

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	こ ん ど う ま さ と 近 藤 正 人
学 位 (専 攻 分 野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学 位 授 与 の 日 付	平 成 年 月 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
(学 位 論 文 題 目) Studies on the Conformational and Intermolecular Interaction Dynamics of the Photolyase/Cryptochrome Proteins Monitored by the Time-Resolved Diffusion (時 間 分 解 拡 散 観 測 に よ る 光 回 復 酵 素 ・ ク リ プ ト ク ロ ム 蛋 白 質 に お け る 構 造 変 化 お よ び 分 子 間 相 互 作 用 ダ イ ナ ミ ク ス の 研 究)	
論 文 調 査 委 員	(主 査) 寺 嶋 正 秀 教 授 竹 腰 清 乃 理 教 授 松 本 吉 泰 教 授

理 学 研 究 科

京都大学	博 士 (理 学)	氏 名	近藤 正人
論文題目	Studies on the Conformational and Intermolecular Interaction Dynamics of the Photolyase/Cryptochrome Proteins Monitored by the Time-Resolved Diffusion (時間分解拡散観測による光回復酵素・クリプトクロム蛋白質における構造変化および分子間相互作用ダイナミクスの研究)		
(論文内容の要旨)			
生物が刺激を受けてから実際に機能するまでの過程を分子レベルで解明することは、現代の分子科学における重要な課題の一つである。このためには、まず刺激を受容した蛋白質分子自身が活性化に至るまでの反応（構造変化）ダイナミクスを知る必要がある。そして次には、この活性化された分子と標的分子との間の分子間反応（相互作用）のダイナミクスを明らかにすることが不可欠な課題となる。本研究では、光機能性蛋白質である光回復酵素（PHR）とクリプトクロム（CRY）の光誘起構造変化過程や分子間で起きる反応過程の時間分解研究を行った。ここで対象とした PHR と CRY は共通の光受容ドメイン（PHR-like ドメイン）を持つため同一の蛋白質群に分類されているが、それぞれ DNA 修復と光センサーという異なる生理機能を有する。この機能の違いを反映する構造の違いが明らかにされてきており、これらの関連性を理解するためには「機能」と「構造」を結びつける「反応」過程の研究が重要な意味を持つ。 まず PHR の DNA 修復反応過程の研究を行った。光吸収法や発光法等の従来の手法では捉えることが難しかった PHR 自身の構造変化や PHR と DNA という高分子間で起きる反応過程を時間分解で感度よく捉えるために、過渡回折格子（TG）法による時間分解での拡散変化検出手法を応用した。PHR、PHR+非損傷 DNA、PHR+損傷 DNA 溶液で TG 測定を行った結果、損傷 DNA を加えた時にのみ、分子拡散変化を反映する特徴的な信号が観測された。このことから、DNA 光修復反応において、酵素自身の光反応では見られない様な分子拡散過程の変化が起きることが示された。得られた分子拡散係数値から、観測された拡散変化は修復された DNA が PHR-DNA 複合体から溶液中に放出されたこと、すなわち DNA の解離反応を反映したものと結論した。この拡散過程の時間依存性から、この解離反応の時定数を約 50 μs と初めて決定した。 次に PHR の相同蛋白質である CRY（シロイヌナズナ由来：AtCRY1）の光誘起構造変化過程の研究を行った。CRY は PHR-like ドメインの他に、PHR にはない CCT ドメインという特徴的な構造を持つ。ここでは CRY の光受容後のシグナル伝達の分子機構を明らかにするとともに、この構造的な特徴が反応にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目指した。AtCRY1 の光励起後に得られた TG 信号には、分子拡散過程の変化（拡散係数の減少）を反映した特徴的な信号が観測された。この分子拡散変化は AtCRY1 自身の構造変化を反映したものであることが示され、この構造変化は CCT ドメインという特徴的な構造に由来することが分かった。この結果は、PHR 自身では(拡散係数を変えるような)構造変化が観測されなかったという結果とよく一致している。AtCRY1 は暗状態では PHR-like、CCT 二つのドメインが結合し、安定でコンパクトな構造を取っているが、光照射により安定性が減少することが消化酵素を用いた実験から示唆されている。このことと合わせて、観測された拡散係数の減少は、光誘起により CCT ドメインが PHR-like ドメインが解離することで溶媒との露出が増加したことを反映していると結論した。 以上の研究から、PHR と CRY は構造や機能の違いに伴い、異なる反応（構造変化）を示すことが明らかにされた。しかしその一方で、PHR では DNA の解離を、CRY では機能ドメインの解離を行っていること、すなわちこれらの蛋白質は「解離」という共通性を持つことが示された。			

(論文審査の結果の要旨)

本論文では、光回復酵素 (PHR) とクリプトクロム (CRY) を研究対象とした光機能性蛋白質における構造変化と分子間反応過程に関する研究内容を報告している。従来、実験的観測が困難であった蛋白質全体で起きる高次構造変化や高分子間反応のダイナミクスを時間分解検出するために、本論文では主な研究手法として過渡回折格子 (TG) 法が用いられている。TG 法は近年、生体分子反応系への応用が非常に有効と認識されてきている手法である。申請者はこの手法を用いて PHR と CRY の発色団付近に限られない蛋白質全体で起きる光誘起構造変化過程を調べ、これまでの PHR/CRY 蛋白質群の先行研究では分かっていなかった構造変化の存在やその速度など、様々な興味深い情報を初めて報告している。さらに、下記のように、この手法を蛋白質と DNA という高分子間で起きる反応過程に応用するという初めての試みを行っている。

申請者はまず、PHR の DNA 修復反応系を研究対象として、光励起後の PHR 自身の構造変化や PHR と DNA の間で起きる分子間反応ダイナミクスを時間分解で捉えた結果を報告している。実際の測定では、人工的に合成された損傷 DNA (配列に損傷を含む 14 塩基対のオリゴヌクレオチド) を用いており、PHR のみの溶液とここに DNA を加えた時の溶液で測定した結果を比較している。またコントロールとして同配列の損傷を含まない DNA を加えた測定も行っており、実験結果に大きな信頼性を持たせている。TG 測定により、PHR に損傷 DNA を加えた溶液でのみ、分子拡散過程の変化を表す特徴的な信号が観測された。得られた拡散係数値からの検討や損傷 DNA 濃度を変えた巧みな補助実験から、この分子拡散変化が修復された DNA が PHR から解離する反応過程を反映していることを明確に示し、この解離反応の時定数を世界で初めて $50 \mu s$ と決定することに成功している。このように蛋白質と DNA という高分子間の解離過程を時間分解で測定した例はなく、本論文にユニークな成果といえる。ここで示されたアプローチは今後生体高分子間における反応過程検出の基盤となりうる優れたものである。

次に申請者は、PHR の相同蛋白質である CRY の光誘起反応ダイナミクスも調べ、その結果を上記の PHR の結果との比較を行っている。シロイヌナズナ由来の *AtCRY1* の TG 測定により、光による活性の ON/OFF に重要と考えられてきた光誘起構造変化を拡散係数の変化として捉えることに成功し、変異体の測定を合わせて行うことでこの変化が CRY に特徴的な (PHR が持たない) CCT ドメインに由来するものであることを明確にした。ここで得た結果と先行研究の結果を合わせて考察することで、機能ドメインである CCT ドメインが光誘起で解離するような反応であることが示され、この構造変化の時定数 $0.4 s$ を決定することに成功している。構造変化の速度の情報を与えたのは CRY 研究において初めてのことであり、この結果は *AtCRY1* における光シグナル伝達機構の理解のための不可欠な情報となる。本論文の最後では、これらの研究を通して得た PHR/CRY 蛋白質群における共通性と相違性に関する知見を議論している。

本論文で得られた知見は、蛋白質構造変化と分子間反応過程の時間分解検出という困難かつ新しい試みを通して得たものであり、ここで見られた実験的アプローチは分子科学、蛋白質科学の分野において意義深い重要な研究である。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、平成 23 年 1 月 19 日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行い、その結果、合格と認めた。

要旨公開可能日： 年 月 日以降