

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	黒井 邦巧
論文題目	Detection of the transient conformational fluctuation of blue light sensor protein TePixD and its functional importance (青色光センサータンパク質TePixDの光反応中間体の構造揺らぎ検出とその機能的重要性に関する研究)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>タンパク質分子は通常室温下で機能するためその構造は熱揺らぎに曝されて常に揺らいでいる。近年NMRや熱力学的測定などを用いてこのようなタンパク質分子の揺らぎが検出され始めそれが機能に重要であることが示唆されて来ているが、本当に揺らぎがタンパク質反応に関与しているかは未だ明瞭ではない。本研究は圧力条件下に過渡回折格子法 (以下TG法と呼ぶ) を適用すれば、TG法が体積量を時間分解検出できることから揺らぎを等温圧縮率として時間分解検出可能であり、反応過程における揺らぎを捉えることで揺らぎと機能の相関を直接示しうることに着目した。本研究はこのような手法を光センサータンパク質であるTePixDに適用した。TePixDは多量体構造を形成し、溶液中で10量体と5量体の平衡にある。TG法を用いた先行研究によれば、このタンパク質の光反応には2つの中間体<math>I_1</math>と<math>I_2</math>が存在し、これら中間体を経て10量体は5量体2つへと光解離をする。この10量体の解離反応には弱い励起光条件の下で10量体中のモノマー1つが励起されたときにのみ起こり複数個が同時に励起されると起こらないという特異な性質があるが、その原因は全く分かっていなかった。本研究ではこれが光反応中間体 (<math>I_1</math>と<math>I_2</math>) の持つ揺らぎの差異に起因するのではないかと予想し検証することで、中間体揺らぎの機能的重要性を検討することにした。</p> <p>まず10量体が解離反応を起こすような弱い励起光下で、中間体<math>I_1</math>から<math>I_2</math>への体積膨張を表すTG信号の圧力依存性より各中間体の圧縮率を暗状態からの差として検出した。その結果、両中間体で暗状態より約10%揺らぎが増大することが分かった。次に強励起光条件で同じ実験を行い10量体中のモノマー2個が励起される条件で同様の実験をすると、今度は逆に両中間体で揺らぎが10%程減少していることが分かった。これらの結果から中間体での揺らぎの増大が光解離反応に必須であると示唆された。</p> <p>ところでこの圧力下測定において10量体解離反応を示すTG信号の強度が圧力で顕著に減少することが観測されたが、これは解離反応の収率減少を表していた。この圧力による反応の阻害は強励起光による反応阻害のように中間体の揺らぎでは説明できなかったため、圧力条件下での精密な密度測定からTePixDの定常状態の圧縮率 (揺らぎ) を評価してみると定常状態での圧縮率は圧力で減少しており揺らぎが圧力で抑えられていることが分かった。したがって反応中間体での揺らぎの増大が光解離反応に必須であるばかりでなく、基底状態で持つ揺らぎも重要な因子であると分かった。</p> <p>以上から本研究においてTePixDの光反応中間体における揺らぎの増大が反応に必須であること、また定常状態における揺らぎも重要であることが分かった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本研究は高圧光学セルを用いて圧力条件下で過渡回折格子法 (TG法) を用いることにより光センサータンパク質TePixDの持つ構造揺らぎと機能の関係について研究したものである。タンパク質の揺らぎはその重要性が指摘されているにも関わらずタンパク質反応に揺らぎが関与していることが直接示されたことはなく、中間体の揺らぎ検出が望まれていた。ここに本研究で用いられている高圧TG法により短寿命中間体が持つ揺らぎが初めて時間分解検出できるようになり、この点において本研究は非常に画期的なものと言える。本研究はTePixDの反応過程における揺らぎの増大を検出し、それが反応に必須であることを示しており初めて揺らぎが実際に反応過程に関与していることを示すことに成功している。また同時にTePixDの光解離過程への圧力効果から始状態での揺らぎも重要な因子であることも導いている。

TePixDの中間体の揺らぎ検出においては、10量体中のモノマー1つのみが励起され光解離反応が起こるような弱い励起光条件のもとで中間体 $I_1$ から $I_2$ への体積膨張過程を表すTG信号の圧力依存性が解析された。その結果各中間体の圧縮率を暗状態からの差として検出されており、反応中間体で揺らぎが増大することを得ている。これは反応過程の揺らぎを実時間で捉えた初めての例である。さらに同様の解析を様々な励起光条件で行い、中間体 $I_1$ と $I_2$ の揺らぎの励起光強度依存性を得ており、この依存性の解析からモノマー2つが励起されて解離反応が起こらない条件では中間体での揺らぎは暗状態よりも小さくなっていることを導いている。このことから反応過程での揺らぎの増大が光解離反応に必須であることが示された。

またTePixDの光解離反応自身への圧力効果も本研究で検討され、中間体 $I_1$ から $I_2$ への体積膨張過程を表すTG信号の後に現れる10量体の解離過程を表す分子拡散信号は圧力で大きく強度減少することを報告している。これを説明するに当たり暗状態での10量体と5量体間の平衡への圧力効果も高圧下動的光散乱法 (DLS) や生化学的クロスリンク法を用いて調べられ平衡は10量体側へ加圧で移動することを得ている。これより観測された圧力依存性は解離反応の量子収率減少によると結論している。揺らぎの観点からこの収率減少の原因を調べるため、圧力下での振動式密度測定から定常状態での圧縮率 (揺らぎ) の圧力依存性を測定しており、その結果定常状態での揺らぎが圧力で顕著に抑えられることを示している。したがって最終的に暗状態における揺らぎが減少しても解離反応は起こらないと結論している。

以上のように本研究はTePixDを例に取り、「①反応過程で揺らぎが増大し、それが機能に重要な構造変化に必須であること ②反応過程での揺らぎだけではなく始状態における揺らぎの大きさも構造変化に重要であること」を示すことに成功しており揺らぎと機能の関係を探求した独創的な研究であると判断した。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、平成27年1月13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