

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06586

研究課題名(和文) 光制御型転写因子を用いた光情報の変換と伝達機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for conversion and transduction of light signal in a light-activatable transcription factor

研究代表者

久富 修 (Hisatomi, Osamu)

大阪大学・理学研究科・准教授

研究者番号：60231544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、代表者らが開発した光制御型転写因子(光ジッパータンパク質、略称PZ)をモデルタンパク質として解析し、LOVドメインによる光情報の変換と伝達の過程を明らかにすることを目的として行った。発色団(FMN)が光により励起すると、複数アミノ酸を介してLOVドメインの構造変化が誘起される。その構造変化は、LOVコアにあるシートの疎水的領域を介してA'ヘリックスがLOVコアから解離する。それにより、LOVドメインの二量体化とbZIPドメインの解離が生じ、結果として、DNA結合性が増大するというAUREO1の光依存的転写活性調節の分子機構が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビタミンB2であるフラビンは、すべての生物に必要な原子団である。フラビンは酸化還元反応を触媒する多くのタンパク質に含まれるとともに、青色光を受容するための光センサータンパク質中に存在することが知られている。光センサーとしてフラビンを利用するタンパク質には、light oxygen voltage (LOV) ドメインという特徴的な領域が存在する。本研究により、オーレオクロームのLOVドメインの光情報の変換と伝達の分子機構が解明された。本研究により得られた知見は、他のフラビンタンパク質の作動原理の解明や、新たな光遺伝学ツールの作成にも有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)： In this study, we attempted to clarify the molecular mechanism of light signal conversion and transduction of AUREO1, using a light-activatable transcription factor (Photozipper) that we developed as a model protein. Our results indicated that light signal received by the chromophore flavin mononucleotide (FMN) induces a conformational change of LOV core through several amino acids close to FMN, which causes the deformation of the hydrophobic surface on the -sheet of LOV core. It subsequently induces the detachment of A' helix flanking to LOV core and the exposes the dimerization surface of LOV core, and result in the increment of its affinity for the target DNA sequence. Our studies strongly suggested the essential mechanism of aureochromes, and may provide valuable insights to understand the molecular mechanisms of other LOV proteins.

研究分野：生物物理学

キーワード：オーレオクローム LOVドメイン フラビン bZIP 光制御型転写因子

1. 研究開始当初の背景

生体内では様々な情報の受容と伝達が行われている。それら情報は、タンパク質全体あるいは一部ドメインの構造変化を誘起し（情報変換）、効果ドメインの活性や他の分子と相互作用の変化を介して（情報伝達）、生理的な応答が引き起こされる（図1上）。それら情報変換や伝達機構の解明は、生物物理学の重要な課題の一つであるが、タンパク質の構造変化や相互作用の変化は動的かつ繊細であるため、十分に理解されている例は限られている。

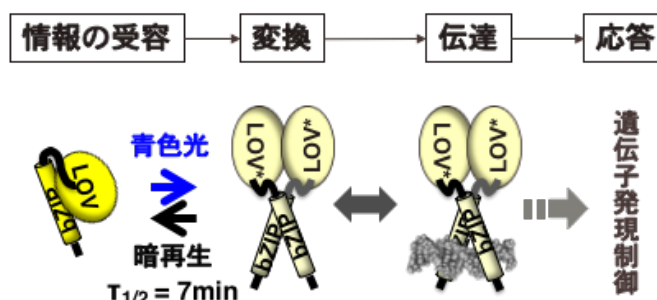


図1. PZによる情報の変換と伝達概念

本研究の代表者らは、光制御型 bZIP タンパク質（光ジッパー）を作成して、光情報の受容と伝達のメカニズムを生物物理学的に解明するとともに、生体内での種々の反応を光制御することを目指して研究を行ってきた。光ジッパー（Photozipper、以下 PZ と略記）は、フシナシミドロ・オーレオクローム 1 (*VfAUREO1*) のコア領域に部位特異的変異を加えたタンパク質で、塩基性ロイシンジッパー (bZIP) ドメインと light-oxygen-voltage (LOV) ドメインにより構成されている（図1下）。LOV ドメインは、発色団として内部にフラビンモノヌクレオチド (FMN) を含有し、青色光を受容して構造変化を起こす。これまでの研究で、代表者らは、PZ が光照射により二量体化して標的 DNA 配列への結合性を増大させることを明らかにした。すなわち、PZ は光情報を変換して遺伝子の活性を調節する「光活性化転写因子」としての機能を持つ。また、PZ は、大腸菌での発現とそこからの精製のシステムも確立しており、生物物理学的解析に適したタンパク質であることが示されている。

2. 研究の目的

(1) PZ の光情報変換機構と LOV ドメインの作動原理の解明

通常、LOV ドメインを持つタンパク質には多様な効果ドメインが存在していて、その活性が光依存的に制御される。そのため、「FMN 近傍で生じる変化がどのように効果ドメインの活性を制御するか」という光情報変換機構の解析は、個々のタンパク質種に依存するものが多い。応募者らは、PZ の効果ドメイン (bZIP ドメイン) の活性を DNA への結合性として定量化する系を作成してきた。そこで、LOV ドメインに部位特異的な変異を加えた PZ を解析して、PZ の光情報変換機構を解明するとともに、LOV タンパク質に共通する作動原理を示

す。

(2) 転写因子複合体の形成・解離の動態の解明

bZIP 型転写因子は、様々な刺激の応答および細胞の分化や増殖などの重要なプロセスを制御することが知られており、細胞生物学的あるいは分子生物学的観点から精力的に研究が進められている。転写因子と標的 DNA 配列との複合体（転写因子複合体）の解析には定性的なものが多いが、応募者らは、PZ 単量体と二量体 (PZ₂) との平衡を定量的に評価する系を構築してきた。さらに、水晶振動子微量天秤法 (QCM) により、PZ₂-DNA 複合体の形成過程で配列特異的な結合が形成される前に中間状態が存在することを示唆した。本研究では、このような転写因子複合体の形成や解離の動態（光情報伝達の分子機構）を明らかにする。

3. 研究の方法

PZ の反応機構の詳細を解明するためには、光反応、二量体化、および DNA 結合性の定量的な解析が必要である。そこで、代表者らがこれまでに構築してきた分光測定、動的な光散乱 (DLS)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、ゲルシフトアッセイ (EMSA)、水晶振動子微量天秤 (QCM) に加え、新たに蛍光偏光 (FP) の測定システムによる DNA 結合性の解析システムを構築した。LOV ドメインに様々な変異を導入した PZ 部位特異的タンパク質をこれらのシステムにより定量的に測定して解析を行った。また、PZ を可逆的に変性して発色団である FMN を他のフラビン誘導体に置換して PZ を再構成する系を構築した。

4. 研究成果

(1) 光励起された発色団(FMN)による LOVドメインのコア領域(LOVコア)の構造変化

LOV ドメインの結晶構造の解析から、暗状態の発色団 (FMN) ではイソアロキサジン環の O4 が Q317 と水素結合を形成していることが知られている。一方、光励起された LOV ドメインの FMN では、イソアロキサジン環の C4 が C254 と付加物を形成し、N5 がプロトン化することが示唆されている。また、FMN の近傍に存在する F298 が構造変化することも示唆されている。これらのアミノ酸を部位特異的に置換し、光反応、二量体化、DNA 結合性などを定量的に解析した。Q317 変異体では、暗明それぞれの状態で単量体型と二量体型が共存することが示された。タンパク質濃度に依存して単量体型と二量体型の存在量に変化したことから、それらが平衡にあることが明らかになった。このことは、Q317 が暗状態で単量体型、明状態で二量体型を安定化していることを意味している。また、F298 をはじめとした他のアミノ酸も協同的に LOV ドメインの構造変化に関与することで、PZ が優れたスイッチング特性

を示すことが明らかになった。さらに、PZ の二量体化と標的 DNA 配列への結合性に正の相関があることが示されたことから、「光は Q317 や F298 など複数の残基を經由して LOV ドメインの構造変化を誘起し、PZ が二量体化して標的配列への結合性が増大する」という機能メカニズムが示唆された。

(2) LOV コアからの情報伝達

LOV コアから情報伝達経路としては、 β シートに存在する疎水性アミノ酸を置換した PZ 変異体 (β シート変異体) と、LOV コアと A' α ヘリックスの間のヒンジ領域のアミノ酸を置換した PZ 変異体 (ヒンジ変異体) を定量的に解析した。ヒンジ領域のアミノ酸置換は PZ の性質に大きな影響を与えなかったことに対し、 β シート変異体では二量体化や DNA 結合性が有意に変化した。このことは、LOV コアからの情報伝達は β シートの疎水性アミノ酸を經由していることを示唆している。そこで、A' α ヘリックスの疎水性アミノ酸残基を置換した変異体 (A' α 変異体) を作成して解析した結果、 β シート変異体と同様に二量体化や DNA 結合性の変化が見られた。これらの実験結果から、FMN が受容した光情報は、LOV コアの β シートの疎水性アミノ酸を經由して A' α ヘリックスの解離を誘導するというオーレオクロームの機能のメカニズムが示唆された。

(3) PZ 二量体の安定性

これまでの研究により、LOV コアの β シートの疎水性領域と、A' α ヘリックスの疎水性アミノ酸残基との相互作用によって、PZ の単量体が安定化していることが示唆された。そこで、PZ の二量体を安定化する条件を検索したところ、PZ の単量体・二量体平衡が高塩濃度で単量体型に移動することが示された。そこで、結晶構造解析から水素結合の可能性が考えられている親水性アミノ酸 (D205, Q213, S321, Y324 など) の部位特異的変位 PZ を作成し、二量体の安定性と DNA 結合性を調べた。その結果、数個の残基による静電的相互作用が、二量体を安定化して DNA 結合性に影響を及ぼすことを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kobayashi Itsuki, Nakajima Hiroto, Hisatomi Osamu	4. 巻 59
2. 論文標題 Molecular Mechanism of Light-Induced Conformational Switching of the LOV Domain in Aureochrome-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2592 ~ 2601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 久富 修	4. 巻 5
2. 論文標題 転写因子と複合体形成のメカニズム	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 消化器病学サイエンス	6. 最初と最後の頁 18-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima, H., Kobayashi, I., Adachi, Y., Hisatomi, O.	4. 巻 11
2. 論文標題 Transmission of light signals from the light-oxygen-voltage core via the hydrophobic region of the α -sheet surface in aureochrome-1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-91497-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akihiro Tsuji, Hayato Yamashita, Kento Nomura, Osamu Hisatomi, Masayuki Abe
2. 発表標題 The nanoscale observation of a light-sensing transcription factor, Photozipper, by High-speed AFM
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Itsuki Kobayashi, Hiroto Nakajima, Osamu Hisatomi
2. 発表標題 Light-induced conformational switching of the LOV domain in aureochrome-1
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroto Nakajima, Itsuki Kobayashi, Osamu Hisatomi
2. 発表標題 Signal transduction from LOV domain to effector domain in PZ
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yumiko Adachi, Hiroto Nakajima, Osamu Hisatomi
2. 発表標題 Hydrogen bonds involved in the light-induced conformational switching of AUREO1-LOV
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiro Tsuji, Kento Nomura, Hayato Yamashita, Osamu Hisatomi, Masayuki Abe
2. 発表標題 High-speed AFM observation on dimer formation of a light-sensing transcription factor, Photozipper
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Osamu Hisatomi
2. 発表標題 DNA-binding analyses of a light-activatable bZIP transcription factor, Photozipper
3. 学会等名 6th Awaji International Workshop on “Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Osamu Hisatomi, Itsuki Kobayashi, Hiroto Nakajima
2. 発表標題 Molecular mechanisms of a light-activatable transcription factor, Photozipper.
3. 学会等名 第41回日本比較生理生化学会東京大会 (jscpb2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kentou Nomura, Hayato Yamashita, Osamu Hisatomi, Masayuki Abe
2. 発表標題 高速 AFM による DNA 結合光受容タンパク質 Photozipper の 1 分子動態イメージング
3. 学会等名 理化学研究所- 広島大学 合同シンポジウム「イメージングから理論」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroto Nakajima, Itsuki Kobayashi, Osamu Hisatomi
2. 発表標題 Hydrophobic residues on the α -sheet of a light-activatable bZIP factor, Photozipper
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Osamu Hisatomi, Samu Tateyama, Itsuki Kobayashi
2. 発表標題 Analyses of the target sequence recognition of a bZIP factor, using a light-activatable Photozipper
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Itsuki Kobayashi, Osamu Hisatomi
2. 発表標題 The role of Gln317 in a light-activatable bZIP module, Photozipper
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kentou Nomura, Hayato Yamashita, Osamu Hisatomi, Masayuki Abe
2. 発表標題 Single molecular dynamics imaging of DNA binding photoreceptor protein, Photozipper, by high-speed AFM
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三野 広幸、佃野 弘幸、小関 康平、小林 樹、久富 修
2. 発表標題 機能性タンパク質Photozipperの構造と反応
3. 学会等名 生体分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村健人, 山下隼人, 久富修, 阿部真之
2. 発表標題 高速AFMによるDNA結合光受容タンパク質Photozipperの1分子動態イメージング
3. 学会等名 第66回近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kento Nomura, Hayato Yamashita, Osamu Hisatomi, Masayuki Abe
2. 発表標題 Single molecule observation of DNA binding photoreceptor protein, Photozipper, by high-speed atomic force microscopy
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Osamu Hisatomi, Yuta Nagano
2. 発表標題 The role of ribitol-phosphate of the chromophore (FMN) in AUREO1
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuta Nagano, Yumiko Adachi, Osamu Hisatomi
2. 発表標題 Photoreaction of Aureochrome-3 in a brown alga, <i>E. siliculosus</i>
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuta Adachi, Hiroto Nakajima, Yuta Nagano, Osamu Hisatomi
2. 発表標題 The role of hydrogen bonds in the stabilization of AUREO1 dimer
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihiro Tsuji, Hayato Yamashita, Osamu Hisatomi, Masayuki Abe
2. 発表標題 High-speed AFM observation on the light-induced dimerization of a bZIP transcription factor, Photozipper
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻 明宏, 山下 隼人, 久富 修, 阿部 真之
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡による光応答転写因子Photozipperの二量体形成メカニズムに関する研究
3. 学会等名 応用物理学会関西支部2021年度第1回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihiro Tsuji, Hayato Yamashita, Osamu Hisatomi, Masayuki Abe
2. 発表標題 High-speed AFM observation on the blue light-induced dimer formation of the transcription factor, Photozipper
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

久富のページ
<http://gabriel.ess.sci.osaka-u.ac.jp/html/hisatomi/hisatomi-jp.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小林 樹 (Kobayashi Itsuki)	大阪大学・理学研究科・大学院生 (14401)	
研究協力者	中島 碩士 (Nakajima Hiroto)	大阪大学・理学研究科・大学院生 (14401)	
研究協力者	足立 裕美子 (Adachi Yumiko)	大阪大学・理学研究科・大学院生 (14401)	
研究協力者	永野 優大 (Yuta Nagano)	大阪大学・理学研究科・大学院生 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------