

京都大学	博士 ( 理 学 )	氏名	床次 俊郎
論文題目	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)		
(論文内容の要旨) <p>BLUFタンパク質は発色団にフラビン分子を持つ青色光センサータンパク質の一群で、遺伝子発現や走光性などの生理機能を制御する。その構造はN末端側のフラビンを結合するBLUFドメインと、C末端側のヘリックスや機能性ドメインからなる。発見から20年もの間、光励起後ナノ秒以内に吸収スペクトルがレッドシフトした光状態の形成が完了し、その後ミリ秒の時間領域でC末端を含むタンパク質全体の構造変化が起こるとというのが通説となっていた。</p> <p>本研究では、代表的な7種のBLUFタンパク質について過渡吸収測定を行い、ナノ秒以内の早いレッドシフトの後に、すべてに共通する早い数ミリ秒の<math>\tau_1</math>の反応と、種類によって強度や時定数の異なる数十ミリ秒の<math>\tau_2</math>の反応の2成分から成ることを発見した。その由来について調べた結果、<math>\tau_1</math>はBLUFドメイン内部の<math>\beta</math>シート構造の構造変化に由来すると結論した。一方<math>\tau_2</math>はBLUFタンパク質の種類に依存することから、BLUFタンパク質毎に異なるC末端領域の長さを変えた変異体、C末端ヘリックスを交換した変異体の反応解析により、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の結果から、この残基を介してBLUFドメインからC末端への分子内シグナル伝達が起こることも明らかにした。</p> <p>次に、10量体が2量体に解離することでシアノバクテリアの走光性を制御するBLUFタンパク質SyPixDを対象に、N末端の人工配列やC末端の天然配列が光反応に与える影響を過渡回折格子 (TG) 法による拡散係数変化検出で調べた。N末端の付加配列が10量体形成を阻害することがサイズ排除クロマトグラフィ (SEC) で分かったため、C末端の効果を観るためにN末端に付加配列が全くないサンプルを導入した。野生型WTとC末端7残基を切除した変異体C7dの定常状態の吸収スペクトルは同一であったが、10量体の光解離を表すTG信号は、C7dで大きく増大した。二次構造を反映する円二色性スペクトル、会合状態を反映するSECプロファイルも同じであったことから、定常的な高次構造には変化がなく、TG信号の違いは光反応性に起因すると結論した。TG信号の定量的な解析の結果、この信号の差はC7dで反応速度と解離反応収率が増大していることに起因することが分かった。すなわち実際のSyPixD野生型では10量体が解離しづらく、C末端領域があることで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。</p> <p>本研究により、BLUFタンパク質の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。また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、光反応性に与える影響が大きいことをSyPixDの光解離反応解析から実証した。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本研究は過渡吸収法や過渡回折格子 (TG) 法を用いて、青色光センサータンパク質の1種BLUFタンパク質の光誘起構造変化を明らかにしている。これまでの研究で、BLUFタンパク質の発色団フラビンが励起されると、吸収スペクトルがレッドシフトした中間体がナノ秒以内に形成し、その後吸収変化は起こらずにミリ秒の時間領域でC末端領域の構造変化が起こると考えられてきた。ここでは、新たにナノ秒の吸収変化の後、ミリ秒の遅い吸収変化があることを示し、様々な変異体の反応解析でその起源を明らかにしている。その中でBLUFタンパク質毎に多様性が大きいC末端領域が光反応に与える影響が大きいことに着目し、BLUFタンパク質の一種SyPixDに特有のC末端領域が光反応に与える影響をTG法で明らかにしている。

例えば、羅的なBLUFタンパク質の過渡吸収測定から、新しく観測されたミリ秒の吸収変化がBLUFタンパク質に共通する普遍性の高い反応であることを示している。この反応には数ミリ秒の早い反応成分と数十ミリ秒のより遅い反応成分があり、信号強度や時定数の一般性、多様性をタンパク質のドメイン構造と関連付け、それぞれの反応がBLUFドメイン内部の構造変化、C末端領域の構造変化に由来することを多数の変異体の反応解析で明らかにしている。またフラビン周辺からC末端への構造変化がトリプトファンを介して誘起されることも示し、超高速反応後に起こるBLUFドメイン内部の構造変化からトリプトファンを介したC末端への信号伝達経路を明らかにしている。

次に、BLUFタンパク質の一種であるバクテリアの走光性を制御するSyPixDの光反応に、N末端の人工配列やC末端の天然固有配列が与える影響をTG法で調べている。初めにN末端の人工付加配列の影響をサイズ排除クロマトグラフィで確認し、SyPixDの特徴的な10量体構造を不安定化させることを見出している。さらに、N末端の影響がない完全な野生型WTを精製し、C末端領域を切除した変異体C7dとの比較を行っている。WTとC7dは、吸収スペクトル、円二色性スペクトルやサイズ排除クロマトグラフィでは違いが観測されなかったが、10量体から2量体への光解離を表すTG信号の強度が大きく異なっていた。TG信号の格子間隔を変えた測定の解析により、この違いが解離反応速度とその収率が增大することに起因することを示し、C末端領域が10量体を解離しにくくする役割があることを明らかにしている。

本研究は、長年見過ごされてきたBLUFタンパク質の構造変化に起因するミリ秒の吸収変化を発見し、その起源を明らかにし、BLUFタンパク質を特徴づける重要な反応過程であることを示した。またSyPixDを対象に、BLUFタンパク質毎に保存されていない固有のC末端領域が光反応性の制御に関与することを、TG法を駆使して明らかにしている。本研究は個々のBLUFタンパク質の反応機構の理解に留まらず、多様な光受容体の制御機構の理解のための有用な知見となりうる。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6年1月16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