

論文内容の要旨

博士論文題目 イエロープロテインの光構造変化機構の解析

氏名 針貝 美樹

(論文内容の要旨)

第1章：細菌の走光性のセンサー機能を持つ Photoactive yellow protein (PYP)は、発色団の光異性化をきっかけにタンパク質部分が活性中間体 (PYP_M) に構造変化し、自発的に戻る光反応サイクルを持つ。本研究では発色団の異性化情報がどのように伝播され活性構造を獲得するのかを明らかにすることを目的とした。

第2章：PYP_{M^{acid}}、PYP_{M^{alkali}}それぞれの光反応前後の差 FTIR スペクトルの比較から、PYP_{M^{acid}}から PYP_{M^{alkali}}への変化過程で大きなタンパク質構造変化が起こることが示された。また、M 中間体で負電荷が生じない E46Q では、中性でも E46Q_Mの平衡が PYP_{M^{acid}}に偏っていることが示された。以上の結果から、Glu46 の M 中間体における負電荷が、活性構造 (PYP_{M^{alkali}}) 獲得に必要であることが示された。

第3章：Glu46 の側鎖のカルボニル酸素には、β6 に属する Val122 の側鎖が近接している。そこで Glu46 と Val122 との相互作用を、122 位を変異することにより調べた。122 位を極性残基に変異すると PYP_{M^{acid}}、Ala に変異すると PYP_{M^{alkali}}に平衡が偏った。122 位を極性残基に変異した場合 Glu46 のカルボニル酸素との水素結合が考えられたので、Val122 の CH と Glu46 のカルボニル酸素との間には、水素結合よりも弱く、ファンデルワールス力よりも大きな CH/O 相互作用が働いていることが示唆された。

第4章：PYP の N 末端部と βシートとの相互作用が M 中間体の安定性に寄与していることを示した。特に、N 末端部の 6 残基の欠損で M 中間体が著しく安定化され、暗状態の結晶構造で Phe6 と Lys123 が近接していることから、これら 2 残基の間に相互作用があることが予想された。そこで 6、123 位に変異を導入して検証した結果、PYP_{M^{alkali}}の構造を獲得するためには 6 位には芳香環、123 位には長いアルキル鎖が必要であることが示され、CH/π 水素結合が重要な役割を果たすことが示唆された。

第5章：Met100 を含む β4-β5 ループは、X 線溶液散乱実験の結果から最も柔軟な領域であることが示されている。そこで、このループの役割について調べた。その結果、ループ形成に関わる残基への置換は PYP_{M^{alkali}}に平衡を偏らせ、98、99 位への置換は酸性の構造変化を非常に小さくした。従って、Met100 ループの開閉運動が PYP_{M^{alkali}}の構造獲得には必要であり、この時 Tyr98 と Gln99 との相互作用も重要であることが示された。

総括：発色団の異性化から始まる PYP の構造変化は、Glu46 から Val122、Lys123 を含む βシートに伝播し、Lys123 と Phe6 との相互作用によって N 末端部にまで伝わることを示された。この中で、CH/O、CH/π のような弱い水素結合が構造変化に重要な役割を果たしていることを実験的に示すことができた。

(論文審査結果の要旨)

生物のさまざまなセンサーとして働く蛋白質は、外界の刺激を受容して構造が変化し、酵素活性というかたちで生体信号に変換する。つまり、生物の信号変換を理解することは、蛋白質の構造変化を理解することに他ならない。本論文はバクテリアの光センサー蛋白質・Photoactive Yellow Protein (PYP) において、光を吸収した発色団から蛋白質全体に構造変化が伝播するメカニズムを、種々の分光学的手法を用いて調べたものである。

1. PYP の光反応サイクルで、信号伝達を担うと考えられている近紫外中間体は二種類存在し、それらは pH 平衡にある ($\text{PYP}_M^{\text{acid}}$ と $\text{PYP}_M^{\text{alkali}}$)。両者の蛋白質構造を暗状態との差 FTIR スペクトルのアミド領域で比較したところ、 $\text{PYP}_M^{\text{acid}}$ では構造変化は小さいが、 $\text{PYP}_M^{\text{alkali}}$ では大きな構造変化が起こっていることがわかった。PYP の光反応サイクル中では、 $\text{PYP}_M^{\text{acid}}$ から $\text{PYP}_M^{\text{alkali}}$ への過程で蛋白質部分の大きな構造変化が起こると考えられた。

2. 発色団と相互作用している Glu46 は、暗状態ではプロトン化し、脱プロトン化した発色団と水素結合している。光を吸収すると Glu46 は発色団にプロトンを与えて負電荷を帯びるが、この負電荷の構造変化に対する役割を検証するため、負電荷を帯びない変異体・E46Q の光反応を紫外可視分光法と FTIR で解析した。その結果、E46Q では $\text{PYP}_M^{\text{acid}}$ と $\text{PYP}_M^{\text{alkali}}$ の平衡が $\text{PYP}_M^{\text{acid}}$ に偏っており、大きな構造変化が起こるためには 46 位の負電荷が必要であることがわかった。

3. プロトン化した Glu46 のカルボニル酸素は、Val122 の β 炭素と近接している。この相互作用を調べるために、Val122 に対する変異体を作成し、その光反応を調べた。Glu46 と水素結合を形成する V122N では平衡が $\text{PYP}_M^{\text{acid}}$ に偏っており、V122A では平衡が $\text{PYP}_M^{\text{alkali}}$ に偏っていた。すなわち $\text{PYP}_M^{\text{acid}}$ から $\text{PYP}_M^{\text{alkali}}$ への過程で、Glu46 と Val122 の相互作用が切れることで大きな構造変化が起こると推測された。CH \cdots O 相互作用のように弱い結合が、PYP の可逆的な光構造変化には必要であると考えられる。

4. Phe6 を欠損した PYP_M は、野生型の PYP_M より数 100 倍安定であった。Phe6 のフェニル基と Lys123 のアルキル鎖が近接していることに着目して F6A、K123A 変異体を作成したところ、前者は Phe6 を欠損したのと同様に PYP_M が長寿命化し、後者は黄色に呈色しなくなった。そこで Phe6 と Lys123 の相互作用に着目して変異体を作成し、その光反応を調べたところ、6 位については芳香環を持つ Tyr に置換したときのみ、野生型と同様の光反応を示した。一方、123 位については、側鎖の静電的な性質に関わらず、アルキル鎖を持つときに野生型と同様の光反応を示した。以上の結果から、Phe6 のフェニル基と Lys123 のアルキル鎖の間の CH \cdots π 相互作用が必要であると考えられた。

従来の蛋白質研究では、OH \cdots O や NH \cdots O のような強い水素結合のみが考慮され、蛋白質中での CH \cdots π 、CH \cdots O のような弱い相互作用の役割は疑問視されてきた。本論文は、CH \cdots π 、CH \cdots O 相互作用が、たかだか数個で蛋白質という巨大分子の性質を規定しているということを、実験的に明確に示したもので、蛋白質の理解に向けて新しい視点を提唱したという点で画期的な成果といえる。よって本論文が博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認め、審査結果を合格とした。