

氏 名 伊藤 慎治

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 980 号

学位授与の日付 平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 先導科学研究科 光科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Studies on the Flavin-binding Domains of a Blue-light
Photoreceptor,photoactivated Adenylyl Cyclase(PAC),in
Euglena gracilis

論文審査委員 主 査 教授 北川 禎三
教授 石黒 真木夫
教授 渡辺 正勝
教授 徳富 哲（大阪府立大学）

論文内容の要旨

Photoactivated adenylyl cyclase (PAC) is a recently discovered blue-light photoreceptor that mediates photomovement in *Euglena gracilis* (Iseki *et al.*, 2002, *Nature*, 415, 1047-1051). PAC shows adenylyl cyclase activity, *i.e.* synthesis of cAMP, which is activated by irradiation of UV-A and blue-light, and is responsible for photocontrol of flagellar movement. This unique character attracts my special interests in its molecular mechanism. PAC appears to be a heterotetramer composed of subunits (PAC α and PAC β , each with a pair of homologous two FAD-binding regions (F1 and F2) which show homology with prokaryotic “sensors of blue-light using FAD” (BLUF) domains. Since the F1 and F2 of PAC are putative blue-light sensing domains, they should play important roles in the photoactivation of PAC via some interaction of its catalytic domains (C1 and C2). Therefore their characterization must throw “light” on the mechanism of PAC’s photoactivation. Moreover, they are the only eukaryotic BLUF domains thus far found except for the very recently found one in a fungus, *Ustilago*, whereas many prokaryotic ones have been known. Whereas the initial characterization of PAC has been done only on native samples, *i.e.* the whole molecule as $\alpha_2\beta_2$ heterotetramer as biochemically purified from *Euglena* cells, this study has employed its heterorogously expressed BLUF domains, to clarify the mechanism of the activation of PAC.

I obtained soluble recombinant F1 and F2 proteins in PAC by heterologous expression with fused glutathione-S-transferase (GST) using *Escherichia coli* (*E. coli*) expression system. The expressed F2 samples contained oxidized-flavins, FAD and FMN with trace

amounts of riboflavin, whereas the expressed F1 samples did not bind flavins. The assembly of the histidine-tagged recombinant F2 from inclusion bodies in *E. coli* also gave the soluble F2 binding exogenous oxidized-FAD or -FMN. These suggested that PAC α F2 and PAC β F2 can bind not only FAD but also another flavins, although they are putative FAD-binding domains in native PACs. These F2 samples displayed blue-light-induced photocycles (transient red-shifts in absorption spectra), which were essentially similar to those reported for prokaryotic BLUF domains. The photocycles of the recombinant PAC α F2 samples had ca. 20-30 times higher sensitivity than those of PAC β F2 samples, based on threshold values of their photon-fluence response curves. This suggests that PAC α F2 and PAC β F2 may have different roles in terms of light sensitivity in photosensing in PAC. The FAD- or FMN-assembled 6His-PAC α F2 exhibited nearly the same photocycles, suggesting that the adenine-ring of FAD does not have important roles in it. The estimated quantum efficiency for the phototransformation was 0.28-0.32, and the half-life in dark-relaxation was 34-44 s at 25 °C for the recombinant PAC α F2, whereas those for the recombinant PAC β F2 were 0.058-0.084 and 3.4-4.8 s, respectively. These half-life values are still closer to that of cyanobacterial BLUF domains than that of purple bacterial one. Such relatively short recovery times of PAC α F2 and PAC β F2 may be needed for maintenance of the photomovement responses. The mutated recombinant Y472F and Q514G of PAC α F2 and the F2 domain of the PAC α homologue from *Eutreptiella gymnastica* which lacks the Gln residue conserved in other BLUF domains showed no photoinduced transformation. This shows that F2 has the same protein structure based on its

spectrophotometric characterization as prokaryotic BLUF domains.

Hence I succeeded in preparing the soluble recombinant F1 and F2 samples by combination of heterologous expression with fused GST using *E. coli* expression system and biochemical assemblage of His-tagged F2 with exogenous flavins. I found that the latter could bind not only FAD but also another flavins. The recombinant PAC α F2 and PAC β F2 samples showed the essentially same spectrophotometric characterization as those of prokaryotic BLUF domains. Their half-life values were closer to that of cyanobacterial BLUF domains [Slr1694 (~11 s) and Tll0078 (~3.5 s)], rather than that of the purple bacterial BLUF domain [AppA (600 s)]. These are the first spectrophotometric characterization of the eukaryotic BLUF domains and have provided sound basis for further understanding of its interaction with the PAC catalytic domains. And also, this information will be helpful in characterization of another eukaryotic BLUF domain. Moreover, the recombinant PAC α F2 and PAC β F2 samples showed the blue-light-induced photocycles with different sensitivities, quantum efficiencies and half-life values in dark-relaxation, indicating that different functions of PAC α and PAC β in the activation of PAC.

(論文審査結果)

出願された博士論文は、「真核単細胞鞭毛藻ミドリムシの光活性化アデニル酸シクラーゼ(PAC)の青色光信号捕獲領域であるフラビン結合ドメインの研究」と題する英文 108 頁の論文である。PAC はミドリムシの光運動反応を司るユニークな生体青色光センサー分子であり、本論文はその光化学的変化を反応速度論的に解析した実験研究の成果をまとめたものである。PAC は α と β の2種類のサブユニットから成り、それぞれがフラビン結合ドメイン(F)と酵素活性ドメイン(C)が交互に配列したF1-C1-F2-C2の構造をもつ。本研究では、青色光信号の照射によって引き起こされるFドメインの吸収スペクトルの長波長シフトと、暗黒下におけるその吸収変化の回復過程(光反応サイクル)に着目した。 α と β の2つのサブユニット由来のFドメインサンプルを発現系で用意し、それを用いて詳細な比較検討を行った。本研究の最も重要な発見は、F2ドメインの光感度や量子収率、さらに暗回復の半減期が α と β の2つのサブユニットで大きく異なり、その間の機能分化が示唆されたことである。この知見を頂点とする研究が次の3つの段階に分けて詳しく述べられている。

(1) Fドメインサンプルの発現条件の確立：PAC はミドリムシ細胞中に存在するフラビン蛋白質であるが、分光学的測定に必要な量を抽出・精製することは極めて困難であり、また、大腸菌の細胞内で発現させて可溶画分として抽出・精製することも極めて困難であるが、Fドメインの可溶的発現を目指して種々の条件を粘り強く検討し、GST(グルタチオン S トランスフェラーゼ)融合蛋白質法による最適条件を見出す事に成功し、含有フラビン種の分析や分光学的測定への突破口を開いた。(2) Fドメインサンプルの再構成条件の確立：上記によって得られたFドメインサンプルは予想された光反応サイクルを示したが、ミドリムシから抽出・精製された本来のPACがフラビン種としてFADのみを含むのに対して、本品はFAD, FMN、さらには微量だがリボフラビンをも結合していることが明らかとなったので、単一種類のフラビンを結合したサンプルを調製してその光化学サイクルを比較・解析する必要が生じた。このために、サンプルをいったんグアニジンで変成させてから単一のフラビン種の共存下でグアニジンを希釈することによりFドメインを再構成することを試み、希釈速度等、種々の条件を最適化して成功した。(3) 各種Fドメインサンプルの光反応サイクル特性の比較：上記のようにして得られた各種のFドメインサンプルについて、光反応サイクル速度を種々の青色光強度のもとに測定・解析して、量子収率・暗反応半減期・光強度閾値等を得た。これらの結果、大腸菌で発現させたF1ドメインにはフラビンが結合しないこと；F2ドメインは紅色光合成細菌や藍色細菌などの類似ドメインと本質的には同様の光反応サイクル特性を示したが、暗期回復反応の半減期は前者よりも後者に近いこと； α サブユニットと β サブユニットのF2ドメインを比較すると後者は光感度・量子収率とも前者より1桁ほど低く、また半減期は1桁ほど短かった。これらの結果と分子系統解析の結果を総合して考察すると、 α F2と β F2は、その起源は相当異なり、またその機能は前者は弱光の比較的ゆっくりした感受、後者は強光の比較的素早い感受を受け持っていることが示唆された。

本論文は、国際的に注目されている光センサーフラビン蛋白酵素であるPACの光信号捕獲ドメインのフラビン結合ドメインF2について、困難なサンプル調製法の確立から始めて、新規性の高いいくつかの発見を行っており、その現象の解析についても詳しい議論がなされ、それをわかりやすい英語で説明したものである。その成果の一部はすでに光化学・光生物学の国際的コアジャーナルであるPhotochemical and Photobiological Sciences誌に発表されている。以上のことから、本論文の内容は博士論文として十分であると判断した。