

氏名	じき はら かず のり 直 原 一 徳
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3121 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 生 理 系 専 攻
学位論文題目	Photoreaction cycle of LOV domain in FKF1 determined by low-temperature absorption spectroscopy (低温吸収分光法によって決定された FKF1 タンパクにおける LOV ドメインの光反応サイクル)
論文調査委員	(主 査) 教 授 上 杉 志 成 教 授 松 本 智 裕 教 授 小 松 賢 志

論 文 内 容 の 要 旨

ビタミン B2 (リボフラビン) の誘導体を補酵素として結合しているタンパク (フラボタンパク) はヒトから細菌に至るまで、生物界に広く存在している。フラボタンパクは外部の状態に反応して、結合しているフラビンの酸化還元状態が変化する。フラボタンパクは生体内において重要な情報伝達因子として機能している例が多い。しかし、タンパク内のフラビンの酸化還元における、電子およびプロトン移動の詳細については、まだ明らかになっていない部分も多い。外部からの情報としては細胞内の酸素濃度 (酸化還元状態)、pH、光刺激などがある。中でも光刺激にตอบสนองするタンパク (光受容タンパク) は反応解析に向いており、近年、盛んに研究が行われている。

本研究では、補酵素として flavin-mononucleotide (FMN) が非共有的に結合している LOV (Light, Oxygen, Voltage-sensing) ドメインの光反応の詳細を明らかにした。LOV ドメインは青色光を吸収することで、暗状態 (D450) から励起三重項中間体 (L660) を経て、S390 と呼ばれるドメインに保存された Cys のチオール基と FMN のフラビン環の炭素 (C4a) が共有結合した中間体を形成する。生体内では S390 が光情報を伝達する状態であると考えられている。この S390 状態を形成する過程では、光還元された FMN と Cys のラジカル対の存在が予測されていたが、どのような状態のラジカルであるかは明らかになっていなかった。FMN のラジカル状態にはアニオンラジカル、中性ラジカル、カチオンラジカルの 3 つの可能性があり、LOV ドメインが共有結合を形成する際どの状態を経由するかについては、これまで議論的であった。

そこで今回、*Arabidopsis* の FKF1 タンパクの LOV ドメインの光反応を解析した。低温紫外可視分光法を用いた測定から、150K よりも低温領域で S390 とは別の光反応生成物 (Z370) を検出した。スペクトルの解析より、Z370 は FMN のアニオンラジカルであることが判った。ところが、S390 形成が Z370 形成よりも先行していることや、低温光反応で検出された Z370 は室温において D450 へと戻ることから、Z370 は D450 から S390 への中間体ではないと結論づけられた。Z370 は低温条件のため FMN と共有結合を形成できない位置で固定された Cys から、FMN の励起三重項状態において電子のみの移動により生じたラジカル対が、エネルギー緩和した状態ではないかと推測された。しかし、この結果より、LOV ドメインが光照射により共有結合を形成する過程では、まず電子の移動が先行し、FMN のアニオン状態と Cys のカチオン状態とのラジカル対が形成され、その後共有結合が形成されるという可能性が示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ビタミン B2 (リボフラビン) の誘導体を補酵素として結合しているタンパク (フラボタンパク) はヒトから細菌に至るまで、生物界に広く存在している。フラボタンパクは外部の状態に反応して、結合しているフラビンの酸化還元状態が変化する。しかし、その詳細について、まだ不明な点も多い。本研究では、補酵素として flavin-mononucleotide (FMN) が非共有的に結合している LOV (Light, Oxygen, Voltage-sensing) ドメインの反応を測定した。LOV ドメインは青色光の照

射により、ドメインに保存された Cys と FMN が共有結合した中間体を形成する。この過程では、光還元された FMN と Cys のラジカル対の存在が予測されていたが、その状態は議論的であった。今回、低温紫外可視分光法を用いた *Arabidopsis* の FKF1 タンパクの LOV ドメインの光反応の解析から、FMN のアニオンラジカル存在を突き止めた。これにより、LOV ドメインが光照射により共有結合を形成する過程では、まず電子の移動が先行し、FMN のアニオン状態と Cys のカチオン状態とのラジカル対が形成され、その後共有結合が形成されるという反応モデルを提唱した。

以上の研究は、フラボタンパク質の電子レベルにおける還元反応の解明に貢献し、ビタミン B2 誘導体の生体内酸化還元反応の研究発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成19年2月27日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。