

学位論文の要約

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)

氏名 高門 輝

【1章 序論】

生物は種々のセンサータンパク質を持っており、外部刺激を感知したタンパク質の分子内・分子間の構造変化によって信号伝達が行われている。本研究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の測定を行った。LOV ドメインは多くの生物種の間で保存されている構造であり、青色光により励起され構造変化を起こす。LOV ドメインの構造決定や定常状態測定は数多く行われているが、光励起された光センサータンパク質がドメイン間・分子間相互作用の変化によって下流へと信号を伝達していく過程を実際に時間分解でとらえた例は少ない。我々は過渡回折格子 (TG) 法を用いることでこの分子内・分子間相互作用変化のダイナミクスを試みた。測定対象には phototropin と EL222 の二種の LOV タンパク質を用いた。

[Phototropin] phototropin は植物の光屈性などを制御するタンパク質であり、kinase ドメインの活性が LOV ドメインの光反応により制御されていることが分かっている。我々はこのドメイン間相互作用変化による光活性化過程の反応ダイナミクスを観測した。

[EL222] EL222 は基底状態（暗状態）では単量体で存在しているが、光励起により二量体構造で DNA と結合して転写反応を促進する。我々は、この分子間信号伝達の反応ダイナミクスの検出を行った。第4章では EL222 単体での光反応を検出し、第5章では DNA 結合過程のダイナミクスを測定した。また DNA 結合速度の DNA 配列依存性から EL222 の DNA 配列認識機構についての考察を行った。

【2章 測定原理と手法】

TG 測定では 465nm の励起光と 840nm の検出光を用いた。Phototropin と EL222 タンパク質は大腸菌を使った大量合成およびカラムクロマトグラフィーによる精製を行い、緩衝液中でのタンパク質反応を測定した。

【3章 Phototropin の光反応】

Phototropin の光活性化反応では LOV ドメインと kinase ドメインをつなぐ linker 部位の構造変化が重要であると考えられている。そこで LOV ドメインと、linker 部位の全体を含む試料(LOV2-linker)と linker 部位の一部 (J α -helix) だけを含む試料(LOV2-J α)の比較を行ったところ、これまで提唱されてきた J α -helix の構造変化だけでなく linker 部位の残りの部分も構造変化を起こしていることが示唆された。また、LOV ドメインから kinase ドメインまでを含む試料 (LOV2-kinase) について測定を行い、活性化を引き起こすドメイン間相互作用変化に由来するとみられる構造変化の時間分解検出に成功した。

【4章 EL222 の光反応】

第4章では DNA を含まない条件で EL222 の測定を行い、タンパク質単体での反応を調べた。TG 測定により光励起された EL222 は基底状態の EL222 と二量体構造を形成することが明らかになった。また、LOV ドメインと DNA 結合ドメインを共に含む全長タンパク質 (EL222) と LOV ドメインだけを切り出した試料 (EL-LOV) の比較を行うことで、EL222 の二量体化反応には LOV ドメイン同士の相互作用が重要であることを示した。

【5章 EL222 の DNA 結合反応】

第5章ではEL222のDNA結合ダイナミクスの測定を行った。TG法での反応検出により、光励起されたEL222は単量体としてDNAと結合したのち、DNA上で二量体化するという反応ダイナミクスを見出した。また、第4章でのEL222光反応との比較により、DNA非存在下では小さかったEL222の二量体化効率が、DNAとの結合により促進されることが分かった。DNA認識後に活性構造(二量体構造)をとることで、不適切な転写を防いでいると考えられる。

一連の反応ダイナミクスについて、TG信号のDNA濃度・タンパク質濃度依存性測定により、それぞれの過程の会合反応の反応速度定数を決定した。分子間の結合の強さは会合反応の速度と解離反応の速度の比で決定されるため、こうした反応速度測定を行うことでタンパク質のDNA配列認識機構(DNA配列ごとの結合強さの違い)の詳細が明らかになるのではないかと考え、DNA結合速度のDNA配列依存性測定を行った。その結果、興味深いことにDNA結合過程の反応速度には配列の依存性が見られなかった。これはタンパク質とDNAの親和性は、結合速度ではなく解離速度の多様性によって決定されていることを示している。

【6章 総論】

本研究では、青色光センサータンパク質の反応ダイナミクスの検出を行った。測定対象として phototropin、EL222 の二つのタンパク質を用いて、分子内・分子間相互作用変化による信号伝達過程を観測した。