2P297

フラビン結合青色光センサータンパク質PixDの光反応過程: アミノ酸置換と高速時間分解分光による解析

○福島 佳優¹、岡島 公司²、柴田 穰¹、池内 昌彦²、伊藤 繁¹ (¹ 名大院・理、² 東大院・総合文化)

BLUF ドメイン (Sensor of Blue Light Using FAD) は、様々な生物種のゲノム上に見つかる新しいFAD(Flavin Adenine Dinucleotide) 結合光センサータンパク質である。BLUF ドメインでは、光吸収に伴いフラビンの吸収スペクトルが約 10 nm の長波長シフトする。この吸収変化は、他のフラビン結合光センサーである LOV ドメインのトリプレット遷移やCryptochromeの電子移動反応とは全く異なる。同じフラビン分子を持つにも関わらず、なぜ異なる光反応過程を持つかは不明である。

本研究では、フラビン周辺の環境が光反応に与える影響を調べるため、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 のPixD (Tll0078) タンパク質に部位特異的変異を導入し高速時間分解分光測定を行った。フラビン周辺で水素結合ネットワークを構成する Tyr8 残基に変異を導入した Y8F と Y8A のミュータントは、ともに正常な光応答を示さなかった。室温での蛍光寿命はともに 1.2 ns の減衰成分が主な成分 (60 % (Y8F), 69 % (Y8A)) であった。この寿命は wild type よりも 10 倍遅い。水素結合の配置のわずかな変化により、初期光反応過程が変化したと考えられる。PixD の構造モデルとフラビンの光反応の相関を議論する。

Y. Fukushima, K. Okajima, Y. Shibata, M. Ikeuchi and S. Itoh : Photoconversion mechanisms of PixD protein studied by site-directed mutagenesis and time-resolved spectroscopy

2P299

Resonance Raman Study on the Active Site of (6-4) Photolyase: Electron Density Localization in FAD and Strong H-bonding Environment

○李 江^{1,2}、内田 毅^{1,2}、藤堂 剛³、北川 楨三^{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)

The (6-4) photoproduct, as well as cyclobutane pyrimidine dimer (CPD), which is a compound in the major DNA lesion induced by ultraviolet (UV) light, can be repaired by (6-4) photolyase with FAD as an essential cofactor. Although it has been proposed to have a similar mechanism to the CPD photolyase, that is, the photoexcited reduced FAD provides an electron to the damaged DNA, and an electron is transferred back from repaired DNA to the neutral semiquinoid FAD after repair, this enzyme has significantly lower quantum yield of DNA repairing compared to that of CPD photolyase. To explore the structure and environment of FAD in (6-4) photolyase from *Arabidopsis thaliana*, the neutral semiquinoid form of the enzyme was investigated by resonance Raman spectroscopy.

The frequencies of Raman bands derived from the ring I of FAD were lower than those of other flavoproteins, indicating that electron density of ring I in (6-4) photolyase is lower. In addition, the 1423 cm⁻¹ band of C10a-C4a stretching mode was observed for the first time in neutral semiquinoid flavoprotein with higher frequency than the published predicted value. This feature is compatible to localization of spin density in rings II and III, which is similar to that of CPD photolyase. The larger low-frequency shift of the marker band of hydrogen bond at 1522 cm⁻¹ suggests that the FAD is strongly hydrogen bonded at N5-H, which may weaken its electron acceptability due to increase in the energy level of LUMO, thus may contribute to the lower quantum yield of (6-4) photolyase.

J. Li, T. Uchida, T. Todo, and T. Kitagawa : Resonance Raman Study on the Active Site of (6-4) Photolyase: Electron Density Localization in FAD and Strong H-bonding Environment

2P298

シアノバクテリアの新規青色光受容体PixDの構造、光受容機構の解析

○岡島 公司¹、喜田 昭子^{2,3,4}、福島 佳優⁵、落合 有里子¹、柴田 穰⁵、片山 光徳¹、森本 幸生²、伊藤 繁⁵、三木 邦夫^{3,4}、池内 昌彦¹ (¹ 東大院・総文、² 京大・原子炉、³ 京大院・理、⁴ 理研播磨・SPRing-8、⁵ 名大院・理)

BLUF ドメインタンパク質はバクテリアや一部の真核単細胞生物に存在するフラビン結合青色光受容体として知られている。シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の BLUF タンパク質 PixD (Slr1694) は走光性に関わる青色光受容体である。我々は好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 のホモログの PixD (Tll0078) を大腸菌で発現、精製を行い、結晶構造解析により、2.0 Å の分解能でその新規の構造を明らかにした。PixD は 5 量体が 2 つ合わさったホモ 10 量体を形成し、それぞれの単量体は 5 本の β シートに平行な 2 本の α ヘリックスとシートを挟んでそれと直交した 2 本のヘリックスで構成していた。フラビンはシートに平行な 2 本の α ヘリックスに挟まれ、Gln50、Asn32、Asn31 と水素結合で直接相互作用し、さらに Gln50 は Tyr8 とも相互作用していた (Tyr8-Gln50-O4/N5 (flavin) network)。これらのアミノ酸残基を Ala に置換した変異導入タンパク質 (Q50A, N32A, N31A, Y8A) を作製し、その分光学的解析を行った。BLUF ドメインは青色光照射によって ~10nm 長波長シフトし暗所でもとにもどるフォトサイクルを示す。N32A と N31A では WT と同様なフォトサイクルを示したが、Q50A と Y8A は長波長シフトを示さず、全く別の反応であるブリーチを示した。光励起により Gln50 の側鎖とフラビンの O4 間の水素結合が強くなることが示唆された。Tyr8 によって固定された Gln50 のフラビンへの配向が長波長シフトに重要だと考えられる。この Gln と Tyr は高度に保存されており Tyr-Gln-O4/N5(flavin) network が BLUF ドメインの光受容機構に重要であると結論した。

K.Okajima, A.Kita, Y.Fukushima, Y.Ochiai, Y.Shibata, M.Katayama, Y.Morimoto, S.Itoh, K.Miki and M.Ikeuchi : Analysis of structure and light sensing mechanism of PixD in thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1

2P300

原核 87、真核 21 種膜貫通タンパク質配列の網羅的機能分類・同定

○吉田 秀一¹、松谷 峰生¹、新居 真吏²、清水 俊夫¹ (¹ 弘前大・理工・電子情報システム工、² 東北大院・生命科学・生命機能)

配列類似性に基づくクラスタリングによって網羅的な機能分類・同定を行うには、all-against-all 配列比較が必要となる。しかし、配列数が多くなると、それに要する計算時間は膨大なものとなり、現実的時間での計算は実質的に不可能となる。膜貫通(TM)タンパク質配列の場合、TM トポロジー予測を利用して、TM セグメント本数ごとに分割してクラスタリングを行うことで、この問題を解決することができる。しかしながら、特に真核生物由来の TM タンパク質に対する TM トポロジー予測精度は高くなく、例えば、Olfactory receptor は、半数近くが 7 本型以外の 2~17 本型と予測されてしまい、深刻な悪影響を与えてしまう。そこで、1~3 本型、2~4 本型、3~5 本型… のように分画に区切ってクラスタリングを行い、その後、共通部分の併合によってクラスタリングを完成させるという方法を採用することとした。

例えば、真核 12 本型の Sodium-depend transporter は、9~11、10~12、11~31 本型の 3 つの分画でクラスター化され、それらを併合することにより 472 配列を含むクラスターを作ることができる。この中には、その他の類似機能 1 配列、機能未知 37 配列が含まれており、TM タンパク質の網羅的機能分類・同定におけるこの方法の有効性を示している。現在は、真核 21、原核 87 種由来のすべての TM タンパク質 146,915 配列を対象として、この分画・併合法を適用したクラスタリングによる網羅的機能分類・同定を進めているところである。さらに、このようにして作られたクラスターからは、TM タンパク質のループ領域に存在する機能ドメインの網羅的定義を行うことが可能となる。これらについても合わせて報告したい。

S.Yoshida, M.Matsuya, M.Arai and T.Shimizu : Comprehensive functional classification and identification 87 prokaryotic and 21 eukaryotic transmembrane proteins.