

論文審査の結果の要旨

岡島 公司

本論文「Analysis of cyanobacterial BLUF type photoreceptor PixD」(シアノバクテリアにおける BLUF 型光受容体 PixD の解析)は、3章構成で、第1章: PixD タンパク質の生化学的性質の比較解析、第2章: PixD タンパク質の部位特異変異導入による解析、第3章: PixD タンパク質のシグナル伝達となっている。

第1章では、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 の TePixD と常温性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の SyPixD の全長をそれぞれ大腸菌で His タグ融合タンパク質として発現、精製した。ゲル濾過カラムの解析により TePixD および SyPixD はそれぞれ約 100 kDa で 5~6 量体、40 kDa で、2 量体を形成していた。タンパク質の熱安定性を検討したところ、好熱菌由来である TePixD は 90°C, 10 min の処理でも安定であるのに対し、SyPixD は 60°C, 5 min の処理で変性した。TePixD と SyPixD は青色光照射によって吸収スペクトルが約 10 nm 長波長側にシフトし、その後暗所で数秒の半減期で元の状態に戻った。これらの光反応は BLUF ドメインに特徴的な変化とほぼ同じであった。TePixD と SyPixD に結合しているフラビンのジチオナイトによる還元を測定したところ、メチルビオローゲンが共存したときのみ速やかに還元された。これはフラビンのイソアロキサジン環がタンパク質の疎水的環境に存在することを示す。以上の結果は、PixD が他の BLUF タンパク質と同様に青色光受容体として機能していることを示唆している。また、好熱性シアノバクテリア由来の TePixD は熱的に非常に安定であり、構造解析や生化学的解析に適していることを示している。

第2章では、共同研究によって決定した TePixD の結晶構造に基づく部位特異的変異導入の効果を解析した。2.0Å の分解能で決定した X 線結晶構造解析によれば、TePixD は環状の 5 量体が面と面で重なった 10 量体を形成していた。BLUF ドメインは 5 本のシートとそれに平行な 2 本のヘリックスで構成されてい

た。C末端側のドメインは2本の平行なヘリックスからなり、シートに直交していた。フラビンのイソアロキサジン環は BLUF ドメインの2本のヘリックスの間に挟まり、保存されたアミノ酸残基で保持されていた。とくに、イソアロキサジン環の反応性を左右する N5, O4, O2 はそれぞれ Gln50 と Asn32、Asn31 と水素結合で相互作用し、Gln50 は Tyr8 とも相互作用していた。この構造はフラビン結合ドメインとして新規であるが、ヘリックスとシートの間隙に挿入されたイソアロキサジン環が O4 や O2 で Asn 残基と水素結合をつくる基本構造は Phototropin とよく似ており、一種の収斂進化と考えられる。

これらの構造に基づいて、His タグ融合タンパク質でアミノ酸変異を導入した。まず、野生型 TePixD の時間分解吸収変化とフーリエ変換赤外分光解析から、光励起後 50 ns 後には約 10 nm の長波長シフト状態が形成されており、フラビンのイソアロキサジン環の O4 とアポタンパク質との間の水素結合が強くなっていることが示された。O4 や O2 と相互作用しているアミノ酸残基 Asn32 と Asn31 に変異を導入した N32A、N32Q、N31A、N31Q ではその光反応性にはほとんど影響が見られなかった。なお、Asn32 が O4 と水素結合していること、N32Q では暗反転が非常に遅くなることが明らかになった。一方、O4 と N5 と相互作用している Gln50 に変異を導入した Q50A では光応答性が低下した。これは、Gln50 が光による長波長シフトに重要なアミノ酸残基であることを示している。また Gln50 と水素結合している Tyr8 に変異を導入した Y8A と Y8F および Gln50 に変異を導入した Q50N では、は定常光照射により長波長シフトは起こらず、代わりにフラビンの退色を起こした。また、時間分解吸収変化では、光照射後 50 ns でフラビンの三重項励起状態の形成が見られ、野生型とは全く異なっていた。以上の結果は、光照射によって Gln50 の側鎖と O4 との水素結合が強くなること(水素結合の改変) BLUF ドメインとしての光反応性が Tyr8 と強い相互作用をしている Gln50 の側鎖とフラビンのイソアロキサジン環の反応性に深くかかわる O4、N5 との間の水素結合 (Tyr8-Gln50-O4/N5 ネットワーク) によって決定していると考えられる。

第3章では、SyPixD の下流のシグナル伝達と生理機能を解析した。酵母ツーハイブリッド解析により、*Synechocystis* の全タンパク質ライブラリーをスクリーニングして、SyPixD と相互作用する相手として、Slr1693 (SyPixE) を見いだした。この相互作用はツーハイブリッドの方向を逆にしても同様に得られた。また、青色光照射下ではこの相互作用が失われた。これを確認するために、

クロマトグラフィーによるプルダウン実験を行った。タグのない SyPixD と His タグを融合した His-SyPixE を混合した大腸菌破碎上清からニッケルアフィニティーカラムを用いて His-SyPixE を単離したところ、暗所では His-SyPixE とともに SyPixD がおよそ 1:2 の割合で一緒に単離されてきた。一方、青色光照射下では His-SyPixE しか単離されなかった。また、光照射の後、暗所に戻すと、再び SyPixD と His-SyPixE の複合体が単離されてきた。これらの結果は、暗所では基底状態の SyPixD は、SyPixE と複合体を形成し、青色光照射下では励起状態の SyPixD が SyPixE から解離することを示しており、SyPixD が青色光依存的に SyPixE との相互作用を調節していることを示している。

Synechocystis の野生株は寒天プレート上で赤色光に対して光源に向かって進む正の走光性を示すことが知られている。この赤色光への走光性に対して方向性のない青色光照射を行うと正の走光性が抑制をされた。一方、*pixD* 遺伝子破壊株は青色の有無に関わらず赤色光から逃げる負の走光性を示した。*Synechocystis* の走光性は正と負の 2 つの制御系のバランスによって決まっていると考えられるので、赤色光下では青色光受容体 SyPixD は基底状態にあり、SyPixE と結合し、結果として負の走光性を抑制もしくは正の走光性を促進している可能性が考えられる。また、青色照射条件で、SyPixD から解離した SyPixE が正の走光性を抑制する可能性も考えられる。どのモデルにおいても、SyPixD は青色の有無で走光性を調節する青色光受容体と考えられる。

以上の結果は、シアノバクテリアの BLUF 型光受容体 PixD が青色光受容体であること、その光受容機構に Tyr8-Gln50-O4/N5 ネットワークが重要であること、*Synechocystis* においては走光性を調節する青色光受容体として SyPixE を介した新しい走光性の調節経路があることを示している。このような知見は、フラビン型光受容体の新規の光受容のしくみと生理作用を分子レベルで理解する上で大きな貢献をもたらした。

なお、本論文の第 1 章は、吉原静恵、福島佳優、耿曉星、片山光徳、東正一、渡辺正勝、佐藤修正、田畑哲之、柴田穰、伊藤繁、池内昌彦との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究の立案、遂行を行っており、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定した。