基配列が決定された数多くの生物種に幅広く保存されていることがわかってきた。AppA の青色色素の状態を調べたところ一分子に一つのフラビン (FAD) が非共有結合していた。このフラビン結合ドメインだけからなる組み換え AppA タンパク質は、全長タンパク質と同様に青色光照射によりその吸収が 10nm 程長波長シフトする特徴的な光反応サイクルを示した。ゲルろ過カラムを用いた実験により、光照射によるこのドメインの構造変化が確認された。これらの結果は AppA のフラビン結合ドメイン自身が、青色光受容機能有することを示している。また NMR の測定により、このドメイン中に保存されている 21 番目のチロシンの側鎖とフラビンの π 結合同士の相互作用が確認された。このチロシンをロイシンまたはフェニルアラニンに変えた変異タンパク質は、光反応サイクルを示さなかったことから、このチロシンの側鎖の水酸基がこの反応に重要であることが示唆された。また光反応サイクル速度は重水置換により著しく低下した。以上のことから、AppA の光反応サイクルに伴いフラビンと付近のアミノ酸側鎖との水素結合ネットワークの再構成が起こり、その反応には 21 番目のチロシンとフラビンの π 結合同士の相互作用が重要であることが示唆された。

¹Masuda and Bauer 2002 Cell, 110: 613-623

S. Masuda and T. Ono : Spectroscopic properties of the novel blue-light photoreceptor AppA

B692

クロロフィルから見た光合成の化学進化の解明

○伊藤 由加¹、秋山 満知子¹、後藤 高紀¹、山岸 さやか²、関智行³、二宮 啓子⁴、宋戸 昌彦⁴、山下 俊⁵、永島 賢治²、井上和仁³、木瀬 秀夫¹、小林 正美¹ (¹ 筑波大・物質工学系、² 都立大・理、³ 神奈川大・理、⁴ 岡山大学・工、⁵ 東理大・理工)

酸素発生型光合成生物ではクロロフィル *a* (Chl *a*) が、酸素を発生しない光合成細菌ではバクテリオクロロフィル *a* (BChl *a*) が、光を捕集するアンテナや光電荷分離を起こす構成分子としてそれぞれ機能している。Chl *a* と BChl *a* の生合成経路は、クロロフィライド *a* (Chlide *a*) まで共通であると考えられており、それに長鎖アルコールがエステル結合することで Chl *a* となる。BChl *a* では、Chlide *a* からさらに数段階の酵素反応を経た後、長鎖アルコールが結合する。すなわち、原始的な光合成細菌の持つ BChl *a* の方が、高等植物で機能する Chl *a* よりも多くの酵素を必要とする。これは生物の進化と逆行するように見える。

本研究では BChl *a* の生合成経路を明らかにすることを目的として、生合成に関与するとみなされている遺伝子を欠損または挿入し、それにより蓄積されると予想されるクロロフィル誘導体の同定を行った。その結果、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 に BChl *a* 合成遺伝子の一つ *bchF* を導入した菌体では、予想通り 3-OH-Et-Chl *a* が蓄積した。ところが紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* で *bchX* を欠損させると、予想に反して Mg が外れた Phde *a* と 3-OH-Et-Phde *a* が蓄積した。このことは、*bchX* 遺伝子を欠損させると、環 II の還元が進行しないのみならず、Mg の挿入がうまくいかない (ないしは外れてしまう) ことを意味する。

Y.Itoh, M.Akiyama, T.Gotoh, S.Yamagishi, T.Seki, K.Ninomiya, M.Sisido, T.Yamashita, K.Nagashima, K.Inoue, H.Kise, M.Kobayashi : Chemical evolution of photosynthesis from the viewpoint of chlorophylls