

学位論文の要約

題目 Studies on the reaction dynamics of structural and intermolecular interaction changes during signal transduction of the photosensor protein YtvA

(光センサータンパク質 YtvA のシグナル伝達過程における構造および分子間相互作用変化の反応ダイナミクスに関する研究)

氏名 崔 錫宇

[第1章 序論]

生態系の様々な生物は外部からの環境ストレス（光、熱、塩濃度など）を感知して身を守るストレス応答システムを持ち、環境に適応・進化し続けてきた。光による外部刺激は、光センサータンパク質により感知され、タンパク質の構造変化や分子内または分子間相互作用変化などを介して下流へとシグナルを伝達、機能に至ると知られている。様々な光センサータンパク質において、それらの機能に関する報告は多数あるものの、光シグナル伝達過程における反応ダイナミクスに関してはまだ未知な部分が多い。私は光シグナル伝達反応のダイナミクスに興味を持ち、枯草菌から発見された光受容ドメイン LOV (light-oxygen-voltage) を持つ YtvA とその相互作用タンパク質 RsbRA を対象に、タンパク質のグローバルな構造変化や分子間相互作用変化のダイナミクス測定に特化している過渡回折格子 (Transient Grating: TG) 法を用いて研究を行った。

[第2章 試料と実験方法]

YtvA の LOV ドメインの両末端に位置するヘリックス (A' α と J α) の構造変化ダイナミクスを詳細に調べるため、4 種類の切断タンパク質の DNA を用意し、大腸菌発現系を用いて大量培養・精製を行った。また、全長の YtvA、相互作用タンパク質 RsbRA とその切断タンパク質に関しても同様な手順でタンパク質精製を行った。サンプルの光反応ダイナミクスの検出には過渡回折格子法を用い、タンパク質の相互作用や 2 次構造変化の検出にはクロマトグラフィー、光散乱、円偏光二色性の測定などを行った。

[第3章 N-YLOV-linker の光反応ダイナミクス]

ヘリックス A' α と J α 有無の 4 種類のサンプル (YLOV, N-YLOV, YLOV-linker, N-YLOV-linker) の TG 測定を行った結果、A' α と J α 両方とも付随していない YLOV では光励起による拡散係数 (D) 変化は観測されず、一方、残りの場合では D の減少が観測された。この D 変化の原因について詳細に調べるため、会合状態変化と 2 次構造変化を調べられるサイズ排除クロマトグラフィーと円偏光

二色性測定を行った。これらの結果は、光励起による D 変化の原因は会合状態変化や $A'\alpha$ と $J\alpha$ ヘリックスの崩壊ではないことを示した。私は $A'\alpha$ と $J\alpha$ の回転による構造変化が D 値の変化に十分寄与することをシミュレーションを用いて確認、先行研究の結果とも良い一致を示すことを確認した。光励起による $A'\alpha$ と $J\alpha$ の回転構造変化ダイナミクスは時間分解 TG 測定により調べられ、両ヘリックスは $70 \mu\text{s}$ より速い時間で独立に回転構造変化を起こすことを初めて明らかにした。さらに、 $A'\alpha$ と $J\alpha$ の両方が付随している N-YLOV-linker の場合のみ、光励起により $530 \mu\text{s}$ の時定数を持つ体積変化反応が起こることが分かった。私は $A'\alpha$ と $J\alpha$ 両方が回転することで生じる強いトルクがさらなる体積変化反応を誘起したと考え、YtvA の光シグナル伝達過程において重要な反応過程であるとも考えている。

[第4章 全長 YtvA および YtvA-RsbRA 混合溶液の光反応ダイナミクス]

TG 測定により、光励起された N-YLOV-linker はヘリックスの回転に伴う D 変化が観測されたが、全長 YtvA の場合、 D 変化は観測されなかった。その原因として、私は全長 YtvA の C 末端に存在する STAS ドメインが $J\alpha$ の動きを抑えたためであると考えている。しかし、全長の場合においてもその信号強度は弱いものの、N-YLOV-linker で観測されているような体積変化反応が保存されていることを確認した。このことより、全長 YtvA の場合は光励起によるヘリックスの動きが D 変化としては観測されないが、ヘリックスの回転を駆動力として光反応は起こっていることが分かる。全長の場合も同じくヘリックスの回転は $70 \mu\text{s}$ より速い時間で起こり、 $350 \mu\text{s}$ の時定数を持って体積変化反応を起こすことが分かった。

全長 YtvA の場合、光励起による D 変化は観測されなかったが、興味深いことに、下流分子の 1 つである RsbRA を混合することで大きな D 変化を示すことが確認された。このことは、YtvA と RsbRA が基底状態で相互作用し、 D 変化反応を起こす新しい反応物を形成していることを意味する。TG 信号の解析から求まる D 値より、この反応物は YtvA dimer と RsbRA dimer の相互作用から成る hetero-tetramer であることが分かった。単離した YtvA と RsbRA が相互作用することは SEC-MALS 測定からでも確認され、YtvA と RsbRA は hetero-tetramer を含む色々な大きさのヘテロな多量体を形成することが分かった。その中でも、光励起により大きな D 変化を示す反応物は hetero-tetramer のみであり、その D 変化反応も $70 \mu\text{s}$ より速い時間で起こることを確認、YtvA の光反応が律速反応であることが分かった。YtvA と RsbRA の相互作用サイトについても検討しており、C 末端の相同性の高い STAS ドメインを介して相互作用していることが分かった。

[第5章 まとめ]

本研究により、光励起後に起こる YtvA の分子内および RsbRA への分子間シグナル伝達反応ダイナミクスを TG 法を用いることで明らかにすることに成功した。今回得られた知見は、枯草菌における光シグナル伝達機構の理解に役に立つと考えられる。