1P265

SAC-CI 法によるレチナールタンパク質オプシン依存性の理論的研究

○藤本 和宏¹、長谷川 淳也¹、林 重彦²、中辻 博^{1,2} (¹ 京大 院・工、² 京大・福井センター)

視物質ロドプシンに代表されるレチナールタンパク質は、色素レチナール周辺のタンパク質(オプシン)の環境によって吸収波長が大きく変化する。この機構を解明するために多くの理論的研究がなされてきたが、これまで実験の吸収ピークを再現するに至っていない。これは色素であるレチナールの分子サイズが大きいため、定量的電子相関理論を用いた励起状態の計算を行うためには本来の構造とは異なる粗悪な計算モデルを使わざるを得なかったことによると考えられる。本研究では SAC-CI 法を種々のレチナールタンパク質(Rh, bR, bR.K, bR.KL, sR2)に応用し、励起エネルギーのオプシン依存性を考察した。SAC-CI 計算では実際のレチナール分子をそのまま用い、タンパク質の静電効果は AMBER 力場による点電荷で近似した。その結果、全ての系について SAC-CI 法による励起エネルギーの理論値は実験値を非常に良く再現した。気相中と比べ、タンパク質中における励起エネルギーは大きくブルーシフトした。解析の結果、ブルーシフトの起源はレチナール近傍のアミノ酸(Rh の場合; グルタミン酸, bR の場合; アスパラギン酸や水)による負の静電場によるものであった。それぞれのレチナールの LUMO は負の静電場の大きな箇所に局在することより、タンパク質中では LUMO が特異的に不安定化し、その結果励起エネルギーがブルーシフトすることが分かった。また、気相中における励起エネルギーの比較より、レチナールの構造による励起エネルギーの差異も明らかになった。bR と sR2 のレチナールはほぼ同様の構造のため、気相中での励起エネルギーはほぼ等しいが、周辺の極性アミノ酸残基とレチナールとの距離の違いがタンパク質中での励起エネルギー差の原因になっていた。

K.Fujimoto, J.Hasegawa, S.Hayashi and H.Nakatsuji : SAC-CI Theoretical Study of the Opsin Dependence of Retinal Protein

1P267

Resonance Raman Investigation of (6-4)Photolyase : FAD Cofactor Is in a Strong Hydrogen-bonding Environment

○Li Jiang^{1,2}、内田 毅^{1,2}、藤堂 剛³、北川 禎三^{1,2} (¹ 総研大・先端科学、² 岡崎統合バイオ、³ 京大・放射線生物)

Ultraviolet (UV) light irradiation can modify DNA and may cause mutagenic processes afterwards. Cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and (6-4)photoproducts are the two major damages in DNA, which can be repaired by CPD photolyase and (6-4)photolyase under blue light illumination, respectively. Compared with the well studied CPD photolyase, the repairing mechanism of (6-4)photolyase is less clear because of its complexity of repairment. Besides, (6-4)photolyase has high homology with blue-light photoreceptor, animal cryptochrome, although they have different functions. So investigating the reaction mechanism of (6-4)photolyase is critical for detailed understanding of both light-driven DNA repairing in photolyase and signal transduction in animal cryptochrome.

As a result of optimization of the expression and purification systems of (6-4)photolyase for the resonance Raman measurement, we have successfully obtained the first resonance Raman spectra of (6-4)photolyase with high quality. Band II of oxidized flavin and a marker band of semiquinone flavin were observed at 1575 cm⁻¹ and 1606 cm⁻¹, which are shifted to low-frequencies by 7 cm⁻¹ and 5 cm⁻¹ compared with free FAD and other flavoprotein, respectively. Since these shifts are sensitive to the formation of hydrogen bond, our results indicate that FAD of (6-4)photolyase is in a strong hydrogen-bonding environment, which coincides with the result from CPD photolyase.

J. Li, T. Uchida, T. Todo, T. Kitagawa : Resonance Raman Investigation of (6-4)Photolyase : FAD Cofactor Is in a Strong Hydrogen-bonding Environment

1P266

低温赤外分光法による *Neurospora Rhodopsin* の光反応機構解析

○住井 昌代¹、古谷 祐詞^{1,2,3}、Arandi G. Bezerra Jr.⁴、Stephen Waschuk⁴、Leonid S. Brown⁴、神取 秀樹^{1,3} (¹ 名工大 院工、² 京大院 理、³ CREST/JST、⁴ グエルフ大・カナダ)

Neurospora Rhodopsin (NR) は真核生物で最初に確認された古細菌型ロドプシン様タンパク質である。真菌類アカパンカビ (*Neurospora crassa*) の NOP-1 遺伝子にコードされており、酵母菌 *Pichia Pastoris* で発現させると all-trans レチナールを結合し 534 nm に吸収極大を示す。NR のアカパンカビ中での機能は現在のところ不明だが、bacteriorhodopsin (BR) のプロトン輸送活性に重要なアミノ酸はほぼ完全に保存されていることから、BR と同様に光駆動プロトンポンプとしてはたらくしているのではないかと予想された。しかしフォトサイクルは数百 ms と光センサーである *pharaonis* phoborhodopsin (ppR) 程度に遅く、プロトン輸送活性も認められないことが報告されている¹。

これら NR と BR の違いがどのような構造要因によるのか明らかにするため、光異性化直後の K 中間体との赤外差スペクトルを両者で比較した。77 K での光反応により得られた K と NR の差スペクトルから、BR とは異なりレチナールポリエン鎖の中間部にまで構造変化が広がること、 α ヘリックス構造にほとんど変化が見られないことがわかった。さらに X-D 伸縮振動領域において BR や ppR で見られる強く水素結合した水分子の O-D 伸縮振動の変化が現れないことがわかった。これはシッフ塩基領域の水素結合ネットワークが古細菌型ロドプシンと異なっていることを示唆する²。以上の結果及び現在進行中の後期中間体に対する測定をもとに NR の構造と機能について議論したい。

¹ Brown et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 32495.

² Furutani et al. (2004) *Biochemistry* 43, 9636.

M. Sumii, Y. Furutani, A. G. Bezerra Jr., S. Waschuk, L. S. Brown and H. Kandori : Photoreaction mechanism of *Neurospora* rhodopsin studied by low-temperature FTIR spectroscopy

1P268

低温ではなぜ光反応しないフォトリロビン分子が存在するのか？

○佐藤 義彰¹、岩田 達也¹、野崎 大¹、徳富 哲²、神取 秀樹¹ (¹ 名工大 院工、² 大阪府大 先端研)

植物の青色光センサーであるフォトリロビンの LOV ドメインには、発色団としてフラビンモノヌクレオチド (FMN) が結合している。FMN が光を吸収すると、LOV ドメイン中に高度に保存されたシステイン残基と C(4a) 位で共有結合を形成し、光情報伝達のための構造変化を開始する。ホウライシダのフィトクロム的一种である phytochrome3 (phy3) は C 末端側にほとんど全長のフォトリロビンの配列をもっており、その LOV2 ドメインは結晶構造が明らかにされている¹。

これまでの我々の研究によると、phy3LOV2 は低温では、どれだけ光を照射しても反応しない成分が存在することがわかっている (150 K で 2 割、77 K で 7 割程度)²。結晶構造ではシステインの S 原子と FMN の C(4a) との距離は 4.3 Å であるが¹、反応しない成分の存在は、低温において平衡にない複数のコンフォメーションを示唆する。そこで今回、温度依存的に反応量が変化する特性を用いてシステインの微細構造を低温赤外分光により測定した。その結果、水素結合構造の異なる 2 つの状態を捉えることに成功し、より低温で反応する成分ほど光反応の効率がよいことがわかった。これらの状態は、システインの回転異性体由来するものと考えられ、低温ではおそらく S 原子と FMN の C(4a) との距離に依存して光反応性が決まるのであろう。一方、フォトリロビンが機能する生理的温度では、タンパク質のゆらぎによってほとんどすべての分子が共有結合を形成できるものと考えられる。

1. Crosson and Moffat (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2995.

2. Iwata et al. (2003) *Biochemistry* 42, 8183.

Y. Sato, T. Iwata, D. Nozaki, S. Tokutomi and H. Kandori : Why don't some phototropin molecules photoreact at low temperatures?