

学位論文の要約

題目 Studies on the photo-induced conformational changes of blue light sensor BLUF proteins

(青色光センサーBLUF タンパク質の光誘起構造変化に関する研究)

氏名 床次 俊郎

【第1章 序論】

BLUF タンパク質はバクテリアや藻類で保存された青色光センサータンパク質の1群であり、遺伝子発現や運動性などの生理機能の光制御を担うタンパク質である。BLUF タンパク質はN末端側の発色団フラビンを結合する光受容性のBLUFドメインとC末端側にある短いヘリックスや機能性ドメインから構成される。光照射によりフラビンとタンパク質との水素結合ネットワークが変化することで、フラビン由来の吸収スペクトルがレッドシフトするのが特徴的である。これまでの研究により、このレッドシフトした中間体は光励起後ナノ秒以内に形成が完了し、その後C末端を含むタンパク質全体の構造変化がミリ秒以降に起こるとというのが通説となっていた。

このような状況の中、本研究でBLUFタンパク質の発見から20年もの間見過ごされてきた、ナノ秒以降に起こるミリ秒の遅い吸収変化反応があることを初めて実験的に明確に示した。様々なBLUFタンパク質で網羅的に検証することで、この反応がBLUFタンパク質に保存された普遍性の高いものであることを明らかにし、さらに様々な変異体の反応解析により、この反応過程の起源も考察した。(3章) その際C末端領域が遅い吸収変化反応に与える影響が無視できないほど大きいことが明らかになった。そこで次に、シアノバクテリア由来のBLUFタンパク質SyPixDがもつユニークなC末端領域に着目した。SyPixDは青色光励起により10量体が2量体へと解離することでシグナル伝達し、走光性の制御に関与する。C末端領域がこの光反応にどのような影響を与えるのか、C末端を欠失させた変異体と野生型のSyPixDの光解離反応を過渡回折格子(TG)法で詳細に比較した。(4章)

【第2章 試料と実験方法】

BLUFタンパク質試料とその変異体は既報の方法を基に、大腸菌発現系で大量培養し、抽出、カラム精製により用意した。3章の遅い吸収変化の測定には、ナノ秒の青色光パルス光を励起光に、白色光または単一波長のCW光をプローブ光とした自作の過渡吸収分光光度

計を用いた。4章の SyPixD の光反応解析では、拡散係数変化に敏感な TG 法を用いた。TG 法により SyPixD の 10 量体が 2 量体に解離する光反応を感度良く検出できる。また C 末端欠失変異の二次構造、会合状態への影響を観るために円二色性 (CD) 分光法とサイズ排除クロマトグラフィ (SEC) を行った。

【第3章 BLUF タンパク質の遅い吸収変化の発見とその起源】

代表的な 7 種の BLUF タンパク質 (AppA, OaPAC, BlrP1, YcgF, PapB, TePixD, SyPixD) について過渡吸収測定を行ったところ、すべてのサンプルにおいてナノ秒以内で起こるレッドシフトに伴う早い吸収の増大反応の後に、ミリ秒の時間にさらに吸収が増大する反応過程があることが判明した。解析の結果、この反応過程はすべてに共通する早い τ_1 の反応と種類によって強度や時定数の異なるより遅い τ_2 の反応から成ることが分かった。また発色団フラビン周辺の変異体、C 末端領域の長さを変えた変異体、C 末端を交換した変異体の反応解析により、 τ_1 は BLUF ドメイン内部のシート構造の構造変化、 τ_2 は C 末端領域の構造変化に起因することを明らかにした。さらに BLUF ドメインと C 末端領域の境界に位置するトリプトファン残基を欠いた変異体では τ_2 の反応過程が消失したことから、この残基が BLUF ドメインから C 末端への分子内シグナル伝達を担う重要残基であることも示した。以上の結果を基に、励起後ミリ秒で起こる BLUF ドメインと C 末端領域の構造変化の新しい反応スキームを提案した。

【第4章 SyPixD の光反応における N 末端および C 末端領域の重要性】

反応既知の BLUF タンパク質 SyPixD を対象に、C 末端にある構造不明のユニークな配列 (末端 7 残基) や N 末端の人工付加配列が光反応に与える影響を TG 法や CD、SEC により調べた。TG 測定の結果、野生型 WT と C 末端 7 残基を欠失した変異体 C7d では、C7d のほうが 3 倍ほど大きな TG 信号が観測された。C 末端を欠失しても、CD スペクトルからタンパク質二次構造には影響がないこと、SEC により暗状態、光状態での会合状態にも影響がないことを確認した。そこで信号強度の差は光反応性に起因するものだと解釈した。TG 信号の詳細な解析の結果、この信号の差は C7d で反応速度と解離反応収率が增大していることに起因することが分かった。SyPixD の野生型ではこの C 末端領域があることで、10 量体が光解離しづらく、光応答に対する暗ノイズを減少させる役割があると考えられる。

【第5章 まとめ】

本研究により、BLUF タンパク質で長年見過ごされてきたミリ秒の遅い吸収変化を発見し、その由来を明らかにした。C 末端領域は BLUF タンパク質毎に異なる個性を生む領域であり、反応性に与える影響がかなり大きいことも分かった。本研究結果は、光センサータンパク質の信号伝達メカニズムへ基礎的な知見を与えるのみならず、光遺伝学ツール開発の設計指針という応用にも役に立つと考えられる。