

## 光センサーBLUFドメインの光反応：遅い吸収変化の由来

京大院理

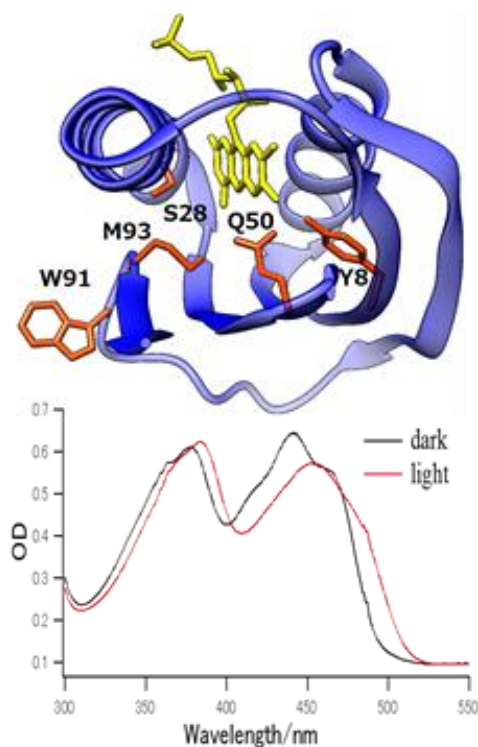
○小野瀬 森彦, 中曾根 祐介, 柴田 耕生, 寺嶋 正秀

### Photochemistry of BLUF Photoreceptor Domain : Source of Slow Absorption Change

○Morihiro Onose, Yusuke Nakasone, Kosei Shibata, Masahide Terazima  
*Department of Chemistry, Kyoto University, Japan*

**【Abstract】** BLUF(blue light sensor using FAD) is a flavin binding photoreceptor domain that light dependently controls protein-protein interaction or enzyme activity. The light induced formation of signaling state of BLUF is characterized by ~10 nm redshift of flavin absorption spectrum. Ultrafast spectroscopies have revealed that the redshift occurs within 1 ns upon photoexcitation, which involves rearrangements of hydrogen bonding network around the chromophore and key residues Y8 and Q50[1]. A previous work has reported that a BLUF protein AppA shows a weak change of absorption with a time constant of 5 ms in addition to the ultrafast reaction [2]. Interestingly, however, it is widely accepted that the photochemistry of chromophore is completed within 1 ns for BLUF proteins and nobody has investigated the origin of the relatively slow reaction phase. Here, we study the photoreaction of chromophore using a transient absorption technique and revealed that the reaction phase observed in millisecond time scale is common process for all BLUF proteins studied in this study (SyPixD, TePixD, BlrP1, PapB and OaPAC), though the signal intensities and time constants have diversity among different proteins. To identify the key residues for the slow kinetics, we prepared several mutants for SyPixD (S28T, W91A and M93A) and found that the S28 and W91 are related to the process.

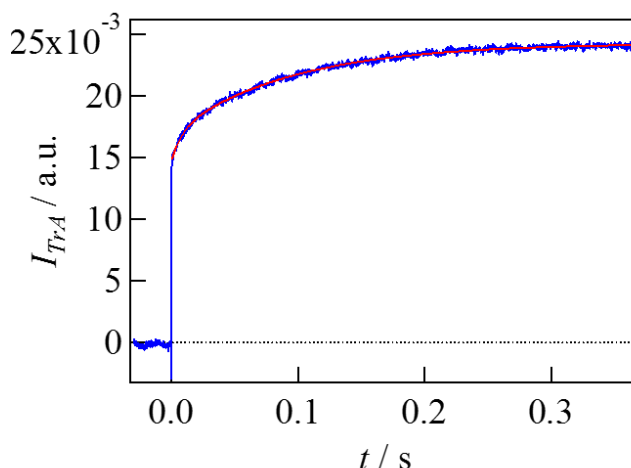
**【序】** 青色光センサードメイン BLUF(blue light sensor using FAD)はフラビンを発色団として持ち (Fig.1 上)、光依存的にタンパク質間相互作用や酵素ドメインの活性を制御する。BLUF のシグナル伝達状態はフラビンの吸収スペクトルのレッドシフトで特徴づけられる (Fig.1 下)。その生成過程についてこれまで超高速分光を用いた研究が多数なされ、光励起後 1 ns 以内に発色団と近傍に位置するアミノ酸残基 Y8、Q50 との間で水素結合ネットワークが変化することが報告されている[1]。一方、光励起後 5 ミリ秒の時定数でさらなる吸収スペクトル変化を起こすことがBLUFタンパク質 AppA の研究で報告されているが[2]、その詳細に迫った研究例はなく、発色団周りの反応は 1 ns 以内に完了するという見解が広く浸透している。本研究では過渡吸収法によりミリ秒の反応がBLUFタンパク質に共通した過程であることを調べた。また、その由来を変異導入によって探索した。



**Fig. 1.** Structure of BLUF of SyPixD (top) and its absorption spectra (bottom).

**【方法】** 大腸菌に発現させた BLUF タンパク質 SyPixD(WT, S28T, M93A, W91A)、TePixD、BlrP1、PapB、OaPAC を精製し、濃度を 200  $\mu$ M に調整して過渡吸収測定を行った。励起光には 462 nm のナノ秒パルスレーザーを、プローブ光には青色 LED とロングパスフィルターを組み合わせ 500 nm 付近の連続光を用いた。

**【結果・考察】** 青色パルス励起により、すべてのサンプルで測定システムの応答時間内 (~10 ns) に測定波長における吸収の増大が観測された。これは 1ns 以下で起こる反応に由来する。また Fig.3 に示すようにミリ秒以降にも吸収の増大が観測され、AppA 同様に遅いダイナミクスの存在が明らかになった。その信号強度や時定数はタンパク質ごとに異なり、SyPixD、PapB、OaPAC では 2 指数関数で、TePixD、BlrP1 では 1 指数関数で再現できた。ミリ秒以降の反応の時定数および超高速過程に対する遅い成分の吸収変化量の比を Table.1 にまとめる。



**Fig. 2.** Transient absorption of WT SyPixD.

SyPixD や TePixD はミリ秒以降の時間スケールで複合体の解離反応が起こることが報告されている。この反応と今回捉えた吸収変化の速度が近いこと

から、シグナル伝達に関わる重要な反応を吸収変化として捉えたと考えられる。他の BLUF タンパク質についても遅い吸収変化成分が良く保存されていることから、BLUF タンパク質に共通する反応であり、機能に重要な過程と予想される。

続いて特に遅い過程の信号強度が強かった SyPixD に変異を導入し、ミリ秒の反応への影響を調べた。タンパク質機能に重要な M93 および結晶中で M93 と同期してコンフォメーション変化を起こす S28、W91 を変異導入対象として選択した。S28T、W91A、M93A のいずれの変異体も野生型よりも遅い反応の信号強度が弱かったが、特に S28T、W91A で顕著な効果が観測された。1 ns 以内の反応には関与しないとされている S28 や発色団と直接相互作用していない W91 の変異が強い影響を持つことは大変興味深い。ただし、W91A はタンパク質機能には影響を与えないと報告されているため、遅い反応の信号強度が減少したと機能が低下することは同義ではないのかもしれない。現在、追加で変異体の測定を行っており、遅い吸収変化の由来および信号伝達における意義を議論する。

**Table 1.** Time constant of transient absorption change of millisecond time scale.

	$k1 / s^{-1}$	k1 amplitude / total intensity	$k2 / s^{-1}$	k2 amplitude / total intensity
<b>TePixD</b>	<b>254±42</b>	<b>0.04</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
<b>BlrP1</b>	<b>352±19</b>	<b>0.17</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
<b>PapB</b>	<b>532±85</b>	<b>0.12</b>	<b>33.7±6.8</b>	<b>0.11</b>
<b>OaPAC</b>	<b>322±17</b>	<b>0.04</b>	<b>17.7±0.04</b>	<b>0.35</b>
<b>SyPixD</b>	<b>123±6.4</b>	<b>0.09</b>	<b>10.7±0.1</b>	<b>0.30</b>
<b>SyPixD(M93A)</b>	<b>585±92</b>	<b>0.06</b>	<b>32.7±1.1</b>	<b>0.14</b>
<b>SyPixD(S28T)</b>	<b>385±32</b>	<b>0.18</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
<b>SyPixD(W91A)</b>	<b>397±29</b>	<b>0.10</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>

**【参考文献】** [1] K. S. Conrad, *et al. Nat. Chem. Biol.* **10**, 801–9(2014) [2] B. Kraft, *et al. Biochemistry.* **42**, 6726–34(2003)