

京都大学	博士 (理学)	氏名	高門 輝
論文題目	Studies on Reaction Dynamics and Interdomain/Intermolecular Interactions of LOV Light-sensor Proteins (LOV光センサータンパク質の反応ダイナミクスとドメイン間・分子間相互作用に関する研究)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>生物は種々の光センサータンパク質を持っており、光刺激されたタンパク質が分子内・分子間の構造変化を引き起こし信号伝達が行われている。本論文では、光センサータンパク質の一種であるLOVドメインを持つタンパク質の光反応ダイナミクスを明らかにしている。これまでに、LOVドメインを持つタンパク質の構造決定や定常状態測定は数多く行われているが、このタンパク質がドメイン間・分子間相互作用変化によって信号を伝達していく過程を時間分解でとらえた例は少なかった。本研究では過渡回折格子法 (TG法) を用いることで、phototropinとEL222の二つのタンパク質の反応機構を明らかにしている。</p> <p>Phototropinは植物の光屈性などに関わるタンパク質であり、LOVドメインの光反応がkinaseドメインのリン酸化活性を光依存的に制御している。これまでに、TG法などを用いて、LOVドメインやその付近の構造を含んだ試料の光反応ダイナミクスは測定されていた。しかし、LOVドメインからkinaseドメインまでを含む試料で、ドメイン間信号伝達のダイナミクスを時間分解検出した例はなかった。今回、LOVドメインからkinaseドメインまでを含む試料でTG測定を行うことでkinaseドメイン活性制御に伴う構造変化のダイナミクスを観測することに成功した。その結果、LOVドメインとkinaseドメインをつなぐリンカー構造の構造変化が律速となり、kinaseドメインの活性化反応が起こっていることが示唆された。またリンカー構造において、従来提唱されていたJαヘリックスだけでなく、そのC末端側の構造が光励起により構造変化していることが示唆された。</p> <p>次に、光依存的な転写制御に関係するタンパク質であるEL222タンパク質の反応研究を行っている。EL222はLOVドメインとDNA結合ドメイン(HTHドメイン)からなるタンパク質である。暗条件下ではEL222はDNAと結合しておらず単量体として存在しているが、光励起されると二量体構造でDNAと結合することが知られている。TG法によりこの分子集合のダイナミクスを検出した。まず初めにDNAを含まない試料でタンパク質単体での光反応を調べ、EL222の二量体化反応を検出することに成功した。またEL222全長構造の試料とLOVドメインだけを単離した試料での測定を比較することで、LOVドメインとHTHドメインのドメイン間相互作用変化により、二量体化反応が引き起こされることが示唆された。さらにEL222とDNAを混合した試料での測定により、DNA結合のダイナミクスを検出した。光励起されたEL222はまずDNAと結合した後で、二量体化反応を引き起こしていることが分かった。またDNA結合反応の反応速度を3種類の異なる結合親和性を持つDNA配列について測定することで、EL222のDNA配列認識機構についての研究を行った。その結果、DNA結合の反応速度はDNA配列に依存していないことが明らかになった。これはDNA結合強度の配列依存性は会合速度でなく解離速度の多様性によるものであることを示している。</p> <p>以上のように、TG法を用いて、LOVドメインを持つタンパク質の光励起によって引き起こされるドメイン間・分子間相互作用変化の反応ダイナミクスを明らかにした。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、過渡回折格子法(TG法)を用いて青色光センサータンパク質の光反応のダイナミクスを研究したものである。時間分解測定による反応ダイナミクスの研究は生体分子の信号伝達過程の解明において不可欠なものであるが、測定手法の制限によりこれまで十分には行われてきていなかった。本研究ではTG法を用いることにより、二種類のタンパク質についてそれらの反応ダイナミクスを検出することに成功している。測定が行われたタンパク質は、青色光センサーであるLOVドメインを持つタンパク質であり、光遺伝学への応用もされている。そのためこれらのタンパク質の光反応を研究することは、光遺伝学の発展に対しても重要な役割を持つと期待される。

本論文では、まず植物由来の光センサータンパク質であるphototropinの反応ダイナミクスが研究されている。Phototropinは広く研究が行われているタンパク質であるが、光励起されたLOVドメインが機能ドメインであるkinaseドメインへと信号伝達する過程を時間分解でとらえた例はなかった。本研究ではこの過程の反応ダイナミクスの測定に成功している。また二つのドメインをつなぐリンカー構造について、これまで発見されていなかった新たな構造変化の可能性を提唱している。

次に、本論文では細菌由来の光センサータンパク質であるEL222の光反応について研究が行われている。このタンパク質の分子集合のダイナミクスを明らかにするために、まずタンパク質単体での光反応のダイナミクスが研究された。全長タンパク質とLOVドメインのみを切り出した試料との測定結果を比較することにより、光励起により引き起こされる分子内構造変化が二量体化に重要であることが示されている。このときEL222はDNA非存在下では、低い反応収率で二量体化反応を引き起こすことが明らかにされた。またEL222とDNAとの混合試料での光反応を測定することにより、EL222とDNAの結合反応の時間分解測定に成功している。これによりEL222は、まず単量体構造でDNAと結合したのち、DNA上で二量体化していることが示された。さらにEL222のDNA結合反応速度のDNA配列への依存性を調べることにより、EL222がDNA配列を判別して結合する機構についての研究が行われている。EL222のDNA結合速度にはDNA配列の依存性が見られなかったことから、DNA配列認識は結合速度ではなく解離速度のDNA配列依存性により支配されていると結論されている。

以上のように本研究は二種類の光センサータンパク質について、それらの光反応のダイナミクスを明らかにしたものである。TG法を用いた測定によりタンパク質の分子内構造変化および分子間相互作用変化を時間分解で測定することに成功している。こうした反応ダイナミクスの研究は生体分子の信号伝達過程の解明に不可欠であり、本研究はこの点で有意義なものであると判断できる。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と認める。また、平成30年1月17日、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、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降