

学 位 審 査 報 告 書

(ふりがな) 氏 名	とよおか つぐよし 豊岡 継泰
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 23 年 3 月 23 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) Photoreaction Dynamics of Blue Light Sensor Proteins and Application to Crowding Environments (青色光センサータンパク質の光反応ダイナミクスと Crowding 環境 への発展)	
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	豊岡継泰
論文題目	Photoreaction Dynamics of Blue Light Sensor Proteins and Application to Crowding Environments (青色光センサータンパク質の光反応ダイナミクスと Crowding 環境への発展)		
(論文内容の要旨)			
生体内での生体分子の反応を知るために、多くの物理化学的研究が行われているが、その基本的知識は多種の分子間の相互作用を除いて単純化された系(<i>in vitro</i>、バッファー中)で行われることがほとんどである。しかし、こうした単純化された系で見られた反応が本当に生体細胞中で起こっているかどうかを解明することは、物理化学的研究結果を実際の機能と結びつけるうえで非常に重要なことである。細胞中とバッファー中での大きな違いは、細胞中では様々な高分子種が高濃度で混在していることであろう。このような混み合った環境を Crowding 環境と呼び、安定性や反応速度などに大きく影響をおよぼす。本研究では、生体の持つ青色光センサー反応について Crowding 環境の影響を明らかにすると同時に、まだその反応機構が分かっていない新規な青色光センサーの反応解明を行った。特に、青色光センサータンパク質の反応機構を調べるため、過渡回折格子 (TG) 法を用いた。この手法により拡散係数変化を時間分解で検出することで、発色団付近にとどまらないタンパク質全体の反応を明らかにした。 TePixD はシアノバクテリアに含まれる青色光センサータンパク質である。TePixD のバッファー中での光反応ダイナミクスについてはすでに解明されており、五量体と十量体との平衡が暗状態で存在し、青色光を受容すると十量体だけが拡散係数変化を伴う反応を示す。そして、その反応が機能発現に重要な役割を果たすと考えられている。本研究では TePixD の Crowding 環境下での反応機構を、糖である Ficoll-70 (M.W. 70000) を高濃度で溶かすことにより擬似的な Crowding 環境を再現し、タンパク質反応がどのように変化するかを明らかにするための研究を行った。Ficoll-70 溶液中の TePixD の分子拡散信号には、大きな Ficoll-70 濃度依存性が見られた。Ficoll-70 の濃度が増加すると、TG 信号が遅い時間スケールにシフトし、その信号強度が増加した。信号のシフトは Ficoll-70 を溶かしたことによって粘度が増加したため拡散係数が遅くなったためと考えられ、詳細な解析の結果、拡散係数は Stokes-Einstein の式に従い、粘度の逆数に比例することがわかった。一方、信号強度の増加は、拡散係数変化を伴う反応を起こしている分子数が増加しているためとわかった。その理由として、Crowding 環境下では五量体-十量体の平衡が十量体に傾くためと解釈した。Crowding 環境では高分子の排除体積の効果により行動が阻害されるため、よりコンパクトな (占有体積が小さい) 状態が安定であることが知られている。2つの五量体と十量体を比べた場合、十量体の方が排除体積の重ね合わせができる分占有体積は小さい。よって平衡十量体の方に傾くという解釈は妥当であるといえる。以上から Crowding 効果が青色光センサータンパク質の会合状態に影響を与えるがあることが明らかになり、この十量体形成の促進は高分子の排除体積の効果によるものであることがわかった。またこの十量体の反応が TePixD の機能発現に重要であることから、単純化された環境に比べ、生体内での反応は、より効率よく起こることが示唆された。 Aureochrome は近年、フシナシミドロ中で発見された青色センサータンパク質であり、今回用いた AURE01 は、主に枝の成長点である突起の発生を担うメインスイッチの働きをすることが報告されている。このタンパク質はC末端側に青色光センサーとしLight-Oxygen-Voltage-sensing (LOV) ドメインをもち、中央部に転写因子を持つことで知られる basic region-leucine zipper (bZIP) ドメインをもっている。光励起に伴う化学反応については、全くわかっていなかった。ここでは AURE01 の LOV ドメインのみの AURE01-LOV と C 末端側を 100 残基ほど切った AURE01-ZL を用い、バッファー中での反応機構を評価した。TG 測定と解析の結果、AURE01-LOV では 140 ms でダイマー化反応が起こり、AURE01-ZL では暗状態で存在するダイマーが 160ms で構造変化していることが明らかになった。これらの結果から AURE01-LOV では光誘起によりタンパク質間相互作用が強まることが明らかとなり、LOV ドメイン間の相互作用が強まることによって bZIP ドメインの DNA 結合サイトの相対的な位置が変化するモデルを提出した。Crowding 環境下では、AUREOCROME と DNA の会合が促進され転写因子としてより有利に働くことが示唆される。			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

今回申請者が提出した論文は、青色光センサータンパク質の光反応ダイナミクスを明らかにしたものである。このために、大きく分けて2つの研究を行っている。

一つは、近年発見されたばかりの青色光センサータンパク質である Aureochrome の光反応ダイナミクスを明らかにしたことである。青色光センサータンパク質の機能については様々な研究が行われ報告されているが、機能発現にかかわる反応ダイナミクスについて報告されている例は少ない。今回の Aureochrome の場合でも、光形態形成という機能をもっていることは解明されているが、その光反応についてはほとんどわかっていない。また、発見されて間もないタンパク質のため、その構造についてもほとんど調べられていなかった。申請者は過渡回折格子(TG)法というユニークな手法を用い、拡散係数というパラメーターに着目することによって、過渡吸収測定やCDスペクトル、赤外分光法などで検出できるタンパク質の局所的な変化だけでなく、タンパク質全体のダイナミクスを時間分解で解明した。また、TG法を含めた様々な手法を用いることによって、AUREO1のLOVドメインのみのAUREO1-LOVとC末端側を100残基ほど切ったAUREO1-ZLの光反応ダイナミクスを調べ、その両方の結果を踏まえてDNAとの相互作用を光で変える機構として独自のモデルを立てた。こうしたAureochromeの光反応を解明した申請者の研究は非常に意義のある研究であり、タンパク質科学の研究において大きく貢献する研究であるといえる。

さらに、青色光センサータンパク質の反応研究を、バッファー中などの単純化された系にとどまらず、Crowding環境下での研究まで発展させ、より機能との関連を明らかにした。生体分子の反応を単純化された系で調べることは、反応理解の第一ステップとしては非常に重要であることは間違いない。しかし、細胞中では様々な高分子種が高濃度で混在しているCrowding環境にあり、バッファー中での反応と大きく異なる可能性がある。よって、単純化された系での反応とCrowding環境での反応を比較することは、その反応と機能とを関連付けるために、必要不可欠であるといえるほど重要なことである。申請者は、シアノバクテリアに含まれる青色光センサータンパク質のTePixDの光反応過程をバッファー中とCrowding環境で調べ、Crowding環境は反応の効率に関係する、タンパク質の会合状態に影響を与えるという結果を得た。すなわち、バッファー中に比べ、生体内での反応は、より効率よく起こる可能性があることを示した。この結果はCrowding環境下でのTePixDの光反応に対する知見を得ることができたというだけにとどまらず、生体分子の反応研究におけるCrowding環境下で研究を行うことの重要性をも示唆する非常に興味深いものであるといえる。

以上の点から、Crowding環境下で植物の機能に関連する光センサータンパク質の光反応について研究した本論文は、物理化学や生物学の分野においても多大な貢献をもたらすものである。よって申請者の論文は博士(理学)の学位論文として十分価値のあるものとして認める。また、平成23年1月19日に、論文内容とそれに関連した事項について口頭試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公開可能日： 年 月 日以降