

(続紙 1)

| | | | |
|---|---|----|-------|
| 京都大学 | 博士 (理 学) | 氏名 | 武田 公利 |
| 論文題目 | Photoreaction dynamics of Cyanobacterial phytochrome 1 (Cph1) (バクテリオフィトクロムCph1の光反応ダイナミクスの研究) | | |
| (論文内容の要旨) | | | |
| <p>フィトクロムは赤色・遠赤色光受容タンパク質であり、植物や緑藻、シアノバクテリア等の多くの重要な生理機能を制御している。フィトクロムは P_r 型、P_{fr} 型という 2 つの安定な光状態を持ち、これらは赤色光と遠赤色光によって可逆的に切り替わる。この光反応において、発色団である開環テトラピロール(bilin)が幾何異性化を起こすことが多くの先行研究で明らかになっている。しかしフィトクロムのタンパク質全体の高次構造変化のダイナミクスに関しては未だに明らかになっておらず、その信号伝達機構は依然として多くの謎に包まれている。本研究ではフィトクロムの信号伝達機構を解明するために、過渡回折格子法(TG 法)を用いてシアノバクテリア (<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803)由来のフィトクロム(Cph1)の $P_r \rightarrow P_{fr}$ 反応の光反応ダイナミクスを明らかにしている。</p> <p>Cph1は光受容部位と機能性部位(ヒスチジンキナーゼ: HK)で構成されている。本研究では全長のCph1とCph1からHKを切り取った変異体(Cph1Δ2)のTG測定を行い、両者を比較して光受容部位とHKの構造変化のダイナミクスを明らかにしている。まず、Cph1Δ2では、発色団周辺のHis260のプロトン化状態の違いに依存した2つの異性体(P_r-I, P_r-II, pKa=7.5)で吸収変化の速度定数にはあまり違いが見られないが、タンパク質全体の高次構造変化が異なることを解明した。更に、本研究ではサンプルをpH6.5に調整することでP_r-Iの光反応を選択的に取り出すことに成功したので、P_r-Iの反応ダイナミクスを詳細に研究した。その結果、Cph1Δ2(P_r-I)はdimerを形成しており、$P_r \rightarrow P_{fr}$ 反応で吸収変化と同期して拡散係数変化を起こし、これはdimerの配向変化に由来することを明らかにした。特に光励起後400μsで顕著な配向変化を起こしており、この配向変化は'舌構造'の二次構造変化によって制御されていることを変異体(monomer化変異体: F325K、舌構造阻害変異体:R472P)との比較から明らかにした。</p> <p>次に全長のCph1のTG測定の結果、dimerのCph1は光励起後、吸収変化に同期して1.3 msと780ms(P_{fr}形成過程)で拡散係数変化を起こし、それぞれ光受容部位とHKの配向変化に由来することが明らかになった。Cph1のHKは発色団から離れた場所に位置しているにも関わらず、その配向変化は吸収変化に同期していた。これは、これまでの共鳴ラマン分光やFTIR、過渡吸収等の先行研究から、Cph1はP_{fr}形成過程でバルク中からプロトンを取り込み、発色団近傍のHis260がプロトン化することで、舌構造のαヘリックスが形成されることが示唆されていたことと合わせて考察した結果、舌構造の構造変化に伴いHKの配向変化が制御されるためと結論された。</p> <p>以上のように本研究ではTG法を用いて、Cph1のタンパク質全体の構造変化のダイナミクスを解明することに成功した。更に先行研究で報告されている発色団及びその周辺や舌構造の構造変化のダイナミクスと比較することで、Cph1のdimerにおける光受容部位やHKの配向変化が舌構造によって制御されていることを明らかにした。また、Cph1Δ2ではpHに依存してP_r-IとP_r-IIで異なる構造変化を起こしていることを明らかにした。</p> | | | |

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

フィトクロムは多くの生物が保有し、様々な重要な生理機能を制御している。そのためフィトクロムの信号伝達機構の解明は、生物の光応答のメカニズム解明に必要不可欠であり、多くの光反応ダイナミクス研究が行われてきた。しかし精製の困難さや測定手法の制限により、タンパク質全体の高次構造変化のダイナミクス検出は十分に行われてこなかった。本研究では過渡回折格子法(TG法)を用いることでシアノバクテリア(*Synechocystis* sp. PCC6803)由来のフィトクロム(Cph1)の光反応における高次構造変化のダイナミクス検出に成功している。

Cph1は光受容部位と機能性部位で構成されるが、本論文ではまずCph1の機能性部位を取り去った変異体(Cph1Δ2)の反応ダイナミクスが研究されている。これまでの先行研究で、Cph1Δ2はpHに依存して発色団周辺のプロトン化状態が異なる異性体(P_r-I, P_r-II, pK_a=7.5)をとることが報告されていたが、これらの光反応の違いについては明らかになっていなかった。実際に過渡吸収測定では両者にほとんど違いが見られないが、TG信号には顕著な違いが見られた。このことからP_r-IとP_r-IIでは異なる高次構造変化を起こすことを明らかとした。フィトクロムの光反応の複雑さはこれら2つの反応の足し合わせに由来していると考えられ、本研究からフィトクロムの光反応研究にはpH調整が重要になるという知見が得られている。本論文ではpHを6.5に調整することでP_r-I由来の光反応を選択的に取り出し、光反応においてdimerを形成しているCph1Δ2のP_r-Iは吸収変化に同期してdimerの配向変化を起こすこと、そしてこの配向変化は舌構造の構造変化に制御されているということを明らかにすることに成功している。また、構造変化の同定を行うために、新たにCph1Δ2のdimer化部位を明らかにし、F325Kというmonomer化変異体の作製を行っている。これらの結果はフィトクロムの光受容部位の光反応ダイナミクスを研究する上で重要な手掛かりになると期待される。

次に、本論文では全長のCph1を高純度で精製し、TG測定によるダイナミクス研究を行っている。全長のCph1のdimerは吸収変化に同期して1.3msと780msでそれぞれ光受容部位と機能性部位の配向変化を起こすことを明らかにしている。Cph1の機能性部位は発色団から離れた部位に位置しているにも関わらず、配向変化が吸収変化と同期していた。色団周辺の構造変化のダイナミクスの先行研究から780msでは吸収変化と同期して舌構造の二次構造変化が起きていることが示唆されており、本研究の結果を合わせることによって、機能性部位の配向変化は舌構造の二次構造変化に制御されていると結論された。このように本研究ではTG法を用いてCph1の高次構造変化のダイナミクスを明らかにすることによって、Cph1の信号伝達機構の解明に成功している。

本研究の結果は、他のフィトクロムの信号伝達機構を理解する上でも重要な知見になる。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31年1月18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