

Title	Analyses of Photo- and Thermal-Induced Internal Structural Changes in the Photocycle of Photoactive Yellow Protein
Author(s)	熊内, 雅人
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44088
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	くま うち まま と 熊 内 雅 人
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 2 3 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 14 年 6 月 28 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	Analyses of Photo- and Thermal-Induced Internal Structural Changes in the Photocycle of Photoactive Yellow Protein (Photoactive Yellow Protein 光反応サイクルにおける光および熱に誘 引される構造変化の解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 徳永 史生 (副査) 教 授 倉光 成紀 教 授 福山 恵一

論 文 内 容 の 要 旨

光受容蛋白質である Photoactive Yellow Protein (以下 PYP と呼ぶ) は、分子量 14 kDa、125 アミノ酸残基から成る水溶性タンパク質である。システイン 69 とチオールエステル結合した *p*-クマル酸を発色団として持ち 446 nm に吸収極大を持つ。

PYP は、紅色光合成細菌中に存在し、この細菌の負の走光性、すなわち光からの忌避行動に関与していると考えられている。発色団の共役 π 電子が可視領域の光を吸収することにより、発色団が異性化しこれが蛋白質全体の構造変化を誘引し、他の物質や蛋白質と相互作用することにより情報を伝えるという機能発現メカニズムを有していると考えられている。この発色団の異性化および蛋白質の構造変化は可視分光学的に区別が可能な数種類の光反応中間体として検出できる。この中でも M 中間体と呼ばれる中間体が機能発現における活性中間体と考えられている。この M 中間体の構造並びに構造変化を研究することは、蛋白質の機能発現過程を考える上で非常に重要である。

今回、M 中間体 (PYP_M) から暗状態 (PYP_{dark}) に戻る過程を野生型およびメチオニン 100 に対する部位特異的変異導入タンパクを試料として分光学的手法により解析を行った。

M 中間体構造は、可視・紫外吸収、FTIR (フーリエ変換赤外吸収) スペクトル測定の結果から、発色団は異性化プロトン化状態にあり、蛋白質部分は二次構造にかなり大きな変化があることが明らかとなった。また、X線小角溶液散乱法 (SAXS) により蛋白質の慣性半径を測定した結果、M 中間体時には、15% 程度体積が増えることが明らかとなり蛋白質部分の構造変化の結果 PYP_M は PYP_{dark} より少し膨らんだ構造を持っていることが明らかとなった。また、速度論的測定結果から発色団由来の可視吸収スペクトルの戻りの時定数と SAXS 測定による蛋白質全体の戻りの時定数が一致することも分かった。このことから蛋白質部分と発色団が同期しながら PYP_M から PYP_{dark} に戻ることが判った。

メチオニン 100 に変異導入を行った変異 PYP は野生型に比べ PYP_M から PYP_{dark} に戻る過程の反応速度が著しく遅くなっている。このことからメチオニン 100 は PYP_M 崩壊過程を加速する効果を持っていると考えられる。

熱力学的解析の結果、メチオニン 100 は PYP_M 崩壊過程の活性化エンタルピーを下げる働きをしていることが判った。さらに、PYP_M 崩壊速度に対する溶媒の pH の影響について検討を行った結果、メチオニン 100 は PYP_M 崩

壊過程においてアルギニン 52 に対して電子供与的に相互作用することでアルギニン 52 の pKa を下げ、その結果として発色団が、速やかに PYP_{dark} におけるコンフォメーションへと動くことを可能としていることが判った。

論文審査の結果の要旨

熊内雅人君提出の論文は、機能性蛋白質の特定のアミノ酸残基の役割を理解するために、光合成細菌の産生する Photoactive Yellow Protein の 100 番目のメチオニン残基に注目した。遺伝子工学的にメチオニンをアラニン、ロイシン、グルタミン酸、リジンに変えた変異体を作り、M中間体からの戻りの反応に焦点を当て、光吸収、赤外吸収、円二色性、X線小角散乱などを測定し、熱力学的パラメーターを求め、100 番目のメチオニン残基の役割を検討した。その結果、メチオニン 100 は光反応サイクルにおいて、M中間体からの戻り過程の活性化エンタルピーを下げる働きをしていることが分かった。さらに溶媒の pH の影響を検討し、メチオニン 100 が、M中間体からの戻りの過程でアルギニン 52 に対して電子供与的に働き、アルギニン 52 の pKa を下げ、結果として発色団が元のコンフォメーションに速やかに戻ることを可能にしていることが判明した。

この成果は PYP の研究のみならず蛋白質の研究においても重要な成果であり、蛋白質研究に大きく貢献するものである。よって熊内君提出の論文は博士（理学）の学位論文として十分価値有るものと認める。