

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14479

研究課題名(和文)LOVドメインを用いたプロテインキナーゼ光制御系の構築

研究課題名(英文)Construction of photoregulation system of protein kinase by LOV domain

研究代表者

徳富 哲(TOKUTOMI, SATORU)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・客員教授

研究者番号：90142009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：フォトリロピン(phot)は植物の光屈性などに関わる青色光受容体で、N-末端側にLOV1と2とよばれる光受容ドメインを二つ、C-末端側にはキナーゼをもち、光により活性制御されるキナーゼとして機能する。その活性制御にはLOV2とキナーゼ間に存在するJ α -ヘリックスの構造変化が重要である。このLOV2とJ α -ヘリックスとからなるポリペプチドを用いて、一般的なキナーゼであるプロテインキナーゼAの活性を光制御できる系の構築を試み、部分的な成功を収める一方光制御の分子機構に関する知見を得たが、これを細胞分裂・増殖に関わる鍵キナーゼ、ERK、に適用して細胞機能の光制御を行うには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Phototropin (phot) is a plant blue light receptor that mediates phototropic responses et al. Phot molecule has two photoreceptive domains named LOV1 and 2 in the N-terminal half and the C-terminus forms Ser/Thr kinase and acts as photoregulated protein kinase. It has been shown that conformational changes in Ja-helix residing between LOV2 and kinase domains play a crucial role in the kinase photoregulation. Mimicking this photoregulation mechanism, we tried to create a new photoregulation system of protein kinase A (PKA) using LOV2, Ja-helix and PKA inhibitor peptide (PKI). We succeeded in the light-induced prohibition of PKA by about 60% and also obtained new information regarding the molecular mechanism of the photoregulation. However, this was not applicable to ERK that is a key PKA in the MAP kinase pathway regulating cell growth and mitosis.

研究分野：光生物学

キーワード：フォトリロピン 青色光受容体 セリン/スレオニンキナーゼ 活性光制御

1. 研究開始当初の背景

フォトロピン (phot) は光屈性の光受容体として 1998 年に米国のグループにより見つけられた。その後、日本でスタートした特定領域研究「フォトロピン」により、phot が光屈性以外にも、葉緑体光定位運動や気孔の開口、葉の伸展や形態形成などの光受容体としても働くことが見つけられ、光合成活性の最適化に重要な役割を果たすことが明らかになった。これらの研究成果を基に、次の特定領域研究「LOV 光受容体」がスタートし、これらの光制御機構の解明および新たな phot 類似光受容体の探索が行われ、同研究は 2009 年度をもって終了した。報告者はこの二つの研究に計画班代表として携わり、これらのタンパク質の光受容分子機構を研究し多くの研究成果を論文発表した。phot は N-末端側に LOV とよばれる光受容ドメインを二つもち、C-末端側は Ser/Thr・キナーゼとなっている。phot は青色光により活性制御される Ser/Thr・キナーゼである。報告者らは様々なコンストラクトの phot 試料を用いたキナーゼ解析系を作り、1) constitutive な活性をもつ phot キナーゼを LOV2 が光制御すること、2) LOV1 はその際の光感度調節すること、などを見つけた。その後、発足した新学術領域研究「植物環境感覚」の計画班代表として研究を継続し、LOV ドメインの光反応、分子構造、光反応にともなう構造変化を明らかにした。その中で、キナーゼ活性制御に関わる主要な分子構造変化は LOV2 とキナーゼドメインの間のヒンジ領域に起こり、活性化には特に LOV2 の C-末端側に存在する J α -ヘリックスの光反応にともなうアンフォールディングが重要であることを示した。これらの研究結果を基に、LOV2+ヒンジ・モジュールを用いて phot 以外の Ser/Thr・キナーゼの活性制御を行えないかと考え、これにチャレンジしたが成功しなかった。新学術領域研究の終了を機会に再チャレンジを考え申請を行った。

2. 研究の目的

この phot キナーゼの光による活性制御機構を応用して、まず 1) in vitro のプロテインキナーゼ A (PKA) 活性の光制御系を作る。2) 得られた情報を基に、動物細胞の EGF (上皮成長因子) および NGF (神経成長因子) 刺激応答に関わる MAP キナーゼ・カスケード中の鍵キナーゼである ERK 活性を光制御できる in vitro 系を構築する。3) もしこれに成功すれば、神経系株化培養細胞 PC12 に組み込み、EGF 応答反応である細胞増殖および NGF 応答反応である細胞分化の、二つの異なる細胞機能を光によりコントロールできる系の作製を目ざすこととした。

3. 研究の方法

目的 1) に関しては J α -ヘリックスの構造変化を応用して、2 種類の PKA キナーゼ活

性光制御系の開発を試みた。1 番目はシロイヌナズナ phot2 の LOV2 とその J α -ヘリックスの C-末端に、PKA の活性阻害ペプチドである PKI を結合したタンパク質 (LOV2-J α -PKI タンパク質) を作製し、光照射にともなう J α -ヘリックスの構造変化により PKI を PKA と相互作用させて活性阻害を引き起こす、という方法である。2 番目は PKI を LOV2 と J α -ヘリックスの間に挿入して (LOV2-PKI-J α タンパク質) 同様な光による PKA の活性阻害を引き起こす系を用いる方法である。PKA の活性測定には HeLa 細胞由来 PKA と蛍光色素標識 18 ペプチド基質を用いる Pep-tag assay キット (プロメガ) を用いた。目的 2) に関しては PKA と同様な系の作製を ERK について行った。ERK の活性化には、Thr と Tyr の二重特異性をもった MAPK キナーゼ (MAPKK) である MEK (MAP kinase/ERK kinase) による Thr183 及び Tyr185 のリン酸化が必要なので、リン酸化 ERK 試料は自前で調製もしくは購入して使用し、PKI としてはよく知られている MEK1 N 末端の 13 アミノ酸を含むペプチドを用いることとした。当時 ERK の Pep-tag assay 系は使用できるものが無いので、基質のリン酸化をリン酸化 Ser/Thr 抗体による検出あるいは Phos-tag 電気泳動により検出を試みた。以上 1) 2) の研究の際に、同時に様々な生物物理学的、生化学的、分子生物学的手法を用いてその光制御機構を調べ、得られた情報をフィードバックしてさらに効率の良い光制御能をもつ分子の作製を試みることにした。3) に関しては、そこまで研究が進捗しなかったため割愛する。

4. 研究成果

目的 1) に関しては、2 番目の PKI を LOV2 と J α -ヘリックスの間に挿入した (LOV2-PKI-J α タンパク質) を用いて、青色光照射により PKA のキナーゼ活性を約 60% 阻害する系の作成に成功したが、目的とする 90% 以上の阻害効果には届かなかった。また、同様な研究結果が先に論文発表されたために、この成果を論文の形にできなかった。その代わりに目的としたキナーゼ活性光制御機構を生物物理学的、生化学的、分子生物学的手法を用いて調べた結果以下の二つの重要な発見を行い、これらを論文 2 報で発表した。キナーゼ活性制御に LOV2 ドメインコアの N-末端側に存在する A' α と呼ばれる短い α -ヘリックスと LOV2 コアの間 GAP と命名した部分が重要な役割を果たす。J-ヘリックスの C-末端側のキナーゼドメインとの間に短い 2 つの α -ヘリックスをもつモジュール、LAM と命名、が存在し、これもキナーゼ光制御に重要な役割を果たす。しかし目的 2) に関しては、ERK のキナーゼ活性光制御系の構築に成功しなかったため、目的 3) の研究には至らなかった。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8件)

フォトリポピン LOV 光反応機構に関する研究原著論文

1. Iwata, T., Nozaki, D., Yamamoto, A., Koyama, T., Nishina, Y., Shiga, K., Tokutomi, S., Unno, M. and Kandori, H. Hydrogen Bonding Environment of the N3-H Group of FMN in the LOV domains of Phototropins. *Biochemistry* 査読有、Epub ahead of print、2017、DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00057 (2017)
2. Kuroi, K., Sato, F., Nakasone, Y., K., Zikihara, Z., Tokutomi, S. and Terazima, M. Time-Resolved Fluctuation during the Photochemical Reaction of a Photoreceptor Protein: Phototropin1 LOV2-Linker. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 査読有、18巻、2016、6228-6238, doi: 10.1039/c5cp07472
3. Takemiya, S., Doi, A., Yoshida, S., Okajima, K., Tokutomi, S. and Shimazaki, K. Reconstitution of initial steps of phototropin signaling in stomatal guard cells. *Plant Cell Physiol.* 査読有、57巻、2016、152-159 doi:10.1093/pcp/pcv180
4. Kashojiya, S., Yoshihara, S., Okajima, K. and Tokutomi, S. The linker between LOV2- α and STK plays an essential role in the kinase activation by blue light in Arabidopsis phototropin1, a plant blue light receptor. *FEBS Lett.* 査読有、590巻、2015、139-147 doi:10.1002/1873-3468.12028
5. Kashojiya, S., Okajima, K., Shimada, T. and Tokutomi, S. Essential role of the A' α /A β gap in the N-terminal upstream of LOV2 for the blue light signaling from LOV2 to kinase in Arabidopsis phototropin1, a plant blue light receptor. *PLOS ONE*, 査読有、10巻、2015、e0124284. doi: 10.1371/journal.pone.0124284

PixD光反応機構に関する研究原著論文

6. Kuroi, K., Okajima, K., Ikeuchi, M., Tokutomi, S., Kamiyama, T. and Terazima, M. Pressure-sensitive Reaction Yield of the TePixD Blue-light Sensor Protein. *J. Phys. Chem.* 査読有、119巻、2015、2897-2907 doi: 10.1021/jp511946u

フィトクロム光受容機構に関する研究原著論文

7. Yoshitake, Y., Yokoo, T., Saito, H., Tsukiyama, T., Quan, X., Zikihara, K.,

Katsura, H., Tokutomi, S., Aboshi, T., Mori, N., Inoue, H., Nishida, H., Kohchi, T., Teraishi, M., Okumoto, Y. and Tanisaka, T. The effects of phytochrome-mediated light signals on the developmental acquisition of photoperiod sensitivity in rice. *Scientific Rep.* 査読有、5巻、2015、7709 doi: 10.1038/srep07709

植物光受容体に関する総説

8. 徳富 哲、岡島公司、吉原静恵 紫外光から遠赤色光まで、多様な植物光受容体 生物物理 (日本生物物理学会) 査読有、55巻、2015、181-186 doi: 10.2142/biophys.55.181

[学会発表](計 9件)

1. Tokutomi, S. Phototropin, a blue-light regulated protein kinase. 16th Congress of the European for Photobiology, 2015年8月31日~9月4日(Aveiro、ポルトガル) 招待講演
2. Tokutomi, S. Phytochrome interacting factor 3 binds to N-terminal extension of Arabidopsis phytochrome B and prohibit dark reversion. 7th Asia and Oceania Conference for Photobiology, 2015年11月15日~11月18日(台北、台湾) 招待講演
3. 吉原静江、石黒志保、田中大樹、大久保陽子、加川貴俊、西塚順子、岡島公司、徳富 哲「phyC 短波長吸収特性は進化的に保存されている」第57回日本植物生理学会年会、2016年3月18日~3月20日(盛岡)
4. 桂ひとみ、直原一徳、松下智直、河内俊之、長谷あきら、徳富 哲「シロイヌナズナ PIF3 は phyB の N-末端延長配列に結合して暗回帰反応を阻害する」第57回日本植物生理学会年会、2016年3月18日~3月20日(盛岡)
5. 黒井邦巧、岡島公司、池内昌彦、徳富 哲、猪股孝史、神山匡、寺嶋正秀「青色光センサータンパク質 TePixD の高圧下における反応ダイナミクスの解析」第41回生体分子科学討論会、2016年6月6日~6月7日(福岡)
6. 中曽根祐介、岡島公司、相原悠介、長谷あきら、徳富 哲、寺嶋正秀「青色光センサー全長フォトリポピンの光反応」第10回分子科学討論会、2016年9月13日-15日(神戸)
7. 中島 翼、黒井邦巧、中曽根祐介、岡島公司、徳富 哲、寺嶋正秀「圧力でタンパク質の揺らぎと反応を制御する: SyPixD」溶液化学研究会 / 第39回溶液化学シンポジウム、2016年11月9日~11日(つくば)

8. 中曾根祐介、岡島公司、人見研一、John Christie、徳富 哲、寺嶋正秀「異なる生物種におけるフォトトロピン光反応の多様性」第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年 11 月 25 日～27 日（つくば）
9. Nakasone, Y., Okajima, K., Hitomi, K., Christie, J., Tokutomi, S., and Terazima, M. 「Diversity of photo reactions of blue light sensor phototropins among different organisms」新学術領域「動的秩序と機能」第 5 回国際シンポジウム、2017 年 1 月 21 日～22 日（東京）

〔図書〕(計 1 件)

1. 徳富 哲、植物の光受容体「光と生命の事典 第 3 章 光情報の利用 70」(日本光生物学協会 光と生命の事典編集委員会編、朝倉書店)、2016、144-145 頁

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳富 哲 (TOKUTOMI SATORU)
大阪府立大学大学院・理学系研究科・客員教授
研究者番号：90142009

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

居原 秀 (IHARA HIDESHI)
大阪府立大学大学院・理学系研究科・準教授
研究者番号：60254447

(4) 研究協力者

桂ひとみ (KATSURA HITOMI)
大阪府立大学大学院・理学系研究科・研究員