

学位論文の要約

題目 Light-intensity dependent photoreaction and enzyme activity of BlrP1
(BlrP1 の光強度に依存した光反応と酵素活性に関する研究)

氏名 柴田耕生

Introduction

BlrP1 は、*Klebsiella pneumoniae* から見つかった青色光依存的に cyclic-dimeric-GMP (cdG)を加水分解するホスホジエステラーゼ (PDE) であり、N 末端の BLUF ドメインと C 末端の EAL ドメインから構成されている。BLUF ドメインは発色団として FAD をもつ光センサー部位で、EAL ドメインはバクテリアの細胞内信号伝達物質である cdG を加水分解する酵素である。このことから、BlrP1 は cdG に依存する細胞の移動性・毒性やバイオフィルムの形成などのプロセスを光制御していると予想されている。光励起に続いて BLUF ドメイン内で生じた構造変化が EAL ドメインに伝わり活性の上昇を起こすと考えられる。BLUF ドメイン内の光反応についてこれまで多くの研究がなされてきた一方で、下流へのドメインへの信号伝達のダイナミクスは分かっていた。本研究では過渡回折格子 (TG) 法を用いて光反応に伴う構造変化のダイナミクスを決定した。さらに活性測定と組み合わせることで、TG 法を用いて発見した構造変化が活性の上昇と相関があることを初めて示した。

Materials and method

(1) 過渡回折格子(TG)法

TG 法は光反応に伴う拡散係数の変化を敏感に捉えることのできる手法である。TG 法の測定には波長 462nm のナノ秒パルスレーザーを励起光として用い、プローブ光には 830nm のダイオードレーザーを用いた。

(2) 活性測定

BlrP1 の cdG 分解反応によって生じる 5'-pGpG の量を逆相カラムクロマトグラフィーによって定量した。

(3) その他

サンプルは先行研究とほぼ同じ方法で大腸菌を用いて発現・精製した。タンパク質の 2 次構造や会合状態を推定するために CD 測定と排除体積クロマトグラフィー(SEC)を用いた。

Results

(1) BLUF ドメインの構造変化

BLUF ドメイン内で起こる構造変化を調べるために、BLUF ドメインのみからなるタンパク質 BlrP1-BLUF を作成して TG 測定を行った。NMR の先行研究で報告されているように、BlrP1-BLUF では拡散係数の違いとして検出できるような大きな構造変化は起きていなかった。

(2) 光強度に依存する BlrP1 の構造変化

BlrP1 の TG 信号は拡散係数の大きな減少を示した。この変化はタンパク質の構造が光反応中に変わることを示唆している。SEC の結果から BlrP1 の会合状態はモノマーとダイマーの平衡状態にあることが分かっており、これと照らし合わせると、BlrP1 の構造変化はモノマーでなくダイマーにおいて生じていることが分かった。この構造変化は顕著な光強度依存性を示し、光が強いほど構造変化の収率が上昇する様子が見られた。これはダイマーに含まれる 2 つのプロトマーの内、片方が励起されるだけでは不十分であり、両方が励起されて初めて大きな構造変化が起こることを示している。時間分解測定によりこの構造変化は光励起後 21ms 程度で起こることが分かった。また、これらの構造変化は CD スペクトルでは捉えることができなかったため、ドメイン間の配向など、3次構造の変化だと考えられる。

(3) 光強度に依存する BlrP1 の酵素活性

TG 法を用いて見出した構造変化がタンパク質の機能を反映しているのならば BlrP1 が光強度に対して非線形に応答するセンサーである可能性が示唆される。これを検証するために BlrP1 の酵素活性測定を行った。活性のタンパク質濃度依存性を調べると、ダイマーの割合が増える高濃度領域において光による活性上昇が大きくなる様子が観測され、ダイマーが構造変化を起こすという結果と一致していた。さらに、光照射下において励起された分子の割合を吸収スペクトルで観測しながら活性測定を行うと、活性上昇は励起分子の割合に対して線形ではなく二次関数的に依存した。この結果はダイマーに含まれる 2 つのプロトマーの両方が励起された場合に構造変化が起こるという結果と一致している。

Summary

本研究によって BlrP1 の光反応中に起こる構造変化のダイナミクスを検出することに成功した。BLUF ドメインのわずかな変化が EAL ドメインの大きな高次構造変化を引き起こす様子が捕らえられた。またダイマー内の励起されたプロトマーの数によって活性が異なるという結果は、BlrP1 が強い光強度に特異的に応答する光センサーとしての役割を持つ可能性を示唆している。