

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	金 穂香
論文題目	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)		
(論文内容の要旨)			
<p>PYPは、紅色細菌<i>Halorhodospira halophila</i>の走光性関連因子として発見された青色光受容タンパク質で、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<i>Halorhodospira halophila</i>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う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<i>Rhodobacter capsulatus</i>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。</p> <p>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る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。</p> <p>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 (PYP-binding protein, PBP) 候補とし、Rc-PYPとの相互作用について調べた。PBPのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 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SEC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、PBP 2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PBP 2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。さらに、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は青色を受容する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判明し、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。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、これまで一つも同定されてこなかった光受容タンパク質PYPの下流タンパク質 (PYP-Binding Protein, PBP) を初めて単離し、PYPとの相互作用ダイナミクスを明らかにしたものである。この点が本研究で最も画期的な点である。またこのPBPと相互作用する *Rhodobacter capsulatus*由来のPYP (Rc-PYP) が紫外光と青色光の両方を受容するという、従来のPYPにはない特徴を有していることから、Rc-PYP単独の光反応ダイナミクスについても明らかにしている。

本研究ではRc-PYPの光反応ダイナミクス、Rc-PYPとPBPの光反応ダイナミクスの二点について研究している。Rc-PYPの光反応ダイナミクスにおいては、暗状態において発色団のプロトン化状態の違いに由来する二つの分子種、pUVおよびpBLを同定した。これに基づきpUV、pBLをそれぞれ励起した際の吸収変化・構造変化ダイナミクスについて過渡吸収測定、TG測定を用いて明らかにした。解析結果によると、まずpBLの光励起によって構造変化がおこるが、それは1.2ミリ秒という非常に速度で暗回復する。また、pUVを励起すると一度拡散係数が減少し、その後再び増加する反応が起こり、拡散係数の値は暗状態とほぼ近い状態に戻る。しかしこの間吸収スペクトルの回復はおこらず、長寿命生成物pUV*を生成する。また、pUVの光反応ではpUV*が青色光で暗状態へと戻る、フォトクロミックな反応を発見した。

次にRc-PYPとPBPの反応ダイナミクスにおいては、青色光ではなく紫外光によって会合反応が起こることを見出した。またPBP共存下においては、紫外光による会合反応、青色光による解離反応という形で、フォトクロミックな反応が保存されていることを見出している。会合反応、解離反応ダイナミクスについても詳細に検討し、会合反応においては定常状態では検出しえない過渡的な複合体の存在を明確に示した。またこの過渡的な複合体形成過程に焦点をあて、拡散係数変化、吸収変化、二次構造変化の相関や同期関係について詳細に検討している。その結果として、過渡的な複合体が形成する初期過程において発色団の光反応やタンパク質構造変化も伴うことを見出し、後に起こる安定な複合体形成を誘起する重要な反応であることを示している。また解離反応においては、解離反応の速度を求めただけでなく、励起光強度に依存して解離後の生成物が異なることも示している。解離反応の速度はPYPの分子内で起こる吸収変化や構造変化よりも遅れて起こることを示し、正確な速度定数も算出している。

このように得られた知見をもとに、PYPに関する従来の研究ではみられなかった、紫外光センサー、フォトクロミズムといった新しい機能を発見するに至った。また従来提唱されているRc-PYPの機能 (ガス胞の形成による細胞の浮力の制御) と関連付けて、観測された光反応の意義、特に光可逆的な相互作用の意義について議論している。本研究の結果は、単に青色光を受容するタンパク質と考えられてきたPYPの機能の多様性を強く示唆する、重要な知見となる。

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、令和4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