

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370069

研究課題名（和文）

ラジカル対機構がもたらす青色光受容センサータンパク質の動作原理の解明

研究課題名（英文）

Function of the photo-induced triplet radical pair in the photo-sensor BLUF protein

研究代表者

三野 広幸 (MINO Hiroyuki)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：70300902

研究成果の概要（和文）：

電子スピン共鳴 (ESR) 法により青色光センサータンパク質 BLUF の構造機能解析を行った。光励起に伴い BLUF において FADH $\cdot$ -Tyr $\cdot$  ラジカル対が生成する。パルス ESR 法によりこのスピンの特性を調べた結果、ラジカル対が  $S=1$  の完全な三重項状態であることがわかった。また、緩和時間の温度依存性を解析することによりスピン間の相互作用の大きさ  $2J = 6$  to  $8$   $\text{cm}^{-1}$  が求められた。更にラジカル間相互作用を決定し磁氣的構造を明らかにすることによってタンパク質 2 量体の構造を明らかにした。加えて時間分解 ESR 法を用いてラジカル対生成の反応過程を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

A photo-induced radical pair of FADH $\cdot$  and Y8 $\cdot$  in BLUF protein SyPixD was studied by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. The EPR signal has been characterized by a Pake doublet signal with complete  $S = 1$  spin state. The temperature dependence of the spin-lattice relaxation of the radical pair of flavin and tyrosine in SyPixD was investigated by pulsed electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Based on the temperature dependence of spin-lattice relaxation time  $T_1$ , the exchange coupling of the radical pair was estimated as  $2J = 6$  to  $8$   $\text{cm}^{-1}$ , defined as  $-2JS_1 \cdot S_2$ .

The radical pair was utilized as a probe to analyze the oligomer of SyPixD. The relative arrangement of PixD proteins in the complex was investigated by pulsed electron-electron double resonance (PELDOR) with the orientation selection. Based on the decameric structure in the crystal, the possible structure for the PELDOR results was evaluated.

The transient EPR measurements have been performed to investigate the reaction pathway to produce radical-pair. The results show that the radical-pair was produced in the range of 200-263 K. The possible reaction mechanism was proposed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：光生物

## 1. 研究開始当初の背景

BLUF ドメインはフラビンアデニンヌクレオチド（フラビン、FAD）を発色団とする新規に発見されたタンパク質である。シアノバクテリアの走行性を制御する PixD, 光合成遺伝子を制御する APPA, ミドリムシにおける PAC, 大腸菌の YcgF などが見つかっている。同じくフラビンを受容体としてもつタンパク質にクリプトクロム、フォトトロピンなどが知られているが一次構造上の相同性はない。レチナールやクマル酸を発色団としてもつロドプシンや PYP 等の光受容体では、発色団の異性化が引き金となりタンパク質の構造変化を引き起こされる。これに対し、BLUF においてどのような構造変化がおこり、センサー信号情報の伝達を引き起こされるのかに関心が集まっている。これまで結晶構造解析をはじめ光吸収スペクトル、ラマン、赤外分光などの分光学的手法により研究が進められている。BLUF の光サイクル反応モデルは次のようなものである。基底状態 *D* で光受容後反応中間状態 *I*, *J* を経てシグナリング状態といわれる *F* 状態へ遷移する。光吸収スペクトルが長波長シフトをおこすことから *F* 状態を Red shift state と呼んでいる。*D* 状態から *F* 状態への遷移は室温ではピコ秒である。FAD 周辺の局所構造を大まかに見ればフォトトロピンの結合環境 (LOV ドメイン) と類似である。FTIR などの研究により Red shift に深く関与するのは FAD 近傍の Gln 残基であり、水素結合の強度変化が長波長シフトの原因と考えられている。AppA において提唱されている反応メカニズムによれば *F* 状態形成は FAD と近傍 Tyr 残基の間で電子移動がおこりラジカル対を形成することが直接の引き金になるとされている。

## 2. 研究の目的

光センサータンパク質の研究にこれまで ESR 法はほとんど使われていない。Advanced ESR 法では生成したラジカルを直接とらえ生成ラジカル周辺の構造変化を選択的にとらえ、プロトン移動の様子をとらえることができる。全般的にみても、ESR を用いた光センサータンパク質の研究はまだ行われていないが ESR 法を用いたセンサータンパク質研究のモデルケースとして提唱することができる。また advanced ESR 法では局所構造だけでなく 50–100 Å の長距離間相互作用を精度よくとらえタンパク質同士の相互作用をとらえ

ることができるため、タンパク質間の相互作用を検出し、複合体、会合体としての構造変化をとらえることによりセンサー情報の伝達機構を明らかにすることができる。

“ラジカル対”という言葉は単に電子移動により2つのラジカルが生成することを意味してはいない。これは物理化学の中でスピン化学を最もよく特徴づけるキーワードでもある。ラジカル対機構による反応制御をタンパク質研究に適用した例はない。タンパク質内の反応課程におけるラジカル対機構の働きを明らかにすることは今後のタンパク質の反応研究に価値がある。

## 3. 研究の方法

パルス ESR 法はラジカル周辺の局所構造や化学的性質を詳細に調べることができる。また局所構造だけでなく 50–100 Å の長距離間相互作用を精度よくとらえタンパク質同士の相互作用をとらえることができる。特に PELDOR 法と呼ばれる手法をもちいてタンパク質間の相互作用を検出し、複合体、会合体としての構造変化をとらえることによりセンサー情報の伝達機構を明らかにすることができる。

また、時間分解 ESR 法を用いて PixD の生理条件下での反応を明らかにする。

これまでとらえたチロシン-フラビンのラジカル対は、実際には低温光照射などによる静的状態での信号の捕捉であるため、生理条件下での反応機構との関連を精査する必要がある。生理条件下でのラジカル対を捕捉し、反応機構を明らかにする。

本計画では高速アンプとストレージオシロスコープを用いて早い時間領域での時間分解 ESR スペクトルの観測を行う。室温で観測を行い、ESR 信号を観測し、静的状態で観測された ESR 信号と比較することにより光反応直後の熱平衡状態に到達する以前のアクティブな状態でのタンパク質の局所構造を明らかにする。

## 4. 研究成果

我々は BLUF タンパク質由来の ESR 信号の捕捉にはじめて成功している。この信号の解析から以下のことが明らかになっている。①光照射により極めて近い位置に2つのラジカルが生成する。②2つのラジカルはフラビンラジカルとチロシンラジカルである。③このラジカル対は既存のモデルで提唱されている光サイクルの中にはなく Red shift (*F*) 状態に光照射することによって生成する。④フラビンラジカル、チロ

シンラジカルともに電荷をもたない中性ラジカルである。極めて近傍の位置での相互作用であることを意味する分離幅の非常に大きなこの ESR 信号は物性物理から、化学や生物までみまわしても極めて珍しい例である。これまでの唯一の報告例は申請者らが光合成タンパク質光化学系 II の酸素発生クラスター近傍で申請者らが見つけたものである。そこではチロシン残基 (Y<sub>2</sub>) とヒスチジン残基の間の相互作用として類似の ESR 信号の観測に成功している。この場合光合成水分解 (酸素発生) 反応に付随するプロトン運搬に関与すると考えられ、プロトン移動により中性ラジカルとなると考えられる。この類推から、BLUF におけるフラビンとチロシン間のラジカル形成もプロトン輸送に付随したメカニズムであることを示唆している。

本計画の目的はセンサー機構におけるフラビン-チロシンラジカル対の役割を明らかにすることにある。そのためフラビン-チロシンラジカル対の物理化学的機構を明らかにする必要がある。ESR で検出されたラジカル対は既存モデルの光サイクルにはない。しかし我々は寿命の比較的長い新しいラジカル対状態がセンシングに関与している可能性が高いと考えている。

フラビン-チロシン ESR 信号を 200K の光照射により生成し低温にすることによりラジカル対を補足することができた。パルス ESR 法は短時間のマイクロ波パルスを磁場中のラジカルに照射することにより変化する磁化の応答を観測する手法である。磁化の応答を観測することによりスピンの大きさを決定することができる。その結果、ラジカル対は完全な 3 重項状態  $S=1$  をつくることを見出した。一般的なラジカル対の場合  $S=1/2$  どちらの相互作用であり、相互作用をしても  $S=1/2$  からわずかにずれる程度である。しかし、実験結果は完全な 3 重項状態であり、異常に大きな相互作用があることを示している。これは 2 つの分子の電子軌道が強くまじりあっていることを示している。このまじりあいの度合いは通常交換相互作用  $J$  で表わされる。そこで  $J$  の大きさを定量的に見積もる必要がある。そのためスピン-格子緩和時間の温度依存性の測定を試みた。スピン-格子緩和時間はスピン系から外部の熱浴へのエネルギーの散逸を表す。通常ラマン過程と呼ばれるエネルギーがフォトンとなり散逸する機構が考えられる。しかし、3 重項であれば 1 重項の準位間に熱分布があるためにラマンからは外れる。それを利用して  $J$  の測定を行った。実験結果からエネルギーの散逸過程は Orbach 過程と呼ばれる機構であることが明らかになった。

これにより  $J$  の大きさは  $2J = 6 \text{ to } 8 \text{ cm}^{-1}$  と求められた。得られた  $J$  の値は非常に大きくかつて報告例はない。また符号も決定でき、ラジカル対の結合様式が明らかになった。

PixD は光を受容してその情報を外部に伝えるため、10 量体が分解して 2 量体になり PixE タンパク質に情報を伝えるというモデルが提唱されている。この構造変化を明らかにするために 2 量体の結合様式を調べた。パルス電子-電子に重共鳴法

(PELDOR) はラジカル間距離を正確に求めつことができるすぐれた手法である。この手法をラジカル対信号に適用し異なったタンパク質上のラジカル対間で PELDOR 測定を行った。ラジカル対は空間での異方性が強く、また  $S=1$  をもっているので特殊な条件下での測定であったが、理論計算を駆使してタンパク質 2 量体間の相対的な配置を決定することができた。

10 量体についても測定は行っており、これは現在雑誌投稿準備中である。

高温領域での  $\text{FADH} \cdot \cdot \text{Y8} \cdot$  ラジカルの生成、減衰を時間分解 ESR 法によって捕らえ、ラジカル生成の機能解明を試みた。SyPixD に 10~250 K でレーザーによるパルス光を与える事で、光励起してその後減衰する時間分解 ESR スペクトルが得られた。結果は以下の通りである。

200 K でのスペクトルは 240 ns の時定数で減衰し、スペクトルの磁場依存性をとると、75 G の分離幅を持つ一対の信号が得られた。この分離幅は CW ESR 測定から得られる分離幅と同じであり、線形から  $\text{FADH} \cdot \cdot \text{Y8} \cdot$  ラジカルに由来すると考えられる。また時間分解スペクトルの磁場依存性の線形から、励起された  $\text{FAD}^*$  がトリプレット  $\text{FADT}$  になり、トリプレットから Y8 に電子移動することにより、ラジカルペア  $\text{FADH} \cdot \cdot \text{Y8} \cdot$  が生成されることがわかった。更に基底状態 D と F 状態の時間分解 ESR 測定を 10 K で行った。安定な  $\text{FADH} \cdot \cdot \text{Y8} \cdot$  ラジカルは F 状態からのみの生成であったが、時間分解で生成した  $\text{FADH} \cdot \cdot \text{Y8} \cdot$  ラジカルは D と F 状態の両方から生成されることがわかった。これらの結果から、光反応の詳細を明らかにした。時間分解 ESR 法による結果は現在論文投稿準備中である。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Toru Kondo, Shinji Masuda and Hiroyuki Mino "Pulsed EPR analysis of the

photo-induced triplet radical pair in the BLUF protein SyPixD: Determination of the protein-protein distance and orientation in the oligomeric protein” Applied Magnetic Resonance (2011) 40, 545-555

DOI:10.1007/s00723-011-0237-1 (査読あり)

Toru Kondo, Shinji Masuda, Kazuhiko Tsutsui and Hiroyuki Mino “Temperature dependence of relaxation time of a stable radical pair in SyPixD investigated by pulsed EPR” Chemical Physics Letter (2011) 501, 528-533

DOI: 10.1016/j.cplett.2010.11.073 (査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

Asada, Y. Mutoh, R. Ishiura, M. and Mino H. Nonselective excitation of pulsed ELDOR using multi-frequency microwaves.

Rocky Mountain Conference July 24-28, 2011 Rocky Mountain Conference

浅田侑希、武藤梨沙、石浦正寛、三野広幸 “複数周波数マイクロ波発生装置を用いた電子電子二重共鳴法における非選択励起” 電子スピンスイエンズ学会 2011 年 11 月 16-18 日 仙台国際センター

近藤徹、増田真二、三野広幸 “青色光受容タンパク質 SyPixD で生成するラジカル対由来 doublet 信号の ESEEM 解析” Asia-Pacific EPR/ESR Symposium 2010 年 10 月 10-14 日 濟州島コンベンションセンター

三野広幸、近藤徹、筒井和彦、増田真二 “The formation of an radical pair FADH $\cdot$ -Y8 $\cdot$  in SyPixD investigated by pulsed and transient EPR” 2010 年 9 月 20-22 日 東北大学

近藤徹、増田真二、三野広幸 “ESEEM studies of the doublet signal with spin S = 1 in the blue light sensor BLUF protein SyPixD” 日本生物物理学会年会 2010 年 9 月 20-22 日 東北大学

筒井和彦、近藤徹、増田真二、三野広幸 “時間分解ESR法による青色センサータンパク質SyPixDの光反応過程の解析” 第3回分子科学討論会、名古屋大学、2009年9月21-24日

近藤徹、筒井和彦、増田真二、三野広幸、PELDOR 法による青色光センサータンパク質 SyPixD 重合体のタンパク間相互作用の解析、第3回分子科学討論会、名古屋大学、2009年9月21-24日

近藤徹、筒井和彦、増田真二、三野広幸、 “PELDOR analysis of the protein-protein interaction in the blue light sensor BLUF protein SyPixD” 日本生物物理学会年会、徳島、2009年10月30日-11月1日

筒井和彦、近藤徹、増田真二、三野広幸: "Time resolved EPR study of light reaction processes in blue light sensing protein SyPixD"日本生物物理学会年会、徳島、2009年10月30日-11月1日

近藤徹、筒井和彦、増田真二、三野広幸、PELDOR 法による青色光センサータンパク質 SyPixD 重合体のタンパク間相互作用の解析、第48回電子スピンスイエンズ学会年会、神戸大学、2009年11月10-12日

筒井和彦、近藤徹、増田真二、三野広幸: "時間分解 ESR 法による青色センサータンパク質 SyPixD の光反応過程の解析"第48回電子スピンスイエンズ学会年会、神戸大学、2009年11月10-12日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[www.glab.phys.nagoya-u.ac.jp](http://www.glab.phys.nagoya-u.ac.jp)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三野広幸 (MINO Hiroyuki)

研究者番号: 70300902

### (2) 研究分担者

小野高明 (ONO Takaaki)

研究者番号: 10175268

増田真二 (MASUDA Shinji)

研究者番号: 30373369