

氏 名	シャバズ ジャバド カーン SHAHBAZ JAVAID KHAN
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3024 号
学位授与の日付	平 成 18 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	Studies on conformational changes of transient intermediate species of PYP photoreaction by transient grating and transient lens methods (過渡回折格子法および過渡レンズ法による PYP 光反応中間体のコンフォメーション変化に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 寺 嶋 正 秀 教 授 梶 本 興 亜 教 授 谷 村 吉 隆

論 文 内 容 の 要 旨

Photoactive Yellow Protein (PYP) と呼ばれる蛋白質は、好塩菌が青色光から逃げるために持っている125残基の比較的小さい水溶性光受容蛋白質である。この蛋白質は、クマル酸を光吸収のための発色団として持ち、この分子のトランス-シス異性化反応をきっかけとして幾つかの中間体を経て基底状態へもどってくる光サイクル反応を示す。最近、この反応は、光受容応答の典型的な反応として多くの興味をもたれてきたが、未だに反応中間体の構造についての情報がほとんどなく、この蛋白質が光情報を伝達する相手方の蛋白質が不明のままであるなど多くの未解決の点が残されている。申請者は、新しい時間分解分光法を開発することで、PYP の光反応について新しい知見を得た。

まず、PYP の短寿命反応中間体が相互作用する蛋白を探索するために、新規な時間分解バイオセンサーを開発している。これは、時間分解で拡散係数を測定することで、蛋白質間の相互作用を検出する方法である。特に数100ミリ秒の寿命を持つ pB と呼ばれる中間体について、好塩菌から抽出した DNA や蛋白質と相互作用することを明らかにした。この手法は、反応中間体との相互作用を検出できる初めてのバイオセンサーであり、今後も広い分野に使用されるものと考えられる。

次に、反応中間体の構造変化についての知見を得るために、時間分解で熱容量変化を測定するシステムを構築した。熱容量は蛋白質構造や水和構造を敏感に反映する有用な熱力学量であり、中間体のこの量を計測できれば重要な知見が得られることが考えられていたが、時間分解の概念の無かった熱力学量をマイクロ秒からミリ秒しか存在しない中間体に適用するのは不可能であった。こうした点に関して、反応エンタルピー変化を時間分解で種々の温度について測定し、その温度依存性から熱容量を計測する方法を確立した。この手法をマイクロ秒の寿命を持つ pR 中間体に対して適用したところ、pR の熱容量は基底状態の値とほとんど変化が無く、構造変化はあまり起こっていないことが示された。ところが pB 中間体では大きな増加を示し、この状態において疎水性残基が水にさらされるような変化が起こっていることを明らかとした。

更に、pB 中間体におけるより詳細な情報を得るために、N 末端のアミノ酸残基を切断した幾つかのミュータントについて拡散係数を測定している。pB 中間体においては基底状態より拡散係数が小さく、水との相互作用が増えていることがわかってきたが、N 末端欠損 PYP の測定結果、N 末端のアミノ酸残基を短くしていくと pB 中間体の拡散係数が基底状態の値に近づいていくことを明らかにした。このことは N 末端のアミノ酸残基の構造変化が拡散係数を変化させている原因であることを示している。これと先の時間分解熱容量変化の測定結果とを合わせて考えることで、pB 状態における構造変化として、N 末端の α ヘリックスが壊れる過程が重要であることを明らかとした。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

機能する生体蛋白質の分子論的な機構を明らかにすることは、現代の分子科学研究に課せられた課題の一つである。こうした観点から、好塩菌が青色光から逃げるために持っている Photoactive Yellow Protein (PYP) と呼ばれる蛋白質のダイナミクスが興味をもたれている。この PYP は125残基の比較的小さい水溶性光受容蛋白質であり、クマル酸を光吸収のた

めの発色団として持ち、この分子のトランス-シス異性化反応をきっかけとして幾つかの中間体を経て基底状態へもどってくる光サイクル反応を示す。この反応の速度論は吸収法を用いて詳細に調べられてきたが、吸収変化としてかからない蛋白質部分の構造変化、特に反応中間体の構造についての情報がほとんどなく、更にこの蛋白質が光情報を伝達する相手方の蛋白質も不明のままであった。申請者は、新しい時間分解分光法を開発することで、PYPの光反応について新しい知見を得ている。

まず、PYPの短寿命反応中間体が相互作用する蛋白を探索するために、新規な時間分解バイオセンサーを開発している。これは時間分解で拡散係数を測定することにより、蛋白質間の相互作用を検出する方法である。特に数100ミリ秒の時間存在しているpBと呼ばれる中間体が、好塩菌から抽出したDNAや蛋白質と相互作用することを明らかにしている。これは短寿命中間体との相互作用を検出できる初めてのバイオセンサーであり、今後は広い分野に使用されるものと考えられる。

次に、時間分解で熱容量変化を測定するシステムを構築し、反応中間体の構造変化について調べている。熱容量は、蛋白質構造や水和構造を敏感に反映する有用な熱力学量であり、中間体のこの量を計測できれば重要な知見が得られることが考えられていたが、時間分解の概念の無かった熱力学量をマイクロ秒からミリ秒しか存在しない中間体に適用するのは不可能であった。こうした点に関して、時間分解で反応エンタルピー変化を測定し、その温度依存性から熱容量を計測する方法を確立している。この手法をマイクロ秒の寿命のpR中間体に対して適用することで、pR状態では基底状態の値とほとんど変化が無く、構造変化はあまり起こっていないことを示した。ところが数100ミリ秒の寿命を持つ中間体pBでは大きな増加を示し、この状態において疎水性残基が水にさらされるような変化が起こっていることを明らかにした。

更に、N末端のアミノ酸残基を切断した幾つかのミュータントについて拡散係数を測定して、N末端のアミノ酸残基を短くしていくとpB中間体の拡散係数が基底状態の値に近づいていくことを明らかとした。このことを、N末端のアミノ酸残基の構造変化が拡散係数を変化させている原因であることを示していると解釈し、これと先の時間分解熱容量変化の測定結果とを合わせて考えることで、pB状態における構造変化として、N末端の α ヘリックスが壊れる過程が重要であることを明らかとした。

以上、申請者の研究は、新規な計測手法を開発し、これまで全く不明であったPYPの光反応及びそれに伴う構造変化を明らかにしたものとして高く評価でき、博士（理学）の学位論文として十分な内容を含むものと考えられる。

なお、本申請論文に報告されている研究業績を中心として、それに関連した分野について試問した結果、合格と認めた。