

論文内容の要旨

博士論文題目 Structural Properties of Photointermediates of Photoactive Yellow Protein -Mechanism of Target Recognition-

イエロープロテインの光反応中間体の構造的特徴 -標的認識機構-

氏 名 清水 伸隆

(論文内容の要旨)

生体における光情報変換の分子機構を理解するためには、光受容体による光反応の機構と、受容体と標的蛋白質との相互作用を明らかにしなければならない。多くの生体光受容体は膜蛋白質であることから、これらの研究を困難にしていた。Photoactive yellow protein (PYP) は、水溶性の光受容蛋白質であり、高分解能の構造が解明されていること、遺伝子操作系が確立していることなどから、生体光情報伝達の分子機構を解明するためのモデル蛋白質としての有用性が広く認識されてきている。本論文では、PYP を用いて、光反応の分子機構および標的蛋白質の認識機構を解明することを目的とし、野生型および R52Q 変異体の溶液構造、光反応を詳細に調べるとともに、R52Q の結晶構造解析を行なった。

PYP の活性中間体である M 中間体の寿命に顕著なアニオン依存性があることを発見した。無機アニオンや酢酸イオンでは、長寿命化はイオン強度のみによるが、クエン酸など多価の有機酸イオンでは、イオン強度の効果のほかに、イオン種特異的な効果があることを明らかにした。多価有機酸イオンの存在下での溶液構造を解析することで、これらのイオンが M 中間体に特異的に結合することを示した。PYP の標的蛋白質は同定されていないが、この特異的な有機酸の結合は、標的認識のモデルとなると考えられる。

R52Q 部位特異変異体を用いて、同様の測定を行ったところ、R52Q については、イオン強度による M 中間体長寿命化だけが観測され、多価有機酸イオンの結合は観測されなかった。この事実は、R52 が標的結合部位を構成していることを示している。

R52 の役割を調べるために、R52Q 変異体の結晶構造解析を行なった。野生型の結晶構造との比較により、R52 近傍の水分子の位置だけが異なっていることが明らかになった。また、野生型と R52Q の FTIR により、L 中間体形成に伴う水分子の変化を観測された。L 中間体から M 中間体の形成過程で発色団がプロトン化することがわかっているため、この水が発色団の pKa 制御に働いていることが示唆された。また、結晶構造に基づき、PYP におけるクエン酸の結合様式を推定した。

M 中間体の寿命の pH 依存性を詳細に検討したところ、M 中間体には pH 8 と pH 5 で観測される 2 つの状態が存在し、両者は発色団周辺だけでなく二次構造を含めた蛋白質全体の構造が異なることが示された。アルカリ型 M 中間体は、有機酸結合型の M 中間体と同一の構造をとっていた。以上の結果は、M 中間体でプロトンの解離・結合を行なう未同定の残基 X の存在を示唆する。また、標的の結合はこの残基 X を解離させて、M 中間体の構造を変化させると考えられる。

以上の結果より、静電相互作用と水素結合による PYP の標的認識機構のモデルと、光反応中の R52 近傍の水による発色団の pKa 制御機構のモデルを提唱した。

(論文審査結果の要旨)

生体における光情報変換の分子機構を理解するためには、光受容体による光反応の機構と、受容体と標的蛋白質との相互作用を明らかにしなければならない。多くの生体光受容体は膜蛋白質であることから、これらの研究を困難にしていた。Photoactive yellow protein (PYP) は、水溶性の光受容蛋白質であり、高分解能の構造が解明されていること、遺伝子操作系が確立していることなどから、生体光情報伝達の分子機構を解明するためのモデル蛋白質としての有用性が広く認識されてきている。

本論文では、PYP 野生型および R52Q 変異体の溶液構造、光反応を詳細に調べるとともに、R52Q の結晶構造解析を行ない、以下の重要な結果を得た。

1. クエン酸等多価の有機酸イオンは、M 中間体に特異的に結合し、M 中間体の寿命を制御している。酢酸イオンや無機アニオンは特異的な結合をせず、イオン強度依存的な長寿命化を示す。この結果は、クエン酸が PYP の標的のモデルとなっており、認識には静電相互作用が、特異的結合には水素結合が重要な役割を果たすことを示唆する。
2. アルギニン 52 は、クエン酸の結合部位を形成している。
3. アルギニン 52 近傍に位置する水分子は、光反応による発色団の pKa 制御の役割を担っている。
4. pKa が 6.4 である未同定の残基 X が存在し、M 中間体の構造や寿命を制御している。クエン酸、したがって標的の結合によりこの残基 X は解離の方に平衡がシフトし、さらに構造変化を誘起する。

これらの結果に基づき、PYP の標的認識に関して、以下のモデルを提唱した。暗状態において、蛋白質表面の大部分が負に帯電している PYP は、光吸収後 M 中間体において、R52 が蛋白質表面に露出し、R52 を中心とした正電荷クラスタが形成される。その結果生じる標的分子との間の静電相互作用により両者は接近し、水素結合によって部位特異的結合が実現される。この時、特定残基 X の脱プロトン化によって新たな相互作用が生じて構造がさらに変化するが、その過程で標的分子も活性化される。また、PYP の光反応機構に関して、以下のモデルを提唱した。発色団の光異性化による変化は近接する Y98 に影響を与え、R52 と Y98 の間の水素結合を切断する。その結果、R52 の側鎖の変化によってキャビティが形成され、そのキャビティに水分子が侵入する。この水の影響で発色団の pKa は上昇し、最終的に E46 から発色団にプロトンが移動する。

以上のように、本論文は、PYP の光反応と標的認識の分子機構の理解に本質的な貢献をしている。この成果は、生体の光情報伝達の分子機構の解明についても重要な示唆を与えるものである。提唱されたモデルは、PYP の分野のみならず光生物学分野一般に大きな影響を与えると期待され、学術上の価値が高い。よって、審査委員一同は、本論文が博士(理学)の学位論文として価値あるものと認めた。