

FMN 結合型蛍光タンパク質 iLOV の光反応

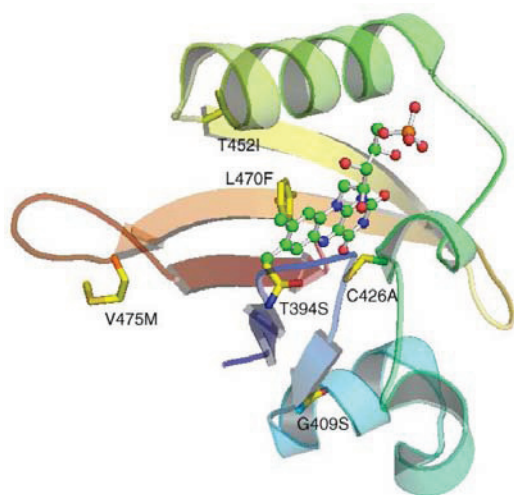
(名工大院工¹、スクリプス研²、グラスゴー大³)○穂積直樹¹、岩田達也¹、張宇¹、人見研一²、E. D. Getzoff²、J. M. Christie^{2,3}、神取秀樹¹

図1 iLOVの構造と変異箇所

FMN と共有結合を形成するシステインに加えて、5カ所のアミノ酸に変異が導入されている(ホウライシダ neo1 LOV2 を元に描いた PDB ID:1G28)

図1の六重変異体がどのようにFMNに影響を与え、蛍光を強めるのかそのメカニズムは不明である。そこで本研究では、紫外・可視分光法とFTIR分光法を用いてiLOVとC/A変異体、野生型の光反応を比較した。これらの比較解析から蛍光強度の由来について議論する。

【実験】 [タンパク質] iLOV、phot2-LOV2の野生型(WT)とC/A変異体は大腸菌によりGSTとの融合タンパク質として発現させた。大腸菌破砕液から目的タンパク質をグルタチオンセファロースカラムによって精製した後、トロンビン処理でGSTタグを除去した。

[励起三重項状態の測定] タンパク質試料は1mMリン酸カリウムバッファ(pH7.0)で透析した。BaF₂窓板上に試料を30μL滴下し乾燥させ、その後水和させ水和フィルム試料とした。低温コントロール装置を備え付けたFTIR分光器に水和フィルム試料をセットし、77Kにしたのち、>400nmの光照射中と照射前のスペクトルの差を励起三重項状態と基底状態の差スペクトルとした[2]。

[還元剤存在下での光反応の測定] タンパク質試料に還元剤DTTを終濃度300mMとなるように加え、>400nmの光照射に伴う反応を紫外・可視分光器で測定した。また、FTIR測定のため、濃縮した試料2μLを窓板上で乾燥させ、水或いはDTT溶液0.4μLで再溶解させ窓板で

【序】 LOVドメインは植物の青色光受容体であるフォトトロピン(phot)に存在する光受容ドメインである(図1)。LOVドメインは約100アミノ酸残基から構成され、発色団としてフラビンモノヌクレオチド(FMN)を結合している。LOVの光反応はFMN発色団のC4a炭素と、近傍に保存されたシステイン残基間の共有結合形成(S390中間体)であるが、システインをアラニンに変異させる(C/A変異体)と、共有結合形成反応が起こらず、FMNの蛍光強度が増大する。Christieらは、LOVドメインをタンパク質性蛍光プローブとして用いることを考え、シロイヌナズナphot2-LOV2を鋳型に、random mutagenesisにより、高い蛍光強度を示すLOV変異体を作製、iLOVと名付けた[1]。iLOVは蛍光プローブとして有名なGFPよりも優れた性質をもっているが、

挟み込んだ試料（再溶解試料）を用意した。光照射による差スペクトルを FTIR 分光器で測定した。

【結果と考察】

〔励起三重項状態〕 光照射による励起三重項状態を低温 FTIR で測定し、neo1（ネオクロム 1、フォトトロピンの一種）-LOV2 の WT 及び C/A 変異体[2]と比較したところ、スペクトルはよく一致した。このことは、励起三重項状態の構造は LOV ドメイン（LOV2 ドメイン）の種類や変異導入によらず同一であることを示唆している。

〔還元剤存在下での光反応〕 iLOV と phot2-LOV2 の C/A 変異体は、DTT 存在下で FMN の還元反応が観測された（図 2a、b）。一方、phot2-LOV2 の WT では S390 中間体の生成が確認され、還元剤存在下であっても、LOV 本来の光反応が優先して起こることがわかった（図 2c）。iLOV と C/A 変異体の間では、セミキノン型（FMNH[•]）の生成・崩壊に違いがみられたので、詳細なキネティクスの解析を行うとともに、現在は FTIR 測定による構造的な比較を行っているところである。

これらの実験結果をもとに、蛍光の増大をもたらす iLOV に特異的な構造やダイナミクスについて議論したい。

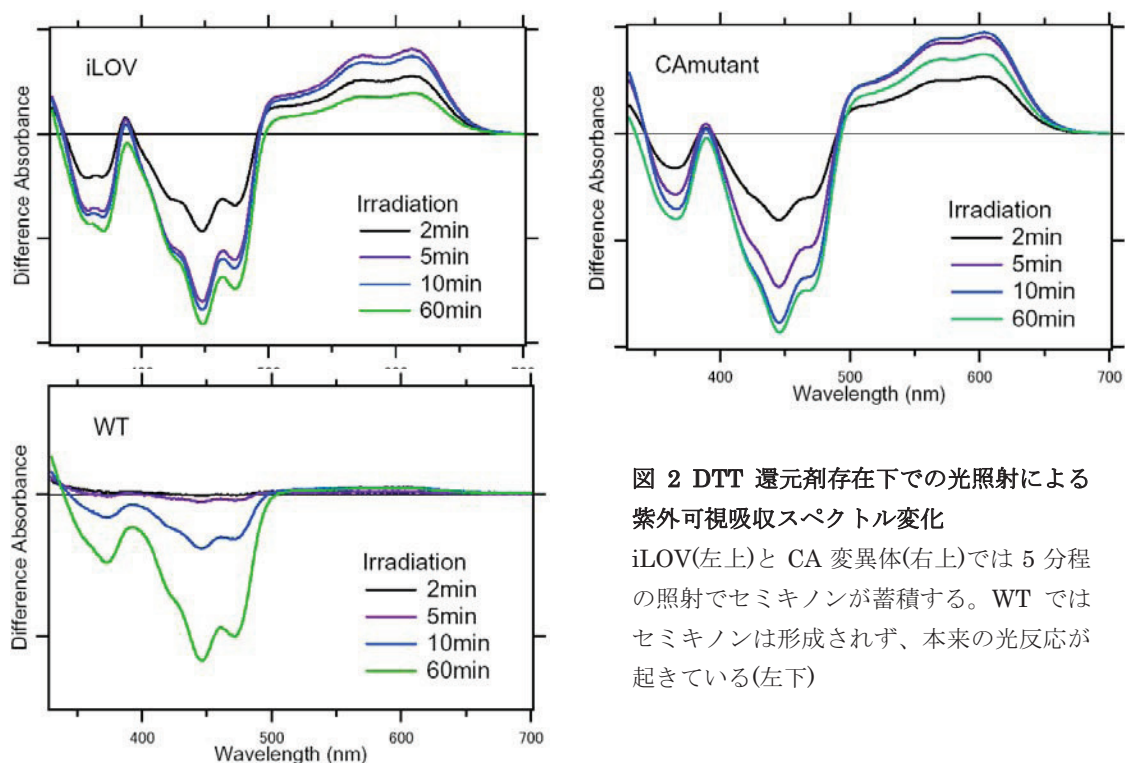


図 2 DTT 還元剤存在下での光照射による紫外可視吸収スペクトル変化

iLOV(左上)と CA 変異体(右上)では 5 分程の照射でセミキノンが蓄積する。WT ではセミキノンは形成されず、本来の光反応が起きている(左下)

【参考文献】

- [1] S. Chapman, C. Faulkner, E. Kaiserli, C. Garcia-Mata, E. I. Savenkov, A. G. Roberts, K. J. Oparka, J. M. Christie (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 20038-20043.
- [2] Y. Sato, T. Iwata, S. Tokutomi, H. Kandori.(2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1088-1089.