

## FMN 結合型蛍光タンパク質 iLOV の分光解析

(名工大院工<sup>1</sup>、神戸大院理<sup>2</sup>、神戸大分子フォト<sup>3</sup>、スクリプス研<sup>4</sup>、グラスゴー大<sup>5</sup>)  
 ○張 宇<sup>1</sup>、高務 真美<sup>2</sup>、秋本 誠志<sup>2,3</sup>、岩田 達也<sup>1</sup>、人見 研一<sup>4</sup>、E. D. Getzoff<sup>4</sup>、富永 圭介<sup>2,3</sup>、  
 J. M. Christie<sup>4,5</sup>、神取 秀樹<sup>1</sup>

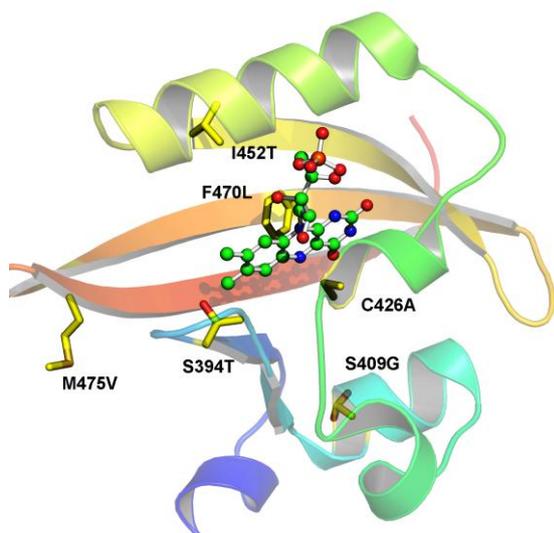


図1 iLOVの構造と変異箇所

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(立体構造は、ホウライシダ *neol* LOV2を元としている。PDB ID:1G28)

手法を用いて野生型、C/A変異体との比較解析を行った。

【実験】 [試料] *Arabidopsis phot2-LOV2*の野生型、C/A変異体、iLOVは大腸菌によりGSTとの融合タンパク質として発現した。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、スロンビン処理でGSTタグを除去した。赤外分光解析以外の実験は中性水溶液中で行った一方、赤外分光のためには濃縮した試料を赤外窓板上で乾燥させた上で、水和フィルムあるいは再溶解試料を実験に用いた。

[分光解析] 蛍光寿命は、励起光425 nm、測定光520 nmの時間分解蛍光測定装置を用いて決定した。蛍光の量子収率は、硫酸キニーネを標準試料として360 nmの励起波長を用いて決定した。励起三重項状態の赤外分光解析は、水和フィルム試料を用いて77 Kでの>400 nmの光照射中と照射前との差スペクトルとして測定した<sup>[2]</sup>。一方、酸化型とセミキノン型との構造変化はDTTを含む再溶解試料に対する>400 nmの光照射に伴う赤外差スペクトルとして測定した。

【序】 LOVドメインは植物の青色光センサーとして機能するフォトトロピン (phot) の光受容ドメインである(図1)。LOVドメインは約100アミノ残基から構成され、発色団としてフラビンモノヌクレオチド (FMN) を結合しており、FMNの励起三重項状態におけるシステイン側鎖との光誘起共有結合形成によりタンパク質の構造変化が引き起こされる。Christieらは細胞生物学のための蛍光プローブとしての応用を考え、共有結合が形成されないCys→Ala変異体を鋳型として5カ所の変異を加えることで高い蛍光強度を示すiLOVを作製した<sup>[1]</sup>。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<sup>[1]</sup>、図1の六重変異体がどのようにFMNの光反応に影響を与え、蛍光を強めるのかそのメカニズムは不明である。そこで本発表ではiLOVの光反応の性質を明らかにするため、様々な分光学的

## 【結果と考察】

吸収極大波長は野生型と C/A が 446 nm、iLOV が 448 nm であり、Cys→Ala に対して加わった 5 カ所の変異導入が 2 nm の長波長シフトに関与することがわかった。一方、蛍光寿命はいずれも 2 ns & 4 ns の二成分で構成することができ、ほとんど試料間の差がなかった。蛍光の量子収率は、野生型が 0.081、C/A が 0.153、iLOV が 0.180 と決定され、iLOV が最大値を示したものの、*in vivo*<sup>[1]</sup>での顕著な違いとは異なっていた。これらの結果は、天然状態での発光環境には、酸化型からの一光子反応だけではない複雑な過程が含まれることを示唆している。

野生型の場合、励起された分子は項間交差により生成した励起三重項状態において、システイン側鎖と共有結合を形成する。数マイクロ秒の共有結合形成が起こらないため、C/A および iLOV では励起された分子は蛍光などの緩和過程を経てもとの酸化型に戻るものと考えられている。しかしながら、我々は還元剤存在下の光反応において、C/A が光照射時間に比例するようにセミキノン型 (FMNH<sup>\*</sup>) を生成したのに対し、iLOV では光照射の初期段階でセミキノン型が生成しにくいことを見出した。長時間安定なセミキノン型を生成しにくいという事実は、iLOV が細胞内のある程度、還元的な環境における蛍光プローブとして優れていることを示唆する。発表では、励起三重項状態やセミキノン型の赤外差スペクトルを比較し、iLOV において電子移動あるいはプロトン移動が起こりにくいメカニズムについて議論したい。

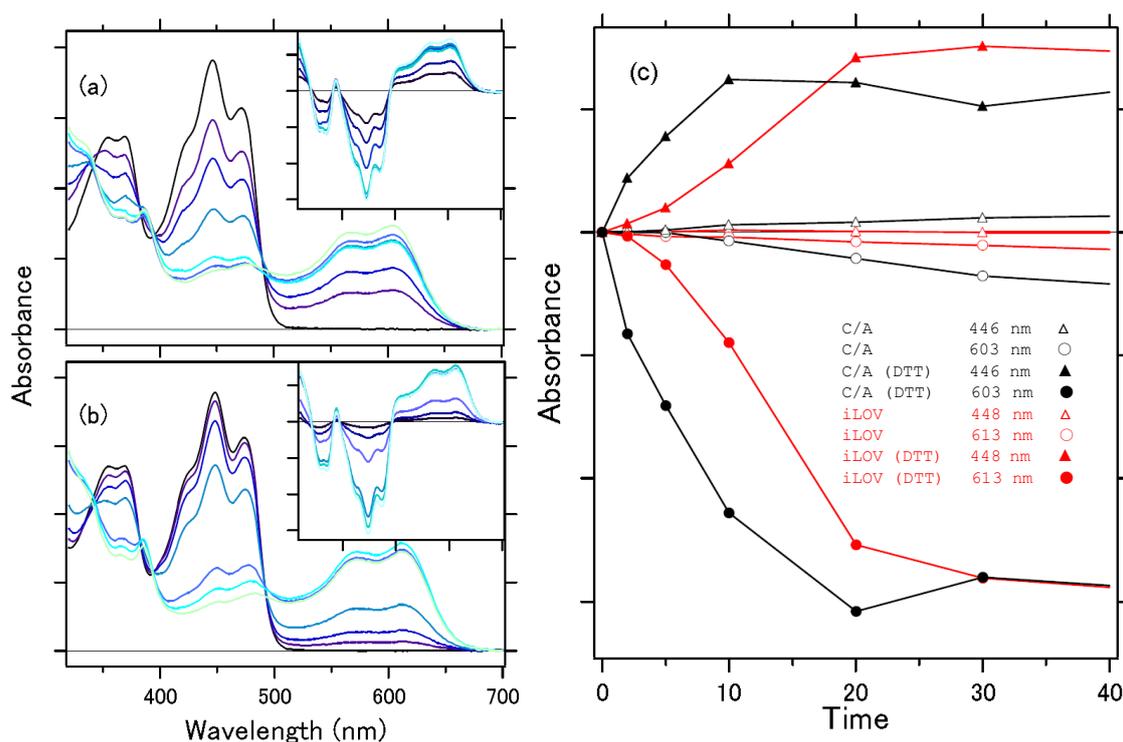


図 2 DTT 存在下での光照射による紫外可視吸収スペクトル変化

C/A 変異体(a) と iLOV(b)ではいずれも 40 分程度の照射によりでセミキノン型が蓄積する。(c) は C/A 変異体(黒線)と iLOV (赤線) におけるセミキノン型生成の照射時間依存性を示す。

[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.