

| | |
|----------|--|
| 氏名 | いの うえ けい いち 井 上 圭 一 |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (理 学) |
| 学位記番号 | 理 博 第 3147 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 | 理 学 研 究 科 化 学 専 攻 |
| 学位論文題目 | Studies on Signal Transduction Dynamics between Sensory Rhodopsin II and Transducer Protein (センサリーロドプシンIIとトランスデューサータンパク質間の信号伝達ダイナミクスの研究) |
| 論文調査委員 | (主 査) 教 授 寺 嶋 正 秀 教 授 加 藤 重 樹 教 授 竹 腰 清 乃 理 |

論 文 内 容 の 要 旨

古細菌の細胞膜中に存在するセンサリーロドプシン II (NpSRII) は、負の走光性をもたらすための光受容タンパク質である。青色光を吸収すると、その情報を同じ膜中に存在するトランスデューサータンパク質 (NpHtrII) に伝達し、最終的に細胞の鞭毛の回転運動を変化させることで、この走光性をもたらしている。本研究では、NpSRII と NpHtrII 間の信号伝達過程ダイナミクスを、時間分解分光法を用いて明らかにした。従来は、このような光受容タンパク質のダイナミクスは過渡吸収法などで調べられてきたが、本研究では、特に過渡回折格子 (TG) 法を用いることで、反応に伴うタンパク質分子のエンタルピー変化・体積変化や分子拡散係数を時間分解で測定し、NpSRII から NpHtrII への信号伝達過程を分子論的な観点から明らかにした。

野生型の NpSRII の光反応ダイナミクスでは、吸収スペクトルが始状態のものと大きく異なる K, L, M 中間体が同定されており、最後の中間体である O 中間体から約1秒の時間で始状態へと戻る、光サイクル反応を形成することが報告されていた。時間分解 TG 信号からも、この光サイクル反応が確認された。また、光励起された NpSRII から放出される熱エネルギーを TG 法で測定することにより、反応の初期段階に現れる L 中間体において比較的高いエンタルピー (170kJ/mol) を持っていることが、明らかになった。しかしこのタンパク質を NpHtrII の N 末端領域 (Δ NpHtrII) と結合した場合、その値が減少し (80kJ/mol) L 中間体の大きな安定化が起こっていることがわかった。これまで NpHtrII は主に光サイクルの比較的遅い時間領域において NpSRII と相互作用すると考えられていたが、今回の結果は、より早い時間領域において、すでに NpSRII と Δ NpHtrII との相互作用の影響が現れていることを示している。また、光反応の最後の中間体である O 中間体において、NpSRII のみの場合と比べて NpSRII- Δ NpHtrII 複合体の場合には $12 \pm 3 \text{ cm}^3/\text{mol}$ の体積膨張がみられ、これを NpSRII から信号を受け取り活性化されたことに対応する Δ NpHtrII 構造変化と同定した。このような Δ NpHtrII の構造変化を時間分解で捉えた例はなく、NpSRII による活性化ダイナミクスを考える上で今回の結果は非常に重要であると考えられる。

更に NpSRII の75番目のアミノ酸であるアスパラギン酸をアスパラギンに変えた D75N 変異体を用いてより詳細な研究を行った。この変異体では、反応途中における吸収変化が少なく、それに伴う屈折率変化が小さいため、タンパク質の構造変化による TG 信号をより詳しく観測することができると期待された。実際に、観測された信号から、D75N 部分が始状態に戻った後もサブ秒の時間領域まで Δ NpHtrII は構造変化を保持していることなどを明らかにすることに成功した。このことは、NpSRII 部分と Δ NpHtrII 部分の戻り過程は必ずしも一致しないことを示している。また D75N のみの場合と比較し、D75N- Δ NpHtrII 複合体では非常に複雑な信号の時間変化を示した。この信号の詳しい解析の結果、活性化状態における複合体の拡散定数が始状態のもの ($9.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) の半分程度 ($4.7 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) にまで減少することがわかった。TG 信号および拡散定数の濃度依存性測定などの結果から、これは NpSRII- Δ NpHtrII 複合体の構造変化によって引き起こされたものであることを結論した。このことより、特に Δ NpHtrII の C 末端領域の溶媒中に露出した部分 (HAMP 領

域)が構造変化し、数多くのアミノ酸残基が溶媒中に露出することで、溶媒分子と水素結合を形成したためにこうした拡散係数の変化を導いたものと示唆した。NpHtrIIの膜貫通領域と細胞質領域はこのHAMP領域を介して結ばれており、励起されたNpSRIIからの信号は膜貫通領域からHAMP領域を経て細胞質領域に伝達されと考えられているが、本研究により明らかにされた Δ NpHtrIIの構造変化過程はこの信号伝達過程に対応するものと考えられる。これにより、信号伝達過程に伴ったタンパク質骨格の大きな構造変化が時間分解で観測されることを、初めて明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本論文では、古細菌中で光に対する情報伝達を行うセンサリーロドプシンII (NpSRII)とトランスデューサータンパク質 (NpHtrII)の間の信号伝達ダイナミクスを、主に過渡回折格子 (TG)法を用いることで研究している。特にこれまでの過渡吸収法などでの分光手法では調べるのが困難であった、巨大タンパク質分子のグローバルな構造変化について着目し、信号伝達過程との関係について議論している。

まず論文中では、NpSRIIおよびNpSRIIとNpHtrIIの結合タンパク質を可溶化した溶液に対してのTG測定結果を報告している。その結果、NpHtrIIがNpSRIIに結合することによって信号の大きな変化が現れ、光反応ダイナミクスの違いが見られている。まず反応過程の比較的初期 (マイクロ秒程度)に現れるNpSRIIのL中間体においては、NpHtrIIが結合することにより、そのエンタルピーが減少し、一般に考えられているよりも早い時間領域でNpSRIIの光反応ダイナミクスへNpHtrIIの影響が現れていることが明らかになった。次に、信号伝達が行われると思われるミリ秒の時間領域ではNpHtrIIが結合することで、分子の体積変化過程に顕著な違いが現れた。それによると反応サイクルの最後の中間体であるO中間体において、NpHtrIIが存在する場合はNpSRIIのみで見られなかった余分な体積膨張があることが分かり、信号伝達に不可欠であると思われるNpHtrIIの構造変化を、時間分解測定によって明らかにしている。

次に申請者は、NpSRIIとNpHtrIIの信号伝達過程における、より詳細な構造変化を調べるために、吸収変化による屈折率変化の寄与が少ないNpSRIIのD75N変異体を作成し、TG測定によって得られた結果からそのダイナミクスについての詳細な議論を行っている。それによると、過渡吸収測定ではただ一つの中間体しか検出されないのに対し、TG法を用いることでエンタルピー変化および分子体積変化の時間変化を観測し、更に3つの中間体を同定している。またNpHtrIIが結合した場合は、NpHtrII部分の構造が異なると思われる中間体が、発色団部分が緩和した後の長時間領域において存在することを明らかにしている。D75NとNpHtrIIの複合体に対して最も興味深い結果として、本論文では、光反応途中における拡散定数の減少があることを明らかにしている。濃度変化測定などのさらなる実験結果から、この拡散定数変化は信号伝達過程において重要であると考えられているNpHtrIIのC末端領域に存在するHAMP領域における構造変化に対応していると結論付けられた。このようなNpSRIIとNpHtrIIの光反応における拡散定数の時間変化や、それに対応する構造変化の時間分解測定は、従来の研究では知られていなかった全く新しい結果であり、非常にオリジナリティがあり、かつNpSRIIとNpHtrIIの信号伝達過程を考える上で重要なものとなっている。

よって、本論文は博士 (理学)の学位論文として価値あるものであると認める。また論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格であると認めた。