

## フェムト秒過渡吸収測定から見た BLUF タンパク質の新たなシグナル状態生成メカニズム

○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>

(<sup>1</sup>理研・田原分子分光&光量子工学領域、<sup>2</sup>東工大・バイオ研究基盤支援総合セ&地球生命研究所)

Mechanism of signaling state formation of BLUF protein studied by femtosecond transient absorption spectroscopy; ○Tomotsumi Fujisawa<sup>1</sup>, Satoshi Takeuchi<sup>1</sup>, Shinji Masuda<sup>2</sup>, Tahei Tahara<sup>1</sup>; (<sup>1</sup>Molecular Spectroscopy Lab. & Center for Advanced Photonics, RIKEN; <sup>2</sup>Center for Biological Resources and Informatics & Earth-Life Science, Institute Tokyo Institute of Technology)

【序】BLUF(Blue Light Using FAD)タンパク質はフラビン色素 FAD(Flavin Adenine Dinucleotide)を発色団とする生体の青色光センサーの一つである。光を受けた BLUF タンパク質は、FADの光反応によってタンパク質に構造変化が誘起されて、下流に光感知の信号を伝えることができる。この光感知信号を伝達する BLUF タンパク質のシグナル状態では、光を受ける前の暗状態に対して発色団の吸収スペクトルが 10nm ほど赤方シフトするのが特徴である(図 1)。

シグナル状態における発色団 FAD の吸収スペクトルシフトは、その生成が発色団 FAD の化学変化ではなく、発色団周りの水素結合変化に起因することを意味している。これまでの研究から、発色団 FAD と近傍の Gln および Tyr との水素結合ネットワークの変化が関わることが分かっているが、その水素結合構造および変化の機構は不明である。本研究では、シグナル状態の生成メカニズムの考察のために、BLUF タンパク質の暗状態およびシグナル状態のフェムト秒過渡吸収測定を行なった。

【実験】試料には紅色細菌 *Rhodospseudomonas palustris* 由来の BLUF タンパク質 PapB を用いた。試料濃度を約 0.3mM(Tris バッファー、pH 8.0)に調整し、450nm で励起した後の過渡吸収スペクトルを取得した。測定はフロー条件下で行い、シグナル状態(寿命: ~6 秒)を測定する際は試料を非常に遅い流速でフローすることで励起体積にシグナル状態を蓄積させて測定をした。時間分解能は約 0.1ps である。

【結果と考察】図 1 に PapB の暗状態(A)およびシグナル状態(B)の過渡吸収スペクトルを示す。励起直後に見られる過渡吸収スペクトル(赤)は S<sub>1</sub> 状態の生成に伴う励起状態吸収と誘導放出(~550nm)および基底状態のブリーチ(~450nm)から成る。励起後 80 ピコ秒程度経過すると、600nm 付近に反応

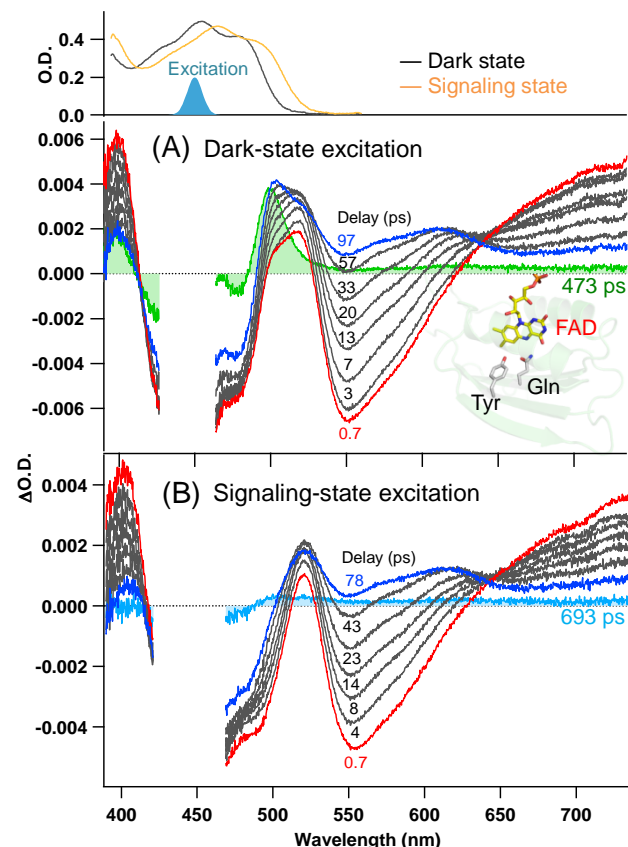


Figure 1. Steady-state absorption and transient absorption spectra of dark state (A) and signaling state (B) of PapB

中間体由来の新たな吸収成分が、暗状態とシグナル状態のどちらを励起しても観測できる。暗状態の励起で最終的に得られるのは、シグナル状態の生成を示す分散型のスペクトル(緑:元のスペクトルからの赤方シフトによる)である。それに対して、シグナル状態を励起した場合は新たな最終生成物は見られず、長寿命のオフセット(水色)のみ観測される。

図 2 は暗状態励起後の過渡吸収スペクトル(遅延時間: 73ps)に対し、特異値分解を利用して行ったスペクトル分割の例である。どの遅延時間においても過渡スペクトルは  $S_1$  状態、反応中間体、およびシグナル状態の3つのスペクトルの和で再現することができ、得られたスペクトル形状から反応中間体は  $FADH\cdot$  ラジカル( $FADH\cdot$ )に同定された。シグナル状態を励起した場合の過渡スペクトルは、 $S_1$  状態と  $FADH\cdot$  のスペクトルに長寿命オフセットを加えて同様に分割をすることができた。

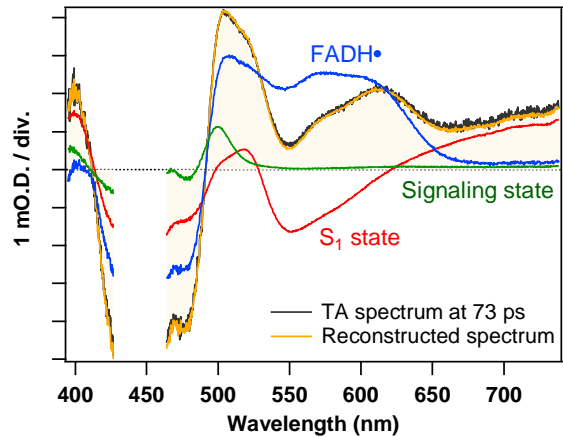


Figure 2. Decomposition of transient absorption spectrum

スペクトル分割から得られた  $S_1$  状態、 $FADH\cdot$  およびシグナル状態の時間プロファイルを図 3A に示す。PapB の  $S_1$  状態は 2 段階で減衰する。そのため、反応プロセスの解析には 2 状態を想定し、PapB のシグナル状態が  $FADH\cdot$  を経由して生成する反応モデル(図 3B)を用いた。モデルに基づくフィットはよく実験結果を再現する。また、図 3A にはシグナル状態を励起することで得た  $S_1$  状態と  $FADH\cdot$  の時間プロファイルを重ねて示している。暗状態およびシグナル状態のどちらを励起しても  $S_1$  状態と  $FADH\cdot$  の時間挙動に変化がないことが分かる。

現在のところ藍藻 *Synechocystis* 由来の BLUF タンパク質 PixD でのみ、反応中間体としての  $FADH\cdot$  が報告されている。以来、BLUF タンパク質のシグナル状態生成には  $FADH\cdot$  に誘起される発色団周りの水素結合変化が提案されてきた。 $FADH\cdot$  の生成・減衰にはプロトン移動が関与するため、 $FADH\cdot$  の時間挙動は発色団周りの水素結合構造を反映して変化するはずである。しかし、PapB の実験結果は、シグナル状態になっても  $FADH\cdot$  の生成・減衰に関わるプロトン移動速度が変わらないことを意味しており、従来のメカニズムを再考するの必要を示唆している。発表では、新たに行った PixD のシグナル状態の過渡吸収結果とも比較をして、PapB での観測の一般性について考察する。そして新しいシグナル状態生成メカニズムを検討する。

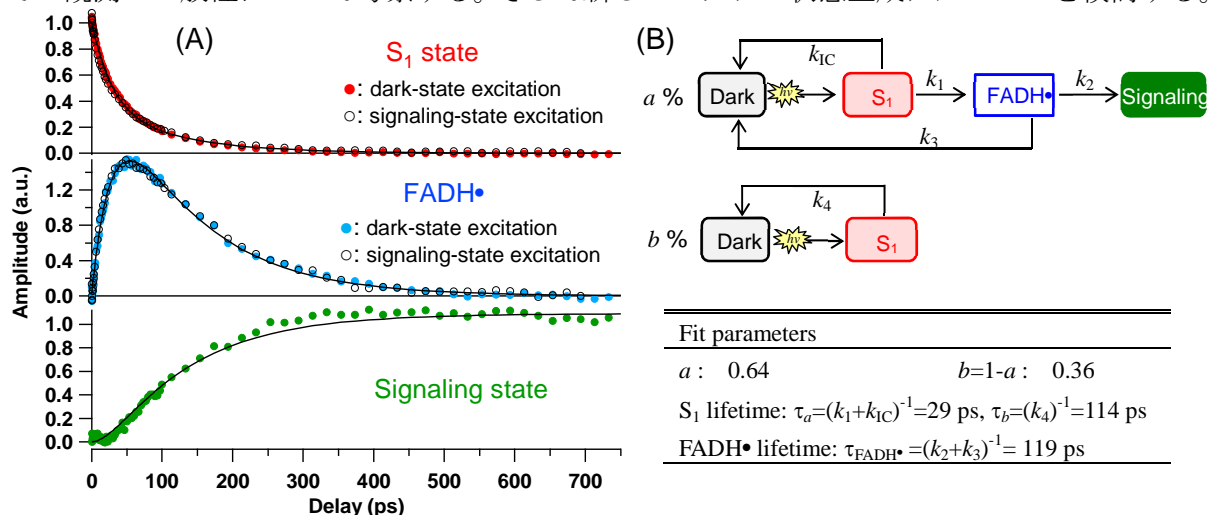


Figure 3. Kinetic analysis. (A) Time profiles and fit curves of  $S_1$  state,  $FADH\cdot$  and signaling state after exciting dark state (colored) and signaling state (black). (B) Reaction model for PapB. Fit parameters are listed on the table.