The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Functional Expression and Photo reaction Cycle of Photoactive Yellow Protein
Author(s)	三原, 憲一
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39979
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	三原憲一（みはらけんいち）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　12949　号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物化学専攻
学位論文名	Functional Expression and Photo reaction Cycle of Photoactive Yellow Protein （Photoactive yellow protein の発現と光反応）
論文審査委員	（主査） 教　授　徳永　史生 （副査） 教　授　倉光　成紀　　助教授　片岡　幹雄

論文内容の要旨

Photoactive yellow protein（PYP）は光合成細菌 *Ectothiorhodspira halophila* に存在する光受容蛋白質であり，負の走光性に関与すると考えられている。水溶性かつ比較的低分子量（14kDa）であるため，情報伝達に関与する光受容蛋白質としては唯一，高分解能の立体構造が判明しており，クマル酸を発色団に持っている。本研究では，PYP の光反応機構をアミノ酸レベルで解明することを目的として，大腸菌による PYP の大量発現系の確立，変異 PYP の作成，変異 PYP を用いた光反応の解析を行った。

PYP 遺伝子を単離し，部分塩基配列を決定した。それを発現ベクターに挿入し，発現を行った。大腸菌で発現させたアポ PYP（アポ ePYP）をクマル酸無水物による再生法により再構成させたところ，培養液 1 L 当たり 50mg の精製 ePYP を得た。吸収スペクトルの結果から ePYP は天然の PYP（hPYP）と同じ構造に再構成されていると考えられた。

PYP の発色団近傍に存在するアミノ酸残基のうち，Tyr42・Glu46・Thr50 は発色団の水酸基と水素結合ネットワークを形成し，Arg52 は正電荷により発色団を安定化していると考えられている。また，Cys69 で発色団と結合している。Tyr42 は Phe に置換し（Y42F），同様に E46Q，T50V，R52Q，C69S を作成した。C69S は再構成できず，Cys69 に発色団が結合することが確認された。変異 PYP の可視吸収スペクトルを測定したところ，R52Q は野生型とほぼ同じ 447nm に，Y42F，E46Q，T50V の吸収極大は長波長シフトした。pH を酸性にしたところ，吸収極大が 340nm にシフトし，その pKa は全て野生型より大きかった。以上より，Tyr42・Glu46・Thr50 が発色団の負電荷の安定性に強く寄与していること，Arg52 は色制御に関与していないことが示唆された。

E46Q の光反応を低温分光及びフーリエ変換赤外分光法（FTIR）で解析し，光反応サイクルにおける Glu46 の役割を調べた。E46Q の場合，PYP_L から PYP に戻る過程で，PYP_L の安定温度が野生型と異なり，PYP_L の安定化の為にはより低い温度を必要とした。次に野生型の PYP_M と PYP との差 FTIR スペクトルでは，1736nm^{-1} の振動モードが負のシグナルを示すことから，カルボン酸を持つ残基が PYP_M の時に脱プロトン化することがわかっていた。E46Q ではこの振動モードが観測されなかったため，Glu46 がその残基であることが判明した。以上より，Glu46 は PYP_L から PYP_M への変化の過程で脱プロトン化し，発色団にプロトンを与える供与基として働くことが示唆された。

光反応サイクルにおける Arg52 の役割も調べた。R52Q の低温分光では，PYP_L から PYP に戻る過程において，

野生型では見られないPYP$_M$が観測された。また，PYP$_M$とPYPとの差FTIRスペクトルでGlu46の振動モードが正負のシグナルを示したことから，この時Glu46は脱プロトン化していないことがわかった。以上より，Arg52は，光反応を効率よく進めるため，蛋白質内部でのプロトンの動きを制御していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

Photoactive yellow protein (PYP) は光合成細菌 *Ectothiorhodspira halophila* に存在する光受容蛋白質であり，負の走光性に関与すると考えられている。三原君提出の論文ではPYPの光反応機構をアミノ酸レベルで解明することを目的として，大腸菌による大量発現系を確立した。そして変異PYPを作成し，発色団の近傍にあるTyr42, Glu46, Thr50が発色団の水酸基と水素結合ネットワークを形成していること，光反応中にGlu46がプロトン供与体として働くこと，Arg52は光反応を効率よく進めるため，蛋白質内部でのプロトンの動きを制御していることを示唆した。

これらの知見はPYPの研究に新たな視点を与えるだけでなく，一般の生体光受容機構の理解に重要な手がかりを与えるものである。よって三原君提出の論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。