



Title	A Functional Principle of Allosteric Regulation of PAS Sensor Proteins: Measurements and Creation
Author(s)	山脇, 竹生
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69360
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (山脇 竹生)

論文題名

A Functional Principle of Allosteric Regulation of PAS Sensor Proteins: Measurements and Creation
(PASセンサータンパク質のアロステリック制御の原理：測定と創製)

論文内容の要旨

The aim of this thesis is to reveal the allosteric regulatory mechanism of PAS kinases. To achieve this goal, firstly, we focused on the regulatory mechanism of a heme-containing PAS sensor kinase FixL. The advantages of this protein is that (1) the ligand binding states are easy to determine using visible absorption spectra, since the ligand binds to heme, (2) crystal structural data is available for the truncated sensor domain of FixL, and (3) functional activity of FixL is easy to quantitatively determine by Phos-tag SDS-PAGE assay. The powerful methodology to observe protein structural changes is resonance Raman spectroscopy. The combination of these structural and functional measurements enabled us to discuss allosteric structural changes related to the kinase regulation. In order to verify this regulatory mechanism of FixL is commonly used among PAS kinases, I designed chimera proteins, which consists of PAS sensor domain and the kinase domain of FixL. This protein was succeeded to regulate its kinase activity upon redox states instead of FixL-like oxygen (O_2) binding states. The allosteric regulatory mechanism of this chimeric protein have been measured and compared with that of a natural protein FixL. By examining whether these two proteins have the similar allosteric regulatory mechanism or not, versatility of the mechanism among PAS sensor kinases is discussed. Finally, I proposed an allosteric regulatory model as a functional principle of allosteric regulatory mechanism of PAS sensor kinases.

In Chapter 1, existing allosteric regulatory models were explained. Although allosteric mechanisms of individual proteins have been investigated so far, there are few systematic studies of them. Thus, it would be a huge challenge to find the principle of allosteric regulatory mechanism of protein. Principles of Raman spectroscopy and the materials and methods are described in Chapter 2 and 3, respectively. In Chapter 4, we investigated the mechanism of an O_2 -dependent kinase protein FixL. We have found that Tyr201 on the C-terminal side of the F_d helix undergoes a large structural change upon O_2 dissociation. Furthermore, we showed that this structural change was involving to the kinase inhibition of FixL. In Chapter 5, allosteric dynamics of FixL were investigated. The time-resolved resonance Raman measurements suggested that the part of the sensor domain and the part of the kinase domain of FixL concertedly undergoes structural changes upon O_2 dissociation. It is noteworthy to mention that the structural changes are not transmitted domain by domain, but are transmitted by undergoing global structural changes across the two domain. In such a way, the allosteric regulation was achieved. From this study, it was found that among the three Tyr residues in the kinase domain of FixL, only the time constant of Tyr496 is one order of magnitude larger. In Chapter 6, I designed a chimeric redox-dependent sensor kinase protein and investigated the structure and structural changes of the chimeric protein, and its kinase activity. The chimeric protein has many structural similarities with FixL. By comparing the allosteric regulatory mechanism of the chimeric protein with that of FixL, we verified that the allosteric regulatory mechanism of FixL is applicable not only for FixL but also for another protein. The kinase assay revealed that the chimeric protein activate its kinase activity in the deoxy form, while inactivate in the met form. The resonance Raman structural measurements of the chimeric protein showed that the structural changes of the Tyr residues in the kinase domain are similar with that of FixL. By considering the changes of the Raman bands, it was suggested that the increase in the fluctuation on the distal side of the sensor domain was transferred to the kinase domain to increase its fluctuation to activate the kinase activity. Since this allosteric regulatory mechanism were observed not only in FixL but also in the chimeric protein, it is expected that this regulatory mechanism is applicable to other PAS family, and provide the guidelines on the design of allosterically controllable proteins.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (山 脇 竹 生)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 水谷 泰久
	副 査	教授 船橋 靖博
	副 査	教授 藤原 敏道

論文審査の結果の要旨

タンパク質の機能は、分子内に含まれる複数の機能部位が互いに連動的に働くことによって生み出される。例えば、ガスセンサータンパク質では、ガス分子がタンパク質に結合すると、結合部位に構造変化が生じ、その変化が触媒部位の構造を変化させ酵素活性の制御がなされる。このような複数の機能部位が連動している性質はアロステリーとよばれるもので、そこではタンパク質の構造変化が本質的に重要な役割を果たす。

山脇竹生君は、PAS キナーゼタンパク質の機能に重要な連動性を、紫外共鳴ラマン分光法および Phos-tag 電気泳動法を用いて明らかにした。本論文はその研究成果をまとめたものである。以下のように、主に 3 つの内容から構成される。

第一の研究では、酸素依存的なリン酸化酵素である FixL について、酸素分子の感知に重要な構造変化を明らかにした。酸素分子の結合状態と非結合状態のタンパク質構造の紫外共鳴ラマン分光法を用いて調べ、両者では、ヘムを保持している α ヘリックスとそれに近接した β シートの間の水素結合を介した相互作用が異なることを見いだした。さらに、この水素結合を失うと、酸素依存的な酵素活性制御が低下することを明らかにした。これらを基にして、酸素依存的な酵素活性の制御機構を提案した。第二の研究では、ヘムに結合した酸素分子の脱離に伴うタンパク質の構造ダイナミクスを調べた。野生型と変異体の結果との比較から残基単位でのナノ秒からマイクロ秒にわたる変化の時定数を求めた。得られた時定数は二つのドメインをまたがって近い値を持つこと、ヘムを含むドメインだけでは構造変化の速度が一桁速いことから、二つのドメインが互いに連動することによって構造変化を効率的に伝えていることが示唆された。第三の研究では、ドメイン間の連動性が PAS キナーゼタンパク質一般に共通して見られる性質であるかを調べるために、PAS モチーフをもつ他のセンサータンパク質とドメイン交換した人工タンパク質を新たに作製した。酸化還元センサータンパク質のセンサードメインを FixL の酵素ドメインと融合したタンパク質では、酸化還元依存して酵素活性を制御することに成功した。さらに、FixL とこの融合タンパク質では、酸素分子の脱着あるいは電子の授受に対して類似の構造変化を示すことを明らかにした。これは新規タンパク質の創成と詳細な構造解析とを組み合わせた独創的な研究であり、その成果はタンパク質の連動性に共通した機構があることを示す重要なものである。

本論文の研究成果は、タンパク質の構造と活性の測定に基づき、機能に重要な連動的構造変化の機構を明らかにしたものであり、タンパク質の物理化学研究として意義深い。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。