

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	柴田 耕生
論文題目	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)		
(論文内容の要旨)			
<p>BLUFタンパク質は主にバクテリアから発見される青色光センサータンパク質であり、バクテリアの生活様式の変化を光依存的に切り替えていると考えられている。これまでの研究によって、BLUFドメイン内の発色団であるFAD近傍において光励起後に起こる構造変化は詳細に調べられている一方で、発色団から離れた部位まで伝搬される構造変化について調べた研究はほとんどなかった。本研究ではBLUFドメインとEALドメインから構成されるBlrP1を用いて、BLUFドメインからEALドメインへと構造変化が伝達する過程を時間分解で検出することを目指した。BlrP1は青色光依存的にバクテリアのセカンドメッセンジャーであるc-di-GMPを加水分解する酵素であり、活性が光照射下で増大することからBLUFドメインからEALドメインへと構造変化が伝搬していると考えられる。構造変化の検出には拡散係数を時間分解で測定可能な過渡回折格子法(TG法)を用いた。さらに、検出される構造変化が活性の上昇と確かに関連することを活性測定から明らかにした。</p> <p>TG測定の結果、BlrP1のBLUFドメインの中では拡散係数に反映されるような構造変化が光励起前後で起こらないことが明らかになった。全長のBlrP1においては光励起後に拡散係数が減少する様子が捕らえられたため、BLUFドメイン内の小さな構造変化が全長における構造変化を誘起していることが分かった。TG信号の濃度依存性の測定からは、タンパク質濃度が高いほど構造変化を起こす分子の割合も増えることが分かった。排除体積クロマトグラフィーやダイマー化を阻害する変異体の測定によって、この濃度依存性はダイマーとモノマーの平衡で説明されることが分かった。つまり、ダイマーを励起すると構造が変化し、モノマーでは起こらない。また、TG信号の励起パルス光強度依存性を調べることで、ダイマーの内に含まれる2つのBLUFドメインの両方が励起された際に生じるLLダイマーにおいて構造が変化していることが分かり、その変化量と変化の速度定数を決定することができた。さらに、この構造変化では二次構造や会合状態は変化せずドメイン間の配向変化などを含む三次構造・四次構造が変わることが分かった。</p> <p>また、TG法によって検出した構造変化と酵素活性の相関を調べた。酵素1分子当たりの活性を表すk_{cat}はタンパク質濃度にシグモイド状に依存していた。この結果からはモノマーの光誘起活性上昇は小さい一方でダイマーの活性上昇は大きいことが分かり、構造変化を起こすダイマーが活性上昇に重要であることが示された。酵素活性測定と同時に吸収スペクトルを測定して、光照射下での励起された分子の数を観測することで、励起された分子がどのように活性に影響を与えるか調べた。その結果、酵素活性は励起分子の濃度の二乗に比例しており、この結果はLLダイマーにおいて活性上昇が起きていることを意味しており、TG法で観測された構造変化が活性に寄与していることを支持している。</p> <p>本研究によって、BlrP1のダイマーに特異的な構造変化を検出した。この構造変化はダイマーに含まれる両方のBLUFドメインを励起した時にだけ起こり、さらに酵素活性の上昇と相関があった。このように明らかになった分子の反応から、BlrP1が強い青色光に特異的に応答するための光強度センサーである可能性を提唱した。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本研究は過渡回折格子法 (TG 法) を用いてバクテリアの持つ青色光受容体である BLUF ファミリーの 1 つ、BlrP1 の光反応に伴う構造変化を明らかにしている。BLUF タンパク質の発色団周りの構造変化は先行研究によって明らかにされつつある一方で、発色団から離れた部位の構造変化は未知な点が多かった。本研究では、BLUF ドメインと酵素部位である EAL ドメインからなる BlrP1 を研究対象として、拡散係数を鋭敏にとらえることの可能な TG 測定を行うことで、ドメイン間を信号が伝達する過程を構造変化として初めて時間分解で検出した。さらに、この構造変化がタンパク質の機能と確かに相関があることを酵素活性測定から明らかにした。構造変化と活性は光強度に依存したことから、BlrP1 が強い光に応答するセンサーである可能性を提案している。

本研究では初めに TG 測定の結果を報告している。その結果、BLUF ドメイン内では拡散係数に反映されないような小さな構造変化が生じており、この動きは全長において EAL ドメインを含むグローバルな構造変化をトリガーしていることを見出している。濃度依存性を調べた測定から、モノマーとダイマーの平衡を明らかにし、このうちダイマーの構造が光で変化していた。光強度依存性を調べた測定によって、ダイマーに含まれる二つの BLUF ドメインの両方が励起されたときにのみこの構造変化が起きていることを突き止めた。この構造変化が二次構造変化や会合解離反応でなく、ドメイン間の配向変化であることも明らかにした。

次に酵素活性測定を行うことで、TG 法で検出した構造変化がタンパク質の機能である酵素活性と相関があるかどうかを調べた結果を報告している。活性の濃度依存性を調べた結果、ダイマーとモノマーは暗状態では同じ活性だが、光照射によってそれぞれ 8 倍と 2 倍の活性上昇を起こしていた。さらに光照射下での活性測定時に、反応液中の励起された分子の量を吸収スペクトルから定量することで、励起分子による活性上昇への寄与を調べるという特殊な測定を行っている。活性上昇は励起分子数の二乗に比例しており、TG 法で見られたようにダイマー内の両方の BLUF ドメインが励起された時にのみ活性上昇と、構造変化が起きていることを初めて示した。

上記の結果と先行研究を比較して、BLUF ドメインから EAL ドメインへの信号伝達過程を提案している。さらにダイマーの構造変化が自然界でも起こりうることをシミュレーションで検証したうえで、BlrP1 が持つ生理機能を強い光に特異的に応答するセンサーではないかと議論している。

以上のように本研究では TG 法を用いて BlrP1 の光反応に伴う構造変化を明らかにし、この構造変化が機能に重要なものであるものを示した。多くの研究は構造変化の検出までに限られており、その構造変化の意義を突き詰めて調べた点で特徴的な研究である。また、分子の反応を調べた結果、細胞の生理応答まで予想した点も独創的である。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