

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440077

研究課題名(和文) 光二量体化を用いた遺伝子発現と酵素活性の光制御

研究課題名(英文) Photoregulation of gene expression and enzymatic activity by dimerization of LOV protein

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、オーレオクロームのC末側のアミノ酸配列を参考にして、新規タンパク質モジュール(PZ)を作成した。生体分子複合体を計測するシステムを改良して解析を行ったところ、PZは暗状態では単量体として存在するが、青色光により一過的に二量体化してDNAへの結合性を増す「光活性化bZIPモジュール」として機能することが明らかになった。さらに、PZの単量体と二量体の二状態安定化の分子機構を明らかにした。また、蛍光タンパク質と連結したPZが、融合タンパク質中で光活性化bZIPモジュールとして機能することを示し、遺伝子発現や酵素活性の光制御に向けた分子基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：Photozipper (PZ) is a protein module consisting of a bZIP and a LOV domain of AUREO1. We improved measurement systems of biomolecular complexes and investigated PZ. PZ is monomeric in the dark, and blue light induces dimerization of PZ, which subsequently increases its affinity for the target DNA sequence. PZ is, therefore, assumed to be a light-activated bZIP module. Then, we found that an intramolecular interaction between ZIP and LOV probably stabilize monomeric form in the dark state, and that intermolecular interactions of ZIP-ZIP and LOV-LOV stabilizes dimeric form in the light state. PZ fused with fluorescent proteins underwent dimerization and increased its affinity for the target DNA sequence upon illumination. Our results suggested that PZ provide a new approach for regulating the gene expression and enzymatic activities.

研究分野：生物物理学、光生物学

キーワード：光制御 転写因子 光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

黄色植物であるフシナシミドロから発見されたオーレオクロームは、DNA 結合領域である basic leucine zipper (bZIP) ドメインと青色光受容領域である light-oxygen-voltage sensing (LOV) ドメインを持ち、光依存的な分枝反応や生殖器官の形成に関与することが示唆されている (Takahashi *et al.*, 2007)。応募者らは、オーレオクローム 1 (AUREO1) 組換えタンパク質を作成し、それがジスルフィド結合により二量体として単離されることを明らかにしてきた (Hisatomi *et al.*, 2013)。さらに解析を進めた結果、還元的条件下で AUREO1 は単量体として存在し、青色光により可逆的に二量体化することを見いだした。また、N 末領域や DNA 結合部位である塩基性領域を欠失させても、この光依存的な二量体化が観察されたことから、AUREO1 の bZIP-LOV 領域を光二量体化モジュールとして利用することを着想した。

2. 研究の目的

本研究では、まず、繊細な生体分子複合体形成を定量的に解析するシステムの最適化および新規構築を行う。次に、AUREO1 の bZIP-LOV ドメインを改変した (Photozipper、以下 PZ と略記) を作成して、光依存的な二量体化の分子機構を解明するとともに、様々な生体分子の相互作用を光制御するための分子基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 生体分子複合体解析系の構築

これまでに作成した動的光散乱法 (DLS)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、あるいはゲルシフトアッセイ (EMSA) などのシステムを最適化し、定量的な解析を行えるようにする。また、設備備品として新たに水晶振動子微小天秤 (QCM) を導入し、金電極上に DNA を固相化して、光による PZ の DNA への結合を定量的に解析する。

(2) PZ の機能評価とメカニズムの解析

まず、AUREO1 の bZIP-LOV ドメインに対し、二量体化や DNA 結合性を評価する。それと平行して、bZIP-LOV ドメインをコードする遺伝子を全合成して、発現に適したコドンの改変と部位特異的アミノ酸置換を行い、酸化的条件下でも暗中で単量体として存在する組換えタンパク質 (PZ) を作成する。また、PZ の二量体化や DNA 結合性を *in vitro* で評価する。

次に、PZ の塩基性 (basic) 領域、ロインジッパー (ZIP) 領域、リンカー領域までを削除した PZ タンパク質を用い、DNA との結合と二量体化に必要な領域を絞り込むことで、PZ の分子機構を明らかにする。

(3) 蛍光タンパク質を用いた機能評価

PZ に YFP もしくは mCherry を連結した融

合タンパク質に対し、青色光を照射した際に生じる変化を解析する。さらに、YFP-PZ と mCherry-PZ の FRET を観測することで、二量体化や DNA との結合を調べ、PZ の光スイッチとしての機能評価を行う。

(4) 遺伝子発現や酵素活性の光制御

PZ を光二量体化モジュールとして利用し、GFP 断片から蛍光性 GFP を再構成する BiFC 法を用いた実験を行う。また c-Jun や bHLH-Zip 型転写因子である Max との融合タンパク質を作成して、光依存的な二量体化と DNA への結合性の変化を解析する。

4. 研究成果

(1) 生体分子複合体解析系の構築

申請者はこれまでに動的光散乱法 (DLS) やサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) などの手法を用いて AUREO1 の bZIP-LOV ドメインの粒径や分子量の変化を調べてきた。しかし、それぞれの手法から得られる結果を定量的に比較検討した研究はほとんどない。そこで、球状タンパク質を用いて、SEC、DLS、静的光散乱 (SLS) により得られる粒子系の比較解析を行った。この解析により、それぞれの手法により得られたサイズの比較が可能となり、分子量推定の精度も向上した (雑誌論文 1)。

さらに、QCM の金電極上に中性アビジンを固定し、水中でビオチン化したオリゴヌクレオチドと反応させた。さらに、溶液中に PZ を加えて光照射したところ、共鳴周波数の減少が観測された。このことから、PZ が金電極上の DNA と複合体を形成したことが示唆された (図 1、学会発表 25)。

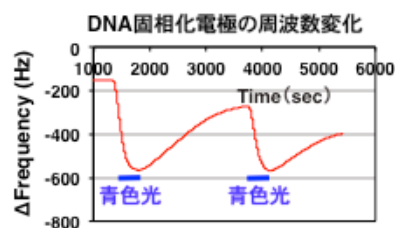


図 1. QCM による PZ の DNA へ結合解析

(2) PZ の機能評価とメカニズムの解析

本研究の申請時では、レドックス条件と AUREO1 の単量体・二量体平衡との関連性、光による AUREO1 の DNA 結合性の変化を示すことができていなかった。そこで、SEC を用いて単量体・二量体平衡を解析する系を構築し、その酸化還元電位中点が -245mV 程度であることを明らかにした。また、蛍光標識した DNA を用いることで、青色光照射により還元的環境下で AUREO1 が一過的に二量体化し、DNA への結合性が増加することを示した (図 2、雑誌論文 2,3)。

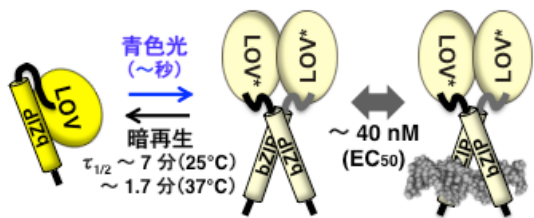


図2. PZ の二量体化と DNA へ結合の概念図

同様に、PZ が酸化的条件下でも暗状態では単量体として存在し、青色光照射により二量体化して DNA への結合性を増すことが明らかになった (図2)。さらに、N 末側を順次削除した一連の PZ 変異体シリーズを作成し、暗状態での二量体化の平衡定数を見積もった。その結果、ZIP 領域を持つ PZ の二量体の解離定数は 130 μ M 程度で、単量体が安定であることに対し、ZIP 領域を持たないものの解離定数は約 30 μ M で、単量体が不安定化することが示唆された。また、それぞれの変異体を蛍光標識して FRET を測定することで明状態での二量体の解離定数を見積もったところ、ZIP 領域を持つものは 120nM 程度であるのに対し、持たないものは 600nM 程度であった (図3)。これらの結果から、PZ は暗状態では ZIP-LOV 間の分子内相互作用により単量体型が、明状態では ZIP-ZIP および LOV-LOV の分子間相互作用により二量体型が安定化し、光スイッチとして機能していることが示唆された (雑誌論文 4)。

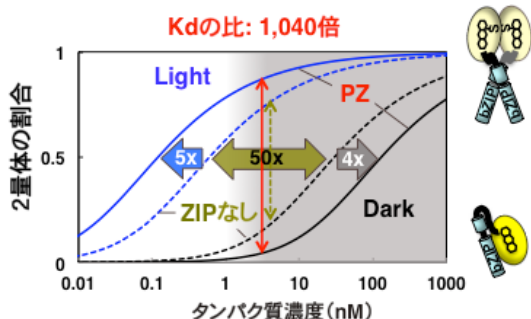


図3. PZ の二量体化と DNA へ結合の概念図

(3) 蛍光タンパク質を用いた機能評価

PZ の N 末もしくは C 末に蛍光タンパク質を連結した融合タンパク質を作成し、光反応、二量体化、DNA への結合性を解析した。蛍光タンパク質としては、YFP および mCherry を用いた。これらの融合タンパク質はいずれもそれぞれの蛍光タンパク質に由来する吸収・蛍光スペクトルを持ち、また、LOV ドメインに特徴的な吸収スペクトル変化を示した。また、DLS および SEC によりこれら融合タンパク質を解析したところ、いずれも青色光依存的に二量体化し、DNA への結合性を増すことが示された (図4、雑誌論文 5)。また、FRET 測定の結果から、全ての融合タンパク質の組み合わせで、ヘテロ二量体が生じていることが示唆された。以上の結果から、

融合タンパク質中でも PZ の機能は保たれており、タンパク質の二量体化や DNA 結合性を光制御するための分子ツールとして有用であることが示唆された (学会発表 16)。

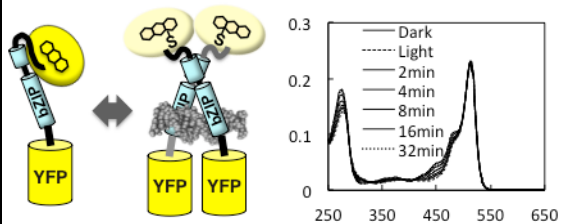


図4. YFP 融合 PZ の反応

(4) 遺伝子発現や酵素活性の光制御

PZ を光二量体化モジュールとして利用し、GFP 断片から蛍光性 GFP を再構成する BiFC 法を用いた実験を行った。大腸菌中での BiFC 法の成功例が公表されていたので

(<https://www.osakafu-u.ac.jp/osakafu-content/uploads/sites/344/k1306.pdf>)、その内容に従い条件を設定したが、蛍光は観察されなかった。今後さらに情報収集を行うとともに、条件の最適化を進める予定である。また、c-Jun の DNA 結合領域を持つ融合タンパク質を複数種作成し、そのうちの一種が青色光依存的に二量体化し、DNA への結合性を増すことが示された (図5)。

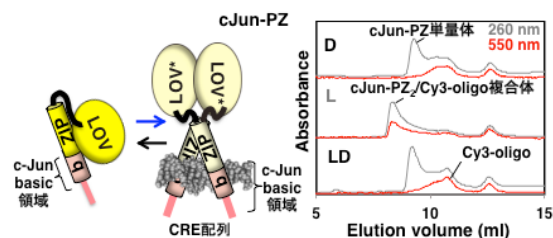


図5. c-Jun 融合 PZ の反応

さらに bHLH-Zip 型転写因子である Max の bHLH 領域を持つ融合タンパク質も作成し、光依存的に二量体化して E-box 配列に結合する融合タンパク質を見いだしている。そこで、今後、これらの融合タンパク質の結合配列特異性を解析し、様々な生物種内に導入して機能解析を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Takeuchi, K., Nakatani, Y., Hisatomi, O. (2014) Accuracy of protein size estimates based on light scattering measurements. *Open J. Biophys.*, 4, 83-91.
- (2) Hisatomi, O., Nakatani, Y., Takeuchi, K., Takahashi, F., Kataoka, H., (2014) Blue light-induced dimerization of monomeric aureochrome-1 enhances its affinity for the

- target sequence. (査読有) *J. Biol. Chem.* **289**, 17379–17391.
- (3) 久富 修 (2014) bZIP 型転写因子の光制御機構とその応用 (査読有) *生物物理*, **54**, 307-310.
 - (4) Nakatani, Y., Hisatomi, O. (2015) Molecular mechanism of Photozipper, a light-regulated dimerizing module consisting of the bZIP and LOV domains of Aureochrome-1. (査読有) *Biochemistry*, **54**, 3302-3313.
 - (5) Hisatomi, O., Furuya, K. (2015) A light-regulated bZIP module, Photozipper, induces the binding of fused proteins to the target DNA sequence in a blue light-dependent manner. (査読有) *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 1998-2006.
 - (6) Akiyama, Y., Nakasone, Y., Nakatani, Y., Hisatomi, O., Terazima, M. (2016) Time-resolved Detection of Light-induced Dimerization of Monomeric Aureochrome-1 and Change in Affinity for DNA. (査読有) *J. Phys. Chem. B.* **120**, 7360-7370.
- [学会発表] (計 29 件)
- (1) Hisatomi, O. (Invited talk) Photocontrolled DNA-binding of a bZIP protein. 2nd Awaji International Workshop on “Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications (AWEST 2015)” (2014. 10. 5-10) Awaji Island, Japan.
 - (2) Hisatomi, O., Nakatani, Y., Kai, Y. (Oral) A photo-activated basic-leucine zipper module, opZL. “International Conference of Retinal Proteins 2014” (2014. 10. 5-10) Nagahama, Japan.
 - (3) Hisatomi, O., Nakatani, Y., Kai, Y. (Poster) Functional evaluation of the light-induced dimerizing module, Photodimerizer, fused with fluorescent proteins. (蛍光タンパク質との融合による光二量体化モジュール (Photodimerizer) の機能評価) 第 52 回日本生物物理学会年会、2014. 9. 25-27、札幌
 - (4) Nakatani, Y., Hisatomi, O. (Poster) Molecular mechanism for dimerization of the light-regulated bZip module, Photodimerizer. (光制御型 bZip モジュール Photodimerizer の二量体化分子機構) 第 52 回日本生物物理学会年会、2014. 9. 25-27、札幌
 - (5) Akiyama, Y., Nakasone, Y., Hisatomi, O., Nakatani, Y., Terazima, M. (Poster) Reaction Dynamics of Light Dependent Transcription Factor Aureochrome-1. (光依存転写因子オーレオクロム1の反応ダイナミクス) 第 52 回日本生物物理学会年会、2014. 9. 25-27、札幌
 - (6) Hisatomi, O. (Invited talk) Characterization of an engineered photoactivatable bZIP module, Photozipper. (3rd AWEST 2015) (2015. 6. 14-16) Awaji Island, Japan.
 - (7) Nakatani, Y., Hisatomi, O. (Poster) Molecular mechanism of Photozipper, a light-regulated bZIP module. AWEST 2015, (2015. 6. 14-16) Awaji Island, Japan.
 - (8) Hisatomi, O., Furuya, K. (Poster) A light-activatable bZIP module, Photozipper, induces the binding of fused proteins to the target sequence in a blue light-dependent manner. AWEST 2015, (2015. 6. 14-16) Awaji Island, Japan.
 - (9) Hisatomi, O., Yabe, Y., Nakatani, Y. (Oral) Evaluation of DNA-binding of a light-activatable bZIP module, Photozipper. (光活性化 bZIP モジュール Photozipper の DNA 結合性)、第 53 回日本生物物理学会年会、2015. 9. 13-15、金沢
 - (10) Nakatani, Y., Hisatomi, O. (Oral) Molecular mechanism of Photozipper, a light-regulated bZIP module (光制御型 bZIP モジュール Photozipper の分子機構)、第 53 回日本生物物理学会年会、2015. 9. 13-15、金沢
 - (11) Furuya, K., Hisatomi, O. (Poster) Analyses of a light-regulated bZIP protein, Photozipper, fused with YFP and mCherry (YFP および mCherry と融合させた光制御型 bZIP タンパク質 (Photozipper) の解析)、第 53 回日本生物物理学会年会、2015. 9. 13-15、金沢
 - (12) Yabe, Y., Nakatani, Y., Hisatomi, O. (Poster) Dark regeneration kinetics of site-directed mutants of bZIP module, Photozipper (部位特異的変異体を用いた bZIP モジュールである Photozipper の戻り反応の評価)、第 53 回日本生物物理学会年会、2015. 9. 13-15、金沢
 - (13) Hisatomi, O. (Poster) Regulation of a bZIP transcription factor by light (bZIP 型転写因子の光制御) 第 40 回日本比較内分泌学会・第 37 回日本比較生理生化学会 合同大会、2015. 12. 11-13、広島
 - (14) Kojima, K., Matsutani, Y., Yamashita, T., Yanagawa, M., Imamoto, Y., Yamano, Y., Wada, A., Hisatomi, O., Shichida, Y. (Poster) Thermal isomerization rate of retinal chromophore in blue-sensitive cone pigments expressed in amphibian green rods. 16th International Conference on Retinal Proteins (ICRP2016), 2016. 10. 2–7, Potsdam, Germany.
 - (15) O. Hisatomi (Invited talk) Blue light-induced DNA binding of an engineered bZIP module, Photozipper. AWEST 2016, 2016. 6. 19-22, Awaji Island, Japan
 - (16) Hisatomi, O., Nakatani, Y. (Poster) Molecular mechanisms of a light-activatable bZIP module, Photozipper. AWEST 2016, 2016. 6. 19-22, Awaji Island, Japan

- (17) Nakatani, Y., Hisatomi, O. (Poster) Quantitative analyses of the Photozipper/DNA complex formation. AWEST 2016, 2016. 6. 19-22, Awaji Island, Japan
- (18) Yabuta, H., Kondo, T., Nakashima, S., Sasaki, S., Shibai, H., Terada, K., Toyoda, M., Hirono, T., Hisatomi, O., Saiki, K., Terasaki, T., Uyeda, C., Yamanaka, C., Aoki, J., Hashizume, K., Kawai, Y., Sakaiya, T., Tani, A. Undergraduate education in geochemistry and cosmochemistry at Osaka University, Japan. Goldschmidt Conference, 2016. 6. 26-7. 1, Yokohama
- (19) 久富修、中谷陽一、竹内健 (Oral) 光制御型 bZIP モジュールの機能解析、第 19 回 日本光生物学協会 年会：光生物学協会講演会、2016. 7. 28-29、東大
- (20) 松谷優樹、小島慧一、柳川正隆、山下高廣、今元泰、久富修、山野由美子、和田昭盛、七田芳則 (Oral) 錐体視物質の暗環境適応、第 19 回 日本光生物学協会 年会：光生物学協会講演会、2016. 7. 28-29、東大
- (21) Nakatani, Y., Hisatomi, O. (Poster) DNA-binding of a light-regulated bZIP module, Photozipper. 第 38 回日本比較生理生化学会 (jscp2016) 2016. 9. 2-4、玉川大学、東京
- (22) Matsutani, Y., Kojima, K., Yanagawa, M., Yamashita, T., Imamoto, Y., Hisatomi, O., Yamano, Y., Wada, A., Shichida, Y. (Oral) Optimization mechanism of vertebrate visual pigments for photic environment. 日本動物学会第 87 回大会、2016. 11. 14-19、沖縄
- (23) Ozeki, K., Nagashima, H., Hisatomi, O., Mino, H. (Poster) Reaction mechanism in Photozipper monitored by Electron Paramagnetic Resonance. 第 54 回日本生物物理学会年会、2016. 11. 25-27、つくば
- (24) Nakatani, Y., Hisatomi, O. (Poster) The quantitative analyses for the DNA binding of Photozipper. 光制御 bZIP モジュール Photozipper の DNA 結合反応の定量的解析、第 54 回日本生物物理学会年会、2016. 11. 25-27、つくば
- (25) Tateyama, S., Hisatomi, O. (Poster) The DNA-binding of a light-regulated bZIP module, photozipper, analyzed by quartz crystal microbalance. 水晶微量天秤による光制御型 bZip モジュール photozipper の DNA 結合の解析、第 54 回日本生物物理学会年会、2016. 11. 25-27、つくば
- (26) Hisatomi, O. (Poster) Mutational analyses of the conformational switching of a light-regulated bZIP module, Photozipper. 光制御型 bZIP モジュール Photozipper の構造変化の変異体解析、第 54 回日本生物物理学会年会、2016. 11. 25-27、つくば
- (27) Kojima, K., Matsutani, Y., Yamashita, T., Yanagawa, M., Imamoto, Y., Hisatomi, O., Yamano, Y., Wada, A., Shichida, Y. (Poster) Thermal activation rates of visual pigments expressed in rods. 桿体視細胞に発現する視物質の熱活性化頻度、第 54 回日本生物物理学会年会、2016. 11. 25-27、つくば
- (28) 小関康平、長嶋宏樹、久富修、三野広幸 (Poster) 機能性タンパク質 photozipper の反応過程の解析、第 55 回電子スピンサイエンス学会年会 (SEST2016) 2016. 11. 10-12、大阪市大
- (29) 井上萌恵、Nguyen Minh Hien、和泉雅之、岡本亮、小林夕香、上野泰、岡本裕樹、林文晶、久富修、梶原康宏 (Oral) コアフコース認識レクチン PhoSL の構造解析 日本化学会 第 97 春季年会、2017. 3. 16-19、横浜
- [その他]
ホームページ等
<http://gabriel.ess.sci.osaka-u.ac.jp/html/hisatomi/hisatomi-jp.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
久富修 (HISATOMI, Osamu)
大阪大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：60231544
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし
- (4) 研究協力者 (50 音順)
岩佐 達郎 (IWASA, Tatsuo)
神取 秀樹 (HIDEKI, Kandori)
坂井 貴臣 (SAKAI, Takaomi)
榊原 俊介 (SAKAKIBARA, Shunsuke)
七田 芳則 (SHICHIDA, Yoshinori)
寺嶋 正秀 (TERAZIMA, Masahide)
中村 亮介 (NAKAMURA, Ryouyusuke)
濱田 格雄 (HAMADA, Norio)
深田 義孝 (FUKADA, Yoshitaka)
丸田 晋作 (MARUTA, Shinsaku)
三野 広幸 (MINO, Hiroyuki)
山下 隼人 (YAMASHITA, Hayato)