

4B07 光活性化アデニル酸シクラーゼの単一タンパク質分光

(東工大物理) ○藤芳 暁・平野 充遥・松下 道雄

(総研大葉山高等研¹・総研大先端科学²) 伊関 峰生¹・渡辺 正勝²

光活性化アデニル酸シクラーゼ (Photoactivated adenylyl cyclase, PAC) はミドリムシの光回避反応を司るフラビントタンパク質である [1]。この反応において、PAC はフラビン結合ドメインの青色光吸収を活性化の信号として、PAC 自身の持つ酵素ドメインにより環状アデノシンリン酸 (cAMP) を生成するという役割を担う。つまり、PAC は光応答と酵素という二つの機能を分子内で担っているタンパク質である。さらに、cAMP 合成効率を光で制御できるという PAC のユニークな特長から、生体機能を光制御するための道具としても注目を集めている [2]。このように魅力的なタンパク質であるが、発現系が未開発であるため構造および機能に関する研究が困難であった。一方、単一タンパク質分光は微量分析法であり、実行的に、精製可能な最小量 (数マイクロリットルの濃度 0.05 g/l の緩衝溶液) のタンパク質があれば測定可能である。そこで、我々が開発した液体ヘリウム温度の可視単一タンパク質分光 [3-5] をミドリムシから抽出した天然 PAC に用いることで、PAC の機能に関する分光学的研究を進めている。その結果、天然 PAC の光活性化の初期過程に関する知見を得たので報告する。さらに、これまで報告例がない低温のフラビントタンパク質の単一タンパク質分光を実現するために行った装置開発の詳細も合わせて紹介する。

【単一天然 PAC】

図 1a に、温度 1.5 K の単一天然 PAC から得られた蛍光強度の時間依存性を示す。一個の天然 PAC には複数のフラビン補因子が存在し、図 1a に現れているのは、これら補因子の蛍光である。この蛍光強度の時間変化を見ると、補因子が複数であることを反映して、経過時間 10 分くらいまで連続的に減衰した。これに対して、経過時間 40~50 分では蛍光強度が一定になり、経過時間 50 分に一段階でバックグラウンドレベルに減衰した。この時間的振る舞いは単一分子からの蛍光の特徴であり、これが一つの補因子から発せられる蛍光強度 (D_{F_min}) であると考えられる。図 1a と同様の実験を 14 個の天然 PAC に対して得られた D_{F_min} の平均値と時間原点付近の蛍光強度の平均値との比から、天然 PAC には 8 ± 1 個のフラビン補因子を含むと見積もった。この結果は天然の PAC の生化学的な分析結果と一致した。

図 1 下に、各時間における蛍光スペクトルを示す。時間原点(b)および約 1/3 に減衰した後(c, e)では測定限界波長(= 480 nm)から右下がりのスペクトルを示したが、経過時間 16 分と 21 分に蛍光強度の増大

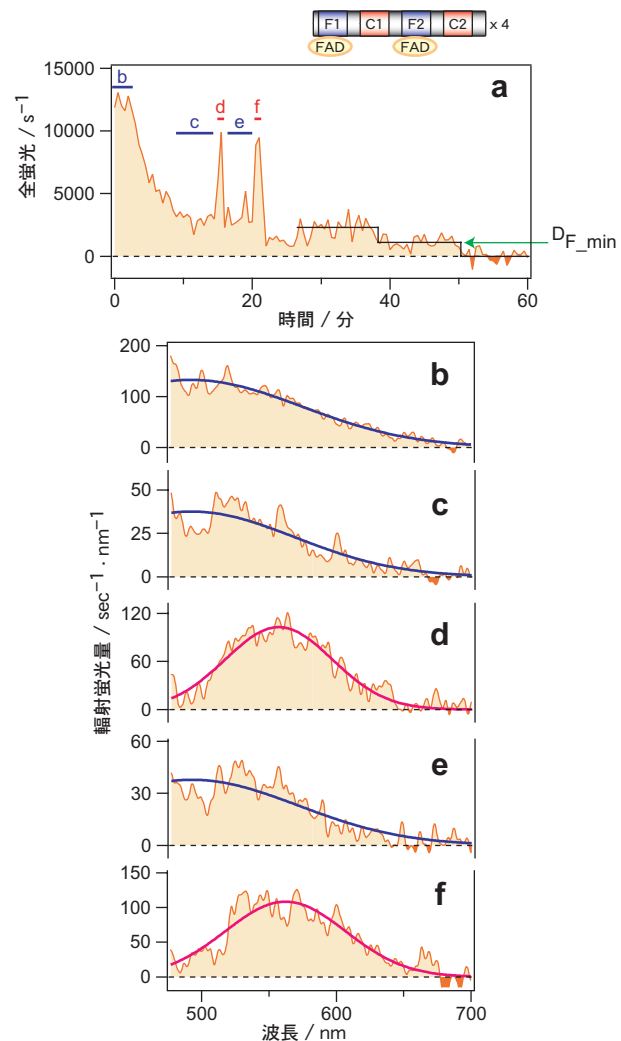


図1. 温度1.5 Kにおける単一天然PACの蛍光. (a) 蛍光強度の時間変化. (b - f) aに示したバーの時間領域における蛍光スペクトル. 励起波長: 440 nm, 円偏光.

(図 1a) と共に、50 nm 以上の長波長シフトを示した。この起源を明らかにするために、一個のフラビン結合ドメインだけを発現させ(野生種 **wild-type** の α サブユニットの F2 ドメインということから **wtPAC α F2** と呼ぶ)、同様の測定を行った。

【単一フラビン結合ドメインによる天然 PAC の光応答の研究】

図 2 に、温度 1.5 K の単一 wtPAC α F2 の蛍光スペクトルの時間変化を示す。上図の縦軸は経過時間、横軸は波長、黒い部分が蛍光強度の強い所である。図 2 (上) の右側のバーで示した時間領域の積分値を下図に示す。図 2 を見ると、経過時間 a \rightarrow b および b \rightarrow c に、天然 PAC (図 1) と同様な波長 50 nm 程度のスペクトルジャンプを示した。49 個の wtPAC α F2 に対して図 2 と同様の実験を行い、ジャンプの頻度をその大きさに対して示したのが図 3 である。図の上段は wtPAC α F2 中の単一フラビン分子、下段は緩衝溶液に溶かした単一フラビン分子 (50 個の結果から) の蛍光測定から得られた結果である。この分布から分かるように、波数 700 cm^{-1} 以上のジャンプは wtPAC α F2 中特有である。さらに、wtPAC α F2 のフラビン結合サイトのアミノ酸残基を異なる残基へ遺伝子組み換えしたタンパク質の測定結果から、天然 PAC と wtPAC α F2 で観測されたジャンプはフラビン分子と、直接、水素結合したグルタミン残基の立体配置が変化したために起こったと帰属した。

参考文献

1. M. Iseki, S. Matsunaga, A. Murakami, K. Ohno, K. Shiga, K. Yoshida, M. Sugai, T. Takahashi, T. Hori, M. Watanabe, *Nature*, **415**, 1047-1051 (2002)
2. S. Schroder-Lang, M. Schwarzel, R. Seifert, T. Strunker, S. Kateriya, J. Looser, M. Watanabe, U. B. Kauipp, P. Hegemann, G. Nagel; *Nature Method*, **4**, 39-42 (2007)
3. S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, M. Matsushita; *Physical Review Letters*, **100**, 168101 (2008).
4. S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, M. Matsushita, A. M. van Oijen, J. Schmidt; *Applied Physics Letters*, **91**, 051125 (2007).
5. M. Fujiwara, S. Fujiyoshi, M. Matsushita; *Journal of the Optical Society of America B*, **26**, 1395-1399 (2009).
6. S. Ito, A. Murakami, K. Sato, Y. Nishina, K. Shiga, T. Takahashi, S. Higashi, M. Iseki, M. Watanabe; *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**, 762-769 (2005).

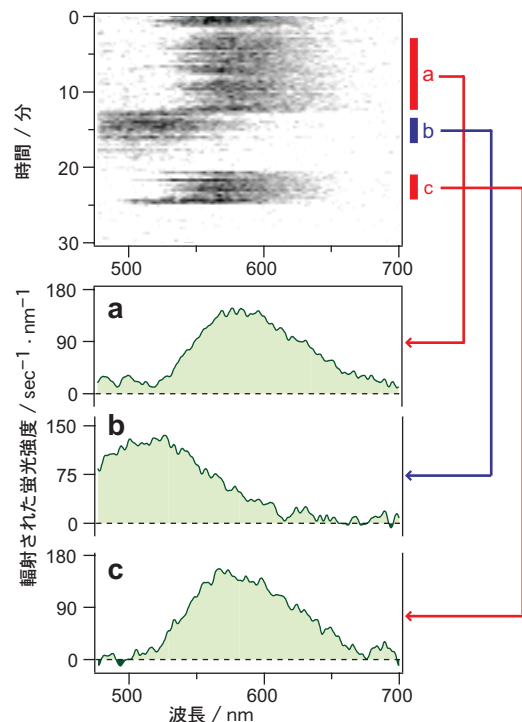


図2. 温度1.5 Kの単一wtPAC α F2の蛍光の時間変化. 励起波長: 440 nm, 円偏光.

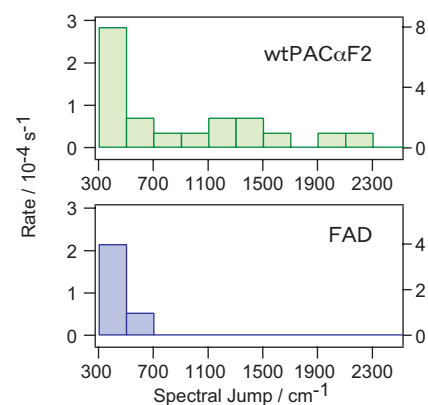


図3. 単一wtPAC α F2(上段) および緩衝溶液中の単一フラビン分子(下段)のスペクトルジャンプの頻度(測定温度1.5 K).