1P269

フォトリポピンのフラビン発色団に対する同位体標識の試み

野崎 大¹、岩田 達也¹、佐藤 義彰¹、佐藤 恭介²、二科 安三²、志賀 潔²、徳富 哲³、○神取 秀樹¹ (¹ 名工大院工、² 熊本大院医薬、³ 大阪府大先端研)

植物の青色光センサーとして光屈性などに関わるフォトリポピンは、N末端側にフラビンモノヌクレオチド(FMN)を結合するLOVドメインを2個もつ。LOVドメイン中でFMNが光を吸収すると、近傍のシステイン側鎖との間に共有結合を形成し、この反応によって光情報伝達が始まる。動物の視覚や細菌の走光性、植物の赤色光センサー機能が、すべて発色団の光異性化反応によって開始される事実と比較すると、特異な光反応である。我々はフォトリポピンの光情報変換過程におけるLOVドメインの構造変化を明らかにするため、低温赤外分光法を用いた構造解析を報告してきた(1)。しかしながら、より詳細な情報を得るためには、研究の進んでいるロドプシン類がそうであるように、発色団の着脱を実現しフラビンの同位体やアナログの導入が必要である。FMNは酸性にするとLOVドメインとの結合力が低下するので、疎水カラムを用いたFMNの再構成が報告されている(2)が、その収率は2割程度であり、試料中のすべての赤外吸収が含まれてしまう赤外分光法のためには十分とは言えない。そこで今回、我々は、大腸菌で発現した *Adiantum* の phy3-LOV2 ドメインに対して、より高い収率の再構成を試みた。その結果、7割以上の収率で再構成を実現することに成功し、その水和フィルムは再構成しないものと同様の赤外差スペクトルを示した。現在、システインと結合する C_{4a} あるいはその隣の N₅ をそれぞれ ¹³C、¹⁵N で標識した FMN の再構成と赤外分光測定を行っている。このような振動バンドの帰属をもとにして、共有結合形成の反応機構について議論したい。

(1) Iwata et al. (2002) J. Am. Chem. Soc. 124, 11840; Iwata et al. (2003) Biochemistry 42, 8183; Nozaki et al. (2004) Biochemistry 43, 8373. (2) Solomon et al. (2001) PNAS 98, 12357.

D.Nozaki, T.Iwata, Y.Sato, K.Sato, Y.Nishina, K.Shiga, S.Tokutomi and H.Kandori : Reconstitution of the isotope-labeled FMN chromophore into phototropin.

1P271

ホウライシダフィトクロム3における2つのLOVドメインの光反応の相違

○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)

フォトリポピン (phot) は植物の青色光受容体として、光屈性、気孔開口、葉緑体光定位運動に関与している。phot には光受容ドメインが2つ (LOV1、LOV2) 存在するが、シロイヌナズナの遺伝子組み換え実験から、LOV2の光反応のみが植物体の生理反応の発現に必要であり、LOV1が光反応しなくても機能が発現することが報告された¹。構造の類似した2つのLOVドメインの何がこのような機能の違いをもたらすのであろうか?

これまで我々は、ホウライシダフィトクロム3 (phy3) LOV2の光反応について、紫外・可視及び赤外分光を用いた解析を行っている²。そこで今回、phy3 LOV1を同様の条件で測定し、LOV2との比較解析を行った。その結果、phy3 LOV1はLOV2と異なり、77 Kでは全く光反応しないことがわかった。システイン側鎖はLOV2と同様プロトン化していたが、LOV2とは違って水素結合を形成し、S-H伸縮振動は大きな温度依存性を示した。一方、S390中間体の生成に伴うタンパク質骨格の変化にはほとんど温度依存性がなく、構造変化は発色団近傍のループ部分に限られていた。これは温度依存的にヘリックスやシート構造を変化させるLOV2と大きく異なる結果であり、このような構造変化はむしろLOV2のQ1029L変異体と類似していた³。今回の赤外分光測定により見出された限定された構造変化がLOV1の低い生理活性に関わるものと考えられる。

- Christie et al. (2002) Plant J. 32, 205.
- Iwata et al. (2003) Biochemistry 42, 8183.
- Nozaki et al. (2004) Biochemistry 43, 8373.

T.Iwata, D.Nozaki, S.Tokutomi and H.Kandori : Difference of photoreactions between LOV1 and LOV2 domains in *Adiantum* phy3

1P270

Phy3-LOV2 ドメインの光誘起構造変化に対するGln1029とAsn1008の役割: 低温赤外分光法を用いたQ1029L及びN1008V変異体の振動解析

○野崎 大¹、岩田 達也¹、石川 智子²、藤堂 剛²、徳富 哲³、神取 秀樹¹ (¹ 名工大院工、² 京大放生研、³ 大阪府大先端研)

固着生活を営む植物は自分の周囲の環境を太陽の光によって認識し、巧みに適応している。フォトリポピンは光屈性、気孔の開口、葉緑体光定位運動などに関与する青色光受容体としてはたらく。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。Phytochrome3 (Phy3) はシダで発見された光受容体であり、フォトリポピンファミリーの1種である。フォトリポピンLOVドメインの光反応はFMN-C(4a)とその近傍のCysのS-H基との共有結合の形成であり、中間体は1つ (S390) しか存在しない。しかしながら、我々はこれまでにPhy3-LOV2のS390における温度依存的なタンパク骨格の変化を明らかにしている¹。

今回、我々は暗状態の結晶構造においてFMNのC(4)=Oと水素結合を形成する2つのアミノ酸、Gln1029とAsn1008に着目した。S390の結晶構造によるとAsn1008は光励起によって大きな変化はないが、Glu1029はFMN-C(4)=OからN(5)-Hに水素結合の相手を変える。そこで発色団と両アミノ酸の水素結合の有無がそのPhy3-LOV2の構造変化にどのように影響するか調べるため、2つの変異体の赤外分光測定を行った。その結果N1008V変異体は野生型と同様にタンパク骨格の温度依存的な変化が観測されたが、Q1029L変異体ではタンパク骨格にほとんど変化が観測されなかった。従って、Phy3LOV2における光情報の伝達にとってGln1029が重要な役割を担うということが明らかとなった²。この結果を含め、両者の詳細な比較とそれぞれの特徴について議論したい。

- Iwata et al. (2003) Biochemistry 42, 8183.
- Nozaki et al. (2004) Biochemistry 43, 8373.

D. Nozaki, T. Iwata, T. Ishikawa, T. Todo, S. Tokutomi, and H. Kandori : Role of Gln1029 and Asn1008 in the Photoactivation Processes of Phy3-LOV2: Analysis of Q1029L and N1008V using FTIR spectroscopy.

1P272

青色光センサー Phototropin LOV2 付近の光反応構造変化

○永徳 丈¹、中曽根 祐介¹、松岡 大介²、徳富 哲²、寺嶋 正秀¹ (¹ 京大院理化学、² 大府大先端研)

Phototropin は植物体内で光屈性や葉緑体光定位運動等を制御する青色光受容蛋白質である。青色光を受けるとLOVドメインのポケットに収まっている発色団FMNがLOVドメインと共有結合を形成し、その後再び解離して定常状態に戻るという光サイクル反応があることが知られている。発色団FMNとLOVドメインが共有結合した後に、植物の「視覚」となるシグナルが発生していると考えられるが、その過程、特にダイナミクスは未だ明らかにされていない。光センサー蛋白質の構造変化の研究では発色団付近の電子状態変化に注目する手法が多く用いられるが (例えば過渡吸収スペクトル測定)、これでは発色団から遠い部分の構造変化が生体内でシグナルを発生する過程を捉えることはできない。本研究では、分子全体の構造変化を時間分解で検出できる過渡回折格子法を用い、分子拡散係数の変化・体積変化といった物理量測定により、発色団近傍の僅かな変化が蛋白質全体の構造変化に繋がるダイナミクスを捉えることを目標とした。シロイヌナズナ Phot2 を用い、LOVドメインと Ser/Thr kinase ドメインを結ぶリンカーに着目し、LOVドメインのみのサンプル、LOVドメインとリンカーから成るサンプルの2つについて調べた所、リンカーがない方ではほとんど構造変化は検出されなかったのに対し、リンカーがある方は分子拡散係数を大きく変化させるような構造変化が時定数約2msで起こっている様子が検出された。これは、発色団FMNがLOVドメインと共有結合を形成し、リンカーとLOVドメインの相互作用の結果、蛋白質と溶媒との分子間相互作用が大きく変わった結果と考えることができる。青色光を受けることでkinaseドメインが活性化されることが既にわかっていることから、LOVドメインとリンカーの分子内相互作用 (分子内シグナル伝達) によるkinase活性へのスイッチ制御が初めて検出されたと思われる。

T.Eitoku, Y.Nakasone, D.Matsuoka, S.Tokutomi and M.Terazima : Photo-induced structure change around LOV2 domain of Phototropin