

### 3D16

フェムト秒過渡吸収測定にもとづく BLUF タンパク質活性化機構の検討

○藤澤知績<sup>1</sup>、竹内佐年<sup>1</sup>、増田真二<sup>2</sup>、田原太平<sup>1</sup>

(理研田原分子分光<sup>1</sup>・東工大バイオ研究基盤支援総合セ<sup>2</sup>)

Femtosecond time-resolved absorption study of photoactivation mechanism of BLUF proteins

○Tomotsumi Fujisawa<sup>1</sup>, Satoshi Takeuchi<sup>1</sup>, Shinji Masuda<sup>2</sup>, Tahara Tahei<sup>1</sup>

(Molecular Spectroscopy Lab., RIKEN<sup>1</sup>, Center for Biological Resources and Informatics and Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology<sup>2</sup>)

【序】BLUF(Blue Light sensing Using FAD)タンパク質はFAD(flavin adenine dinucleotide)を発色団とする生体の青色光センサーである。BLUF タンパク質内でFADが光を受けると、FADの光サイクル反応とタンパク質構造変化が結びついてタンパク質の活性化が起こる。この活性化状態のタンパク質構造変化が生体の青色光感知のシグナルである。

BLUF タンパク質の活性化状態は、光受容前の暗状態に対して10nmほど赤方シフトした吸収バンドを持つのが特徴である。BLUF タンパク質活性化に伴うこの吸収スペクトルシフトは、発色団FAD周辺の水素結合構造変化が原因であると考えられてきた。しかし、そのメカニズムは不明である。またBLUF タンパク質の活性化状態の生成プロセスにも現在のところ2種類の報告があり、BLUF タンパク質の多様な光サイクルの原因と活性化機構の双方の解明が必要とされている。本研究では、新たにBLUF タンパク質PapB(紅色細菌 *Rhodospseudomonas palustris* 由来)を対象としてフェムト秒過渡吸収測定を行い、BLUF タンパク質の光サイクルとその活性化機構について検討した。

【実験】PapB のフェムト秒過渡吸収測定(時間分解能:0.1ps)には励起光450nmを用いた。サンプル濃度は約0.3mM(Trisバッファー、pH 8.0)に調整し、長寿命の活性化状態の蓄積を避けるため十分に速いフロー速度で測定を行った。

【結果と考察】図1に得られたPapBの過渡吸収スペクトルを示す。励起直後に現れるスペクトル(赤)は第一励起状態( $S_1$ 状態)に由来し、暗状態のブリーチ(~450nm)と誘導放出(~550nm)による2つの負のバンドが観測される。 $S_1$ 状態の減衰に伴って、600nm付近に反応中間体の生成による吸収バンド(青)が現れた後、最終的に長寿命の分散型のスペクトル(緑)が残る。このスペクトル形状は暗状態からのスペクトルシフトによるものであり、活性化状態に帰属できる。

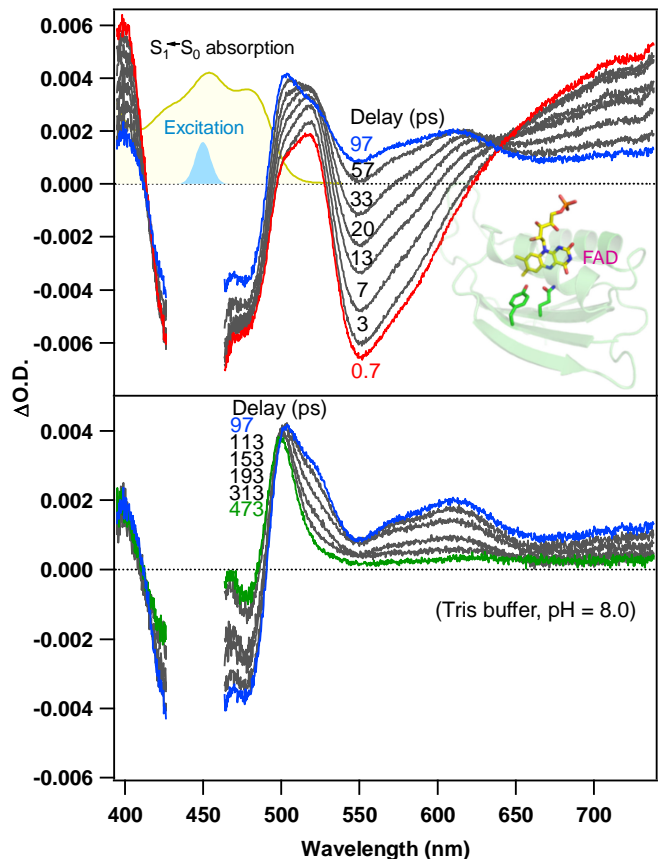


Figure 1. Transient absorption spectra of PapB

図2は特異値分解を利用して行った遅延時間73psでのスペクトル分割の例である。図2と同様に、どの遅延時間においても過渡吸収スペクトルはS<sub>1</sub>状態、反応中間体、および活性化状態の3つのスペクトルで構成することができ、得られたスペクトル形状から反応中間体はFADHラジカル(FADH•)に同定された。このことは、PapBの光活性化において発色団FADにプロトン共役電子移動が起こることを意味する。

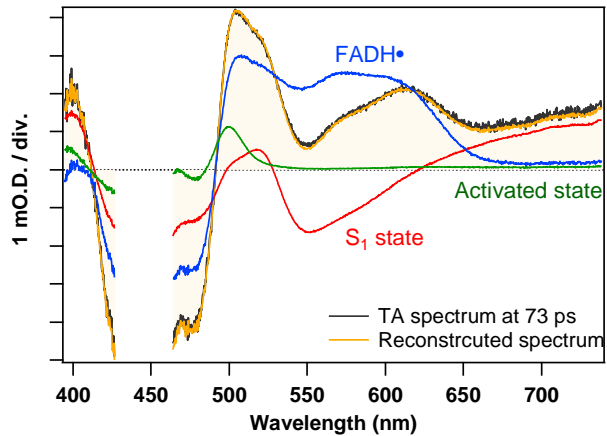


Figure 2. Decomposition of transient absorption spectrum

スペクトル分割から得られたS<sub>1</sub>状態、FADH•および活性化状態の時間プロファイル(軽水および重水中)を図3Aに示す。これまでBLUFタンパク質の光活性化過程には、FADH•を経由する活性化(FADH• → 活性化)とS<sub>1</sub>状態から直接に活性化(S<sub>1</sub> → 活性化)する2種類のプロセスが報告されており、前者はプロトン移動、後者には電子移動が重要となると考えられてきた。PapBの活性化状態の生成速度には顕著な重水素置換効果が現れており、これはPapBの光活性化にプロトン移動が関与することを示している。

PapBのS<sub>1</sub>状態は2段階で減衰するため、PapBの反応プロセスの解析にはFADH• → 活性化に基づいた2状態モデル(図3B)を用いた。FADH•を生成して活性化する状態(a%)と活性化せずに暗状態に戻る状態(b%)を考慮した2状態反応モデルは、PapBの光反応プロセスをよく再現できる(図3A)。また、活性化する状態は速いS<sub>1</sub>状態の減衰定数(τ<sub>a</sub>, 下表)を持つため、近距離のプロトン共役電子移動が活性化状態の生成に効果的になることを示唆する。講演ではFADH• → 活性化が報告されたSlr1694(シアノバクテリア *Synechocystis* 由来)と比較し、PapBの光サイクルと活性化機構の詳細を議論する予定である。

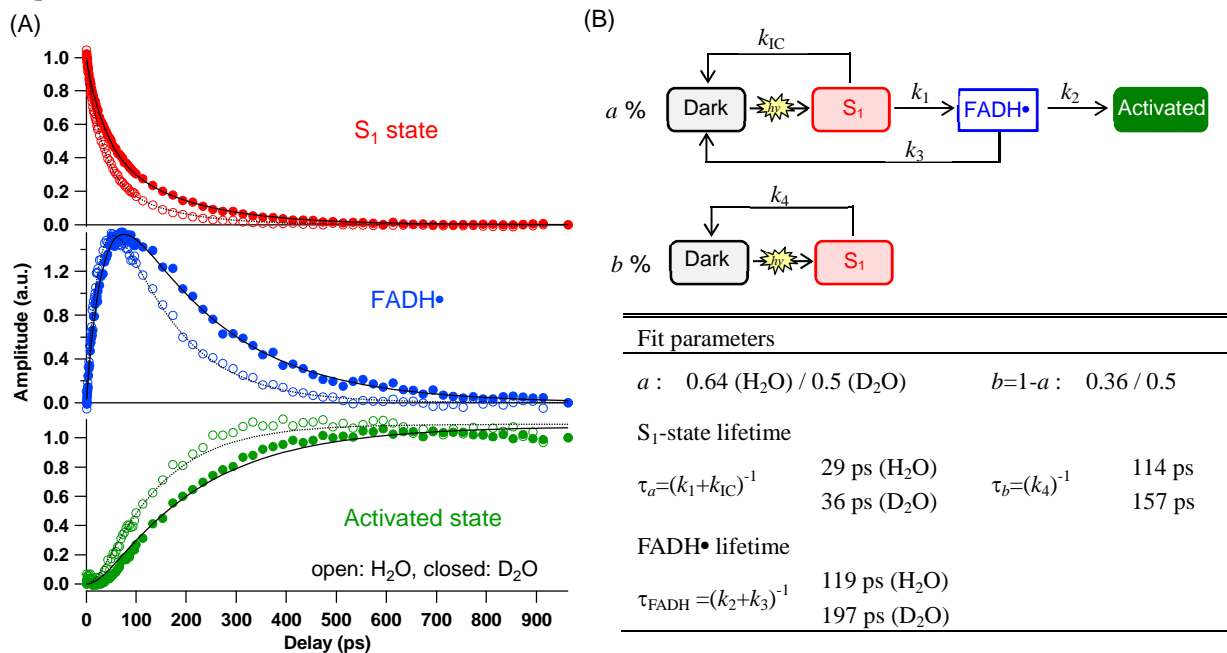


Figure 3. Kinetic analysis of PapB. (A): Temporal profiles (○ in H<sub>2</sub>O, ● in D<sub>2</sub>O) of S<sub>1</sub> state, FADH• and activated state with the fitting curves based on the reaction model (B). Fit parameters are listed on the table.