

氏 名	えい とく たけし 永 徳 文
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3270 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 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	Photo-induced conformational dynamics of Phototropin LOV domains (フォトリポピンLOVドメインの光反応ダイナミクスの研究)

論文調査委員	(主 査) 教 授 寺 嶋 正 秀	教 授 竹 腰 清 乃 理	教 授 谷 村 吉 隆
--------	----------------------	---------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

植物一般に含まれる青色光受容体フォトリポピンには、2箇所の発色団ドメイン (LOV ドメイン) があり、そこで受けた光情報によってC末端にある kinaseの活性が制御されている。しかし、LOV ドメインから kinase 部分に、どのような形で分子内信号伝達が行われているのかは明らかではない。それは、吸収スペクトルの時間変化の測定では反応中間体はほとんど検出されておらず、構造変化ダイナミクスが不明であったためでもある。本論文では、発色団から離れた部分でのタンパク質の構造変化を調べることが重要であると考え、吸収スペクトル変化では見えないような変化を観測するために、過渡回折格子法を用いて LOV ドメイン近傍のダイナミクスを調べた。特に kinase の活性には、LOV 2 ドメインと kinase を結合するリンカー部分が大きく関わっていると考えられているので、LOV 2 ドメインのみのサンプルと、LOV 2 とリンカーを含むサンプル (LOV 2-リンカー) の2種類を用意して比較した。

LOV 2 と LOV 2-リンカーの両方に共通して、1 μ s 程度の時定数を持つ成分と熱グレーティング信号が観測された。しかし、ミリ秒以降の時間領域では、顕著な違いが見られた。LOV 2 では、弱い信号がほとんど単一指数的に減衰していくのに対して、LOV 2-リンカーでは非常に強い立ち上がりで減衰成分が観測された。格子波数を変えて実験することにより、この強い成分は分子拡散に由来する信号と同定され、さらにこの信号強度は時間に依存して変化することがわかった。このことは、観測時間領域内で拡散係数が変化していることを示している。実験結果の詳細な解析により、LOV 2-リンカーにおいては、リンカー部分が2 ミリ秒の時定数で2 状態転移的に拡散係数が変化していることがわかった。

LOV 2-リンカーでは前述したような強い信号が観測されるために、この信号が現れる時間領域の詳細なダイナミクスを調べることができない。そのため、分子拡散信号を秒以降まで遅くすることのできる過渡レンズ法を用いて、体積変化やエネルギー変化を調べた。LOV 2、LOV 2-リンカーに共通して、約 9 ミリ秒の時定数で僅かな体積膨張 (0.1 cm³/mol) が起こっていることが観測された。また、LOV 2-リンカーではこれに加えて、140 μ 秒の時定数で0.8 cm³/mol 程度の体積減少が起こっていることがわかった。これは LOV 2-リンカーにのみ観測される信号であることから、リンカー部分の構造変化を反映していると考えられる。

更に、こうした構造変化した反応中間体の性質を調べる為、各中間体の熱力学量を求めた。LOV 2 では、光反応に伴う熱容量の変化は見られなかったが、LOV 2-リンカーでは、140 μ 秒のダイナミクス後の中間体において熱容量が非常に大きい値を取ることが分かった。熱容量変化は蛋白質の疎水性露出面積と良い相関があることが知られており、この140 μ 秒前後で熱容量変化が大きい正の値を持つようになったことは、このダイナミクスによって疎水性残基の露出が起こっているからだと考えることができる。

以上のように、青色光受容体フォトリポピンの光反応ダイナミクスについて、吸収スペクトル変化では見られない部分において、分子内シグナル伝達に関わる構造変化が起こっていることが初めて観測され、生理学的な活性と関連して議論された。

論文審査の結果の要旨

光を吸収することによって構造変化をし、生体内でのシグナル伝達のトリガーとなるような蛋白質は、あらゆる生物に存在し、重要な役目を果たしている。生物学的意義を考えれば、これらの蛋白質の構造変化の様子を時間分解で捉えることは重要である。しかし、蛋白質の構造変化とは、主鎖を構成するペプチド結合の結合角が変わるだけであるから、このようなダイナミクスを時間分解分光法で捉えることは難しかった。

申請者は、青色光受容体フォトトロピンを対象に、過渡回折格子法・過渡レンズ法を用いて、サンプル溶液の屈折率変化を時間分解することによってそのダイナミクスを調べる研究をし、構造変化のダイナミクスを明らかにした。特に、対象分子の部分モル体積変化に伴う屈折率変化と、拡散係数変化を時間分解で検出している。これらの手法を用いて、LOV2ドメインのみのサンプルと、LOV2とリンカーを含むサンプル（LOV2－リンカー）の2種類を用いて、そのダイナミクスを比較検討している。

LOV2では、拡散係数がほとんど変化しないのに対して、LOV2－リンカーでは非常に強い立ち上がりと減衰成分が観測され、この成分は分子拡散に由来する信号と同定された。さらに信号の詳細な解析により、LOV2－リンカーにおいては、2 ミリ秒の時定数で2 状態転移的に拡散係数が変化していることを明らかとした。これはリンカー部分の構造変化によって、溶媒との分子間相互作用が変化したためと同定している。

更に、分子拡散信号を秒以降まで遅くすることのできる過渡レンズ法を用いて、体積変化やエネルギー変化を調べている。LOV2、LOV2－リンカーに共通して、約9 ミリ秒の時定数で僅かな体積膨張（ $0.1\text{cm}^3/\text{mol}$ ）が起こっていることを見出している。更に、LOV2－リンカーでは、 $140\mu\text{秒}$ の時定数で $0.8\text{cm}^3/\text{mol}$ 程度の体積減少が起こっていることを示した。これはリンカー部分の構造変化のダイナミクスを表していると結論している。

また、溶質から放出される熱量を精密定量することにより得られるエンタルピー変化（ ΔH ）、 ΔH の温度依存性により得られる熱容量変化、体積変化の温度依存性により得られる熱膨張係数変化などの熱力学量を、中間体に対してそれぞれ求めることに成功した。LOV2では、光反応に伴う熱容量変化の変化は見られなかったが、LOV2－リンカーでは、 $140\mu\text{秒}$ のダイナミクス後の中間体において熱容量が非常に大きい値を取ることを見出している。この熱容量変化を、疎水性残基の水和によるものと同定した。これにより、観測された疎水性残基を露出させるような構造変化のダイナミクスが $140\mu\text{秒}$ という速い時間で起こっていることを明らかにしている。このように、ダイナミクスと中間体の構造に関する情報を統合する知見を得ていることは特に注目すべきである。

以上のように、学位申請者は他の研究手法では検出できないような物理量に注目することで光受容体フォトトロピンの光反応スキームを明らかにし、その機能の分子論的反応機構に重要な知見を与えた。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、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。