

## 論文審査の結果の要旨

石塚 量見

### 本論文

Studies on cyanobacteriochrome TePixJ from a thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1  
(好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1のシアノバクテリオクロムTePixJの研究)

は、3章構成である。第1章では、シアノバクテリアの光受容体タンパク質 TePixJ の調製と発色団の同定、第2章では、発色団フィコビオロビリンのタンパク質内部での生成(異性化)の解析、第3章では、立体構造の結晶解析と部位特異変異導入解析を記述しており、新規光受容体 TePixJ の特性の分子機構を明らかにした。

1章: 好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 の新規光受容体 TePixJ を、常温性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の SyPixJ1 のホモログとして、その熱安定性を期待して研究対象に選んだ。シアノバクテリアにおける大量発現システムを構築し、これを用いて強力なプロモータによって発現させた。この方法によって、色素を結合したホロタンパク質として TePixJ を大量調製することに成功した。このホロタンパク質は青色光と緑色光照射によって青色光吸収型と緑色光吸収型の間の可逆的な光変換を示した。その吸収ピークは、青色光吸収型が 433 nm、緑色光吸収型が 531nm であった。先行研究の SyPixJ1 は純度、収率が充分でなく、光変換の概略しか報告されていないが、今回初めてそれぞれの絶対吸収スペクトルを決定した。また、両者の差スペクトルを厳密に決定し、SyPixJ1 とほぼ同じであることを示し、さらに詳しい特性を明らかにした。また、ペプチドに分解して色素結合ペプチドを単離し、質量分析を行い、開環テトラピロールが GAF ドメイン内部に保存されたシステイン残基に結合していることを同定した。また、開環テトラピロールは分子量 586 であり、シアノバクテリアにもっとも普遍的に存在するフィコシアノビルリンと一致していた。

酸性尿素変性後の光変換差スペクトル解析を行ない、TePixJ に結合している発色団は質量分析から予測したフィコシアノビルンではなく、フィコビオロビルンであることを明らかにした。フィコビオロビルンはフィコシアノビルンのひとつの二重結合(C5=C6)が C2=C3 へ移動した異性体であり、フィコシアノビルンよりも約 90 nm 短波長の光を吸収する。つまり、フィコビオロビルンを結合することは青/緑色光吸収型の TePixJ の分光特性を決定する重要要因であると結論した。

第2章: *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 はフィコシアノビルンを合成できるがフィコビオロビルンはもたず、また合成酵素の遺伝子もゲノムに存在しない。しかし、TePixJ がフィコビオロビルンを合成する可能性を考慮し、in vivo と in vitro での再構成を試みた。まず、フィコシアノビルンを合成する遺伝子を発現する大腸菌で TePixJ アポタンパク質を共発現し精製した。このタンパク質は色素を結合し本来の TePixJ とよく似た分光特性を示したが、酸性尿素変性後の光変換差スペクトルはフィコシアノビルンとフィコビオロビルンの混在を示した。これは、大腸菌内で合成されたフィコシアノビルンがフィコビオロビルンへ異性化されるが充分ではないことを示している。この異性化反応を追跡するため、化学合成したフィコシアノビルンを用い、in vitro 再構成を行った。アポタンパク質とフィコシアノビルンを混合すると、1分以内に吸収スペクトルはシフトし、部分的に光変換活性をもった青色光吸収型が形成された。これに青色光を照射すると、緑色光吸収型を形成した。その差スペクトル解析から、青色光吸収型は本体の TePixJ の青色光吸収型とよく似ているが、緑色光吸収型の吸収ピークの幅は広く光変換の量子収率も低かった。酸性尿素変性の解析から再構成初期の標品に既にフィコシアノビルンが共有結合しているが、異性化は全く起こっていなかった。この標品を 50 度で保温すると、緑色光吸収型のスペクトルは本来のものに近くなり、発色団の大半がフィコビオロビルンに異性化していた。このことはフィコシアノビルンが TePixJ アポタンパク質に共有結合した後でゆっくりとフィコビオロビルンへ異性化されることを示している。in vitro 再構成直後の標品が本来の青色光吸収型とほぼ同じ吸収を示すことは、フィコビオロビルンを結合することの他にも青色光吸収型になる原因があることを示唆している。アミノ酸配列を調べると、色素と共有結合するシステイン残基以外に青/緑色光吸収型シアノバクテリアオクロムのみ保存された第2のシステイン残基が存在している。システイン残基の挙動をフーリエ変換赤外分光法によって解析し、緑色光吸収型で存在する SH 伸縮振動が青色光吸収型では可逆的に消失することを見いだした。また、保存さ

れた第2のシステイン残基に変異を導入すると、フィコシアノビルリンを共有結合できるが、光変換もフィコビオロビルリンへの異性化も起こらなくなった。これらのことから、発色団と第2のシステイン残基のSH基との可逆的な結合解離が、光変換反応に必須であると結論した。

第3章：TePixJの緑色光吸収型の結晶化に成功し、その立体構造を分解能2.0 Åで決定した。このタンパク質は結晶化で生じたと思われる分子間ジスルフィド結合をもっていたが、重要な構造的特徴を見いだした。まず、タンパク質の全体構造はβシートをαヘリックス群が両側から挟んでいて、片側に発色団が埋め込まれており、既知のバクテリオフィトクロムとよく似ていた。次に、発色団の構造を詳細に検討し、確かにフィコビオロビルリンであり、ピロールA環が大きくねじれており、ピロールD環はC15=16がE型に回転していた。さらに発色団とアポタンパク質の間には多数の特徴的な水素結合のネットワークがあり、発色団の構造を安定化していた。これらの構造から推測される重要な残基を選定し、変異導入解析を行った。アスパラギン酸残基492はピロール環中央に配位した水分子（ピロール水）とD環に水素結合しており、これをアラニンに置換すると、光変換は起こるがフィコビオロビルリンへの異性化が大きく抑制された。グルタミン酸残基497はピロール水とA環に水素結合しており、これをアラニンに置換すると、異性化反応はほぼ正常であったが、光変換で不活性成分を生じた。発色団に近接し、プロピオン酸側鎖と水素結合しているヒスチジン残基523をアラニンに置換すると赤色光吸収型で光活性をもつものを一部生じた。これらの結果は、TePixJの特異な光変換活性にいくつかの残基の特異的な相互作用が必要であることを示しており、その分子機構の一端が明らかになった。また、本研究の成果は今後の機能解析の重要な分子的基盤となることが期待される。

なお、本論文の第1章は、嶋田崇、岡島公司、吉原静恵、落合有里子、片山光徳、成川礼、河内孝之、池内昌彦との共同研究、第2章は神谷歩、猪股勝彦、鈴木博行、野口巧、成川礼、池内昌彦との共同研究、第3章は村木則史、志波智、栗栖源嗣、成川礼、池内昌彦との共同研究である。しかし、どの場合も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。