

学位論文の要約

題目 Studies on interaction between light sensor protein PYP and its downstream protein PBP
(光受容タンパク質 PYP と下流タンパク質 PBP の相互作用に関する研究)

氏名 金 穂香

1 章 序論

光は地球上で無尽蔵ともいえる最も重要なエネルギー源のひとつで、あらゆる生命現象が光によって制御されている。こうした機能を担う光受容タンパク質は、分子内構造変化や分子間相互作用を起こすことで、外界から受容した光情報を伝達する。光受容タンパク質の反応を調べることは、光によって起こる様々な生命現象の理解を大きく進める、重要なアプローチである。

本研究では、光受容タンパク質の一種である Photoactive Yellow Protein (PYP) を研究対象とした。PYP は、1985 年に紅色細菌 *Halorhodospira halophila* の走光性関連因子として発見された光センサータンパク質で、発色団として *p*-クマル酸を結合している。PYP の光反応は、構造生物学、分子分光学的手法を用いて詳細に調べられており、青色光励起による発色団のトランス-シス異性化に続いて N 末端ヘリックスのアンフォールディングが起こることが知られている。一方で、PYP の光反応に関するほとんどの研究では、安定で水溶性が高い *Halorhodospira halophila* 由来の PYP (Hh-PYP) が扱われており、100 種ほどの細菌が持つとされる PYP の光反応が生物種によってどう違っているかはほとんどわかっていない。また、PYP は光受容ドメインのみをもつシングルドメイン型のタンパク質であるため、PYP が受容した光情報は他のタンパク質との相互作用を通して伝達される。しかし、PYP と相互作用するタンパク質（下流タンパク質）は未だ一つも同定されていない。

こうした背景から本研究では、紅色細菌 *Rhodobacter capsulatus* 由来の PYP (Rc-PYP) を研究対象とし、Rc-PYP の光反応および下流タンパク質との相互作用検出を行った。まず、過渡回折格子 (TG) 法をはじめとした時間分解分光法を用いて Rc-PYP の光反応ダイナミクスを明らかにした (3 章)。その上で Rc-PYP とゲノム配列上でオペロンを組んでいる未知のタンパク質を下流タンパク質候補 (PYP-binding protein, PBP) として選出し、Rc-PYP との相互作用ダイナミクスについて調べた (4 章)。

2 章 TG 法の原理

本研究で用いた TG 法は、光反応に伴う屈折率変化を測定することで、拡散係数変化を時間分解観測することができる分光法である。本研究では反応モデルに応じた解析式で TG 信号を解析し、光励起後に起こる構造変化や分子間相互作用を拡散係数変化としてとらえた。

3 章 紅色細菌 *Rhodobacter capsulatus* 由来の PYP (Rc-PYP) の光反応

Rc-PYP を単離精製し、光反応ダイナミクスを調べた。Rc-PYP は紫外域と青色領域にそれぞれ吸収極大波長をもつため、TG 法、過渡吸収分光法を用いて紫外光励起による光反応、

青色光励起による光反応についてそれぞれ調べた。その結果、紫外光励起では構造変化を伴って暗回復に約1日を要する長寿命生成物が生成することがわかった。さらに驚くべきことに、この長寿命生成物は青色光によって直ちに暗状態へと戻すことができることが判明し、Rc-PYPがフォトクロミック分子であることがわかった。一方、青色光励起でも構造変化が起こったが、暗回復速度は非常に早く、従来のPYPの光反応とよく似ていた。これらの結果からRc-PYPの2つの光反応サイクルのスキームを得ることができた。

4章 Rc-PYPと下流タンパク質PYP-binding proteinの相互作用

Rc-PYPと同一オペロン上に位置する遺伝子がコードするタンパク質を下流タンパク質候補(PYP-binding protein, PBP)とし、Rc-PYPとの相互作用について調べた。PBP共存下および非共存下においてRc-PYPの光状態の吸収スペクトルが変化したことから、Rc-PYPとPBPの光依存的な相互作用が示唆された。PBPのサイズ排除クロマトグラフィーから、PBPは溶液中で2量体をとることがわかった。さらにRc-PYPとPBPを混合したサンプルを用いて暗状態、紫外光照射、青色光照射時のサイズ排除クロマトグラフィーを比較した。その結果、紫外光照射による複合体の形成、青色光照射による解離が観測され、Rc-PYP単独でみられたフォトクロミズムがPBP共存下でも保存されていることがわかった。また、紫外光照射によって生成するPYP-PBP複合体は、PBP2量体2つとRc-PYP単量体2つが会合したヘテロ6量体であることがわかった。続いて紫外光励起、青色光励起によるTG信号をPBP共存下、非共存下で比較し、相互作用スキームを検討した。紫外光励起時、TG信号強度はPBP非共存下に比べPBP共存下で増大したため、Rc-PYPの構造変化に加え、相互作用による大きな拡散係数変化が示唆された。TG信号の解析から、紫外光励起によって生成する活性化型Rc-PYPがPBP2量体と相互作用し、過渡的なヘテロ3量体を形成したのち、ヘテロ3量体同士が会合してヘテロ6量体を形成することがわかった。一方、青色光励起ではPBP共存下、非共存下でTG信号の変化はなく、青色領域に吸収をもつ分子種はPBPと相互作用しないことがわかった。最後に紫外光をあらかじめ照射して複合体を形成させたサンプルを青色光励起した際のTG信号の解析から、解離反応のスキームも決定した。従来PYPは青色光センサータンパク質と考えられてきたが、Rc-PYPは紫外光によってシグナル伝達を行う紫外光センサータンパク質であることが判明し、かつ光の波長で会合状態と解離状態が制御可能であることもわかった。

5章 総論

以上本研究ではRc-PYPの光反応および下流タンパク質PBPとの相互作用ダイナミクスを明らかにすることで、従来青色光センサータンパク質と考えられてきたPYPの一種として紫外光センサーとして働くものがあることを明らかにした。さらにPYPと下流タンパク質との相互作用検出に初めて成功したことで、PYPの光シグナル伝達機構の理解に大きく貢献した。本研究で明らかになった紫外光センサー、フォトクロミズムをはじめとしたPYPの新たな機能をもとに、さらなるPYPの光反応の多様性が明らかになっていくことが期待される。また、他の光受容タンパク質にはないPYPの特徴を生かすことで、新たな光遺伝学ツールの開発も期待される。