

# 学位論文の要約

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)

氏名 武田 公利

## [1章 序論]

植物は最適な光合成環境や発育環境を得るために、光を感知して様々な生理機能を示す。この生理機能の制御を行っているのが光受容タンパク質であり、植物は様々な光受容タンパク質を保有する。その中でも、フィトクロム(Phy)は最初に発見された光受容タンパク質であり、発芽や脱黄化、避陰反応、花芽形成等、多くの重要な生理機能を制御している。Phy は  $P_r$  型、 $P_{fr}$  型という 2 つの安定な光状態を取り、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。しかし Phy の光反応は非常に複雑であり、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 Phy の信号伝達機構の解明を目指して、シアノバクテリア(*Synechocystis* sp. PCC6803)由来のフィトクロム Cph1 の光反応ダイナミクスを研究した。これまでの先行研究では、Cph1 の光反応における発色団及びその周辺の構造変化のダイナミクスが研究されてきたが、タンパク質全体の高次構造変化のダイナミクスはほとんど何も分かっていなかった。そこで、本研究では過渡回折格子法を用いて、Cph1 の光反応における高次構造変化のダイナミクスを研究した。

## [2章 手法]

### (i) 過渡回折格子(Transient Grating: TG)法

TG 測定の励起光には波長 615 nm のパルス光を用い、検出光には波長 830 nm 又は 785nm の CW 光を用いた。TG 測定に際して、1パルス照射して測定する毎に、Xe ランプから取り出した 720 nm の CW 光を 20~30s 照射して、Cph1 の  $P_r$  型を十分に貯めた。

### (ii) サンプル調整

Cph1 及びその変異体の発現には大腸菌を用いた。His-tag の付いたアポタンパク質と発色団(PCB)を大腸菌内で共発現させ、大腸菌内で色素の結合を行った。発現したサンプルは Ni カラム及びサイズ排除クロマトグラフィーに掛けて精製した。

### (iii) 2次構造変化及び4次構造変化の評価

TG 信号で得られた拡散係数変化の由来をアサインするための補助データとして、2次構造変化は CD 測定により、4次構造変化はサイズ排除クロマトグラフィー測定により評価した。

## [3章 Cph1 $\Delta 2$ の光反応ダイナミクス]

Cph1 の光受容ドメインの構造変化のダイナミクスを明らかにするために、Cph1 からヒスチジンキナー

ぜ(HK)ドメインを取り去った変異体(Cph1Δ2)の光反応を研究した。

#### (i) Cph1Δ2 の pH 依存性

先行研究で報告されている、発色団周辺のアミノ酸残基(His260)のプロトン化状態が異なる 2 つの異性体 (P<sub>r</sub>-I, P<sub>r</sub>-II, pK<sub>a</sub> =7.55)の光反応の違いを吸収変化測定と TG 測定により評価した。吸収変化測定では P<sub>r</sub>-I と P<sub>r</sub>-II には違いが見られなかったが、TG 信号には顕著な pH 依存性が見られた。これは P<sub>r</sub>-I と P<sub>r</sub>-II では屈折率変化や拡散係数変化のダイナミクスに違いがあることを意味しており、P<sub>r</sub>-I と P<sub>r</sub>-II では異なる高次構造変化を起こすことが分かった。

#### (ii) P<sub>r</sub>-I の光反応ダイナミクス

試料を pH6.5 に調整することで、P<sub>r</sub>-I の反応を選択的に取り出すことに成功した。そこで更に、Cph1Δ2 の P<sub>r</sub>-I の光反応ダイナミクスを詳細に研究した。その結果 P<sub>r</sub>-I の光反応では、吸収変化(400μs、10ms、40ms)に同期して *D* 変化を起こし、特に、400 μs に大きな *D* の減少が起こることが分かった。そして Cph1Δ2 の変異体(F325K, R472P)を作製して光反応を比較した結果、この *D* 変化は二量体の配向変化に由来していることが明らかになった。更に、この二量体の配向変化は'舌構造'と呼ばれる領域の構造変化によって制御されていることがわかった。

#### (iii) monomer 化変異体の作製

本研究では Cph1Δ2 の拡散係数変化の由来を同定するために、単量体の Cph1Δ2 の拡散係数変化を明らかにする必要があった。そこで、Cph1Δ2 の結晶構造を参考にして、二量体化に寄与していそうな部位を選び変異を掛け、サイズ排除クロマトグラフィー測定により会合状態を調べた。その結果、F325 に変異を掛けることで解離定数が増大し、単量体化しやすくなることが分かった。

### [4 章 Cph1 の光反応ダイナミクス]

過渡吸収測定では Cph1 と Cph1Δ2 ではほとんど違いが確認できなかったが、TG 測定では両者で大きな違いがみられた。Cph1 の P<sub>r</sub>→P<sub>fr</sub> 反応では(260μs、1.3ms、33ms、780ms)で吸収変化を起こすことが分かった。そして、Cph1 の二量体ではこの内、1.3ms の吸収変化に同期して光受容ドメインの配向変化に由来した僅かな *D* の減少が起き、P<sub>fr</sub> 形成過程(780ms)で HK ドメインの配向変化に由来した、大きな *D* の減少が起こることが分かった。一方、Cph1 の単量体ではほとんど *D* 変化を起こさないことが分かった。先行研究から、Cph1 は P<sub>fr</sub> 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 がプロトン化状態が変化することで、'舌構造'の構造変化が起こることが示唆された。そして、TG 測定の結果と合わせて考えると、この'舌構造'の構造変化によって HK ドメインの配向変化が制御されていることが示唆された。

### [5 章 考察とまとめ]

本研究により Cph1 の光反応における高次構造変化のダイナミクスを検出することに成功した。特に、Cph1Δ2 の P<sub>r</sub>-I と P<sub>r</sub>-II の光反応ダイナミクスの違いや、HK ドメインの構造変化のダイナミクスは、他の手法では検出が困難で、TG 法を用いることで検出できた。このことから、TG 法は Phy の光反応研究において非常に有効な手法となることが分かった。