1P281

イエロープロテインにおける $\beta 5$ - $\beta 6$ ループの役割

○笹山 裕晃、針貝 美樹、上久保 裕生、山崎 洋一、今元 泰、片岡 幹雄（奈良先端大・物質）

Photoactive yellow protein (PYP) は紅色光合成細菌に存在する光受容蛋白質で、細菌の負の走光性に関与していると考えられている。今までに本研究室では、さまざまな手法により PYP の光反応や活性中間体と考えられている M 中間体の物性を検討してきた。その結果、M 中間体では、N 末端部、 $\beta 4$ - $\beta 5$ ループ (Met100 ループ)、 $\beta 5$ - $\beta 6$ ループが大きく構造変化していることが示唆された (上久保ら、2002 年年会)。そこで今回は、PYP の $\beta 5$ - $\beta 6$ ループ 4 残基のアミノ酸をアラニン置換 (L113A、S114A、G115A、D116A) し、光反応への影響を検討した。

まず、いずれの変異体でも吸収極大波長 (446nm) は野生型と同じであった。また遠紫外部の CD により変異体の構造と熱変性を検討したところ、すべての変異体の CD スペクトルが野生型と一致することから、同様の二次構造を形成していると考えられた。熱変性においても野生型の変性中点温度が約 85℃ であるのに対し、それぞれ 1~2℃ 以内の差ではほぼ一致していた。次に M 中間体の吸収スペクトルを測定したところ、酸性型、アルカリ型ともに野生型と一致した。また M 中間体から暗状態に戻る際の崩壊速度を測定した結果、構造変化が小さい酸性型 M 中間体の寿命は、いずれの変異体でも野生型とほぼ一致したが、構造変化が大きなアルカリ型 M 中間体では、G115A のみが野生型に比べて約 2 倍不安定になっていた。以上の結果から、 $\beta 5$ - $\beta 6$ ループのアミノ酸残基の側鎖は構造や光反応に影響しないが、グリシンを含むこの領域の主鎖の柔軟さが PYP 本来の光構造変化に重要であると考えられる。

H.Sasayama, M.Harigai, H.Kamikubo, Y.Yamazaki, Y.Imamoto and M.Kataoka : Role of the $\beta 5$ - $\beta 6$ loop in PYP photocycle

1P283

マイクロ秒〜ミリ秒領域でのイエロープロテインの光反応サイクル

○今元 泰、片岡 幹雄（奈良先端大・物質）

Photoactive yellow protein (PYP) の光反応サイクルで、数 100 ミリ秒の時間領域で現れる近紫外中間体 (PYP_M) は、活性中間体であると考えられている。これまでわれわれは、定常光照射によって蓄積した PYP_M の物性をさまざまな pH で調べ、比較的構造変化の小さな酸性型 (PYP_M^a 、吸収極大波長=368 nm) と、大きく構造が変化したアルカリ型 (PYP_M^b 、吸収極大波長=357 nm) が、pH 平衡にあることを示した (清水ら、2003 年年会)。今回は、生理的な pH で蓄積する PYP_M^b の生成過程を詳細に調べるため、二つの PYP_M とその前駆体である PYP_L の光反応サイクル中での挙動を、マイクロ秒〜ミリ秒領域の閃光分解実験で調べた。

PYP を 440 nm のレーザーで励起し、数 10 マイクロ秒から数 100 ミリ秒領域でのスペクトル変化を測定した。pH 8 では、 PYP_L から PYP_M に変化するまでの吸光度変化は 2 成分の指数関数で近似され、 PYP_M の生成に由来する近紫外部の差吸収極大は徐々に短波長シフトした。このようなシフトは、酸性では見られなかったため、この二段階のスペクトル変化は、主に PYP_L から PYP_M^a への変化 (約 100 マイクロ秒) と、 PYP_M^a から PYP_M^b への変化 (約 2 ミリ秒) であると考えられた。さらに詳細に解析するため、得られた過渡スペクトルを特異値分解法 (SVD) で分解し、2 成分のシーケンシャルモデルを仮定して早い過程、遅い過程それぞれの基底スペクトル (B-スペクトル) を求めた。その結果、遅い過程にも長波長産物である PYP_L の寄与が見られたので、 PYP_L と PYP_M^a の間に平衡があることが示された。さらに、酸性にすることによって遅い成分の寄与が非常に小さくなることが確認された。以上のことから、PYP の生理的条件下の光反応サイクルでは、 PYP_M^b は PYP_M^a を経て生成すること、および PYP_L 、 PYP_M^a 、 PYP_M^b が互いに平衡にあることが示された。

Y. Imamoto and M. Kataoka : Photocycle of photoactive yellow protein studied by microsecond-millisecond spectroscopy

1P282

Photoactive yellow protein における Met100 ループの役割

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

Photoactive yellow protein (PYP) は、光合成細菌 (*Halorhodospira halophila*) の負の走光性に関与する比較的小さな (約 14k D) 水溶性蛋白質である。PYP の立体構造は、典型的な PAS ドメイン構造であることから、PYP は PAS ドメイン蛋白質の原型と考えられている。PYP の光反応サイクルの中で、活性中間体と考えられているのは PYP_M (M 中間体) である。従って、PYP の光構造変化メカニズムの解明には PYP_M についての知見が不可欠である。我々のこれまでの X 線溶液散乱実験により、PYP において最も柔軟な部分は Met100 を含んだループ領域 (Met100 ループ) であることが分っている (上久保ら、2002 年年会)。そこで、分光学的手法によりこの領域の役割を調べ、PYP の光構造変化についての知見を得ることを目的とした。

Met100 ループに属するアミノ酸残基のアラニン置換変異体について、紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、野生型に比べ最大で 4nm 短波長シフトしていた。また、酸性条件下 (pH5) でフーリエ変換赤外分光法 (FTIR) により PYP (暗状態) と光定常下の差スペクトルを測定したところ、D97A 及び M100A ではアミド I 領域に野生型より大きな変化が見られたが、Y98A 及び Q99A の変化は、野生型に比べ非常に小さなものであった。前者は、D97A_M、M100A_M の構造が、酸性条件下でもアルカリ型の PYP_M に近いことによるためであると考えられる。後者は、PYP の結晶構造でみられる、Tyr98 のフェノール環と Gln99 のアルキル鎖との疎水的なスタッキングが、構造変化に不可欠であることを示唆している。以上のことから Met100 ループは PYP 本来の構造変化に特に重要な領域であると考えられる。

M.Harigai, Y.Imamoto, Y.Yamazaki, H.Kamikubo, M.Kataoka : Role of Amino Acid Residues in Met100 Loop of Photoactive Yellow Protein

1P284

Ppr (PYP-Phytochrome Related Protein) における PYP ドメインの役割

○林 道弘、上久保 裕生、白井 久美子、山崎 洋一、今元 泰、片岡 幹雄（奈良先端大・物質）

Ppr (PYP-Phytochrome Related Protein) は、光合成細菌 *Rhodospirillum centenum* に存在するカルコン合成酵素遺伝子の発現制御に関与した光センサー型ヒスチジンキナーゼ (HK) である。また Ppr はフィトクロム様蛋白質である一方、光センサードメインとして Photoactive yellow protein (PYP) 類似ドメインを有する。光合成細菌 *Halorhodospira halophila* 由来の PYP (h-PYP) は今日まで詳細な研究が行われてきたが、相互作用する蛋白質は同定されておらず、その情報伝達機構は未だ明らかになっていない。つまり、Ppr の光制御機構を研究することで、PYP の情報伝達における役割を明らかにすることが期待できる。

そこで我々は、PYP ドメインと HK ドメイン間の相互作用に関する知見を得ることを目的に、*R. centenum* から ppr 遺伝子をクローニングし大量発現系を構築すると同時に、PYP ドメイン (p-PYP) のみの発現系を構築した。単離精製した Ppr と p-PYP の吸収スペクトルを比較した結果、Ppr の吸収極大 (433nm) は p-PYP (434nm) に比べ短波長シフトしていた。さらに、光照射後の吸収スペクトルを測定したところ、ともに h-PYP における L 中間体と M 中間体の蓄積を示すスペクトル変化が観測された。また、暗状態への回復速度を 430nm の吸光度変化で追跡したところ、p-PYP ($k=3.18 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) に比べ Ppr ($k=4.43 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) では、若干速度が増加していることが明らかになった。これらの結果は、PYP ドメインと HK ドメインはむしろ暗状態より強く相互作用していることを示唆している。これらの結果を踏まえ、今後、詳細な光反応の解析を行うことによって、Ppr における PYP ドメインの役割をより明確にしていこう。

M.Hayashi, H.Kamikubo, K.Shirai, Y.Yamazaki, Y.Imamoto and M.Kataoka : The role of PYP domain in Ppr (PYP-Phytochrome Related Protein)