

## 論文内容の要旨

申請者氏名 小林 俊達

Phytochrom B (PHYB) is a dimeric chromoprotein that detects the quantity, quality and duration of red or far-red light, and can modulate plant growth and development throughout the entire life cycle of plants. Upon absorption of red light, PHYB translocates from the cytoplasm to nucleus, and regulates gene expression through interaction with transcription factors such as basic-helix-loop-helix proteins. PHYB consists of two major structural domains, referred to as the N- and C-terminal domains. The C-terminal domain consists of two subdomains referred to as the PAS repeat domain (PRD), consisting of PAS1 and PAS2 domains, and the histidine kinase-like domain (HKLD).

PAS domains have been identified in proteins from all three kingdoms of life, and are important signaling modules that combined with a variety of regulatory modules in multidomain proteins. Various cell responses to changes in the environmental and intracellular conditions are controlled via PAS-containing receptors, transducers, and regulators. For phytochromes, the PAS domains contain determinants necessary for nuclear translocation, signal transduction and dimerization, however, the underlying molecular mechanism of this activity remains unclear.

This study reports the solution structure of rice PHYB PAS1 domain (residues 666-782), one of two PAS domains, determined by multidimensional NMR spectroscopy. This domain shares structural similarity to other PAS domains, although one missing  $\beta$ -strand ( $\beta\beta$ ) and two extra helices (N-terminal Helix I and inserted Helix II) were found. The PAS domain is known to be involved in protein dimerization with other proteins. For rice phytochrome B, the PAS1 domain with the N-flanking hinge region formed a stable homodimer, however, no interaction between the PAS1 and PAS2 domains was observed. The core region of loss-of-function missense mutations (Quail-box) was located on the  $\beta$ -sheet that represents the dimer interface. The surface structure of the PAS1 domain, especially on the  $\beta$ -sheet side, was perturbed by these mutations. The conserved residues were mapped on the  $\beta$ -sheet that is containing the Quail-box and the dimer interface, and also on the N-flanking region of the PAS1 domain that is necessary to maintain the dimer. Thus stable dimer formation or the relative orientation of the  $\beta$ -sheets might be crucial factors in maintaining phytochrome function.

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 小林 俊達

高等植物のフィトクロムは主に赤色・遠赤色光を吸収する光センサータンパク質であり、脱黄化、胚軸伸長、開花・種子形成などの光形態形成や概日リズムの制御など、様々な生理応答に関与している。フィトクロムは二量体を形成しており、通常赤色光吸収型として細胞質に存在する。赤色光を吸収することで遠赤色光吸収型へと構造変化し、核移行が誘起され、転写因子などと相互作用して光情報を伝達すると考えられている。しかし現在まで原子分解能での高等植物のフィトクロムの立体構造は報告されておらず、光シグナルの伝達機構の詳細は明らかにされていない。

フィトクロムはN末端ドメインとC末端ドメインおよびそれらをつなぐヒンジ領域からなり、N末端ドメインが光のセンシング及びシグナル伝達に関与し、C末端ドメインが二量体化、核移行、シグナル伝達に関与すると考えられている。C末端ドメインにはタンデムに並んだ二つのPASドメイン(PAS1およびPAS2)が含まれ、これらPASドメイン中には分子遺伝学的研究からシグナル伝達能が失われるミスセンス変異が多く見いだされた領域(Quail-box)が含まれる。またPAS1近傍には生化学的実験から二量体化領域の存在が示唆されているが、そのメカニズムは明らかになっていない。そこで申請者はイネ由来フィトクロムBのPAS1ドメインに着目し、その立体構造を決定することでPAS1ドメインの関与するフィトクロムの分子機能を明らかにすることを研究目的とした。

本論文の成果は次の4点である。1) イネフィトクロムBのPAS1ドメインをNMRにより構造決定し、分子表面の $\beta$ シート側に高等植物のフィトクロム間で高度に保存されている残基が集中していることを見いだした。2) Quail-boxはこれら保存残基が集中する分子表面の $\beta$ シート上に存在し、Quail-box中のシグナル伝達阻害ミスセンス変異が分子表面の $\beta$ シート構造を変化させていることを2種の変異体のNMR実験により明らかにした。3) イネフィトクロムBのPAS1ドメインはN末端側のヒンジ領域とトランスに相互作用することで2量体化していることを、12種の変異体のゲルろ過およびNMR実験により明らかにした。またフィトクロムAのPAS1ドメインは2量体を形成しなかったが、その2量体化能の違いが主にヒンジ領域の1つのアルギニン残基の持つ正電荷で説明できることを見いだした。4) 立体構造に基づいたPAS1ドメインの相互作用因子の効率の良いスクリーニング法として、タンパク質をカラム樹脂に固定化した状態でNMR測定する新規技術の開発に成功した。

以上のように、本論文は植物フィトクロムの分子機能の一端を立体構造や生化学的なデータから明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。