

令和元年5月31日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03280

研究課題名(和文) 光受容体研究の深化が照らす細胞内シグナル伝達の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular Basis of light-dependent signal transduction in cells

研究代表者

増田 真二 (Masuda, Shinji)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授

研究者番号：30373369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：光受容体BLUFの光環境に応じて駆動する細胞内シグナル伝達を、階層を跨いで(分子から個体まで)包括的に理解することを目指した。BLUFは、種類によらず、光反応のメカニズムは一定だが、その時間変化は様々に違いがあり、それらは由来生物の生育環境の光強度を反映していると考えられた。シアノバクテリアの光走性を制御するBLUF光受容体PixDの解析を行い、PixDはチラコイド膜の一点に局在することを明らかにした。また、PixDの下流で機能するPixEは、線毛伸長に関わる因子と相互作用することがわかった。各種変異体の表現型解析結果と合わせ、光シグナルが細胞を一定の方向へ動かすモデルを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外からのシグナルは、タンパク質の構造情報に変換され、その後タンパク質間相互作用により細胞内を巡り、最終的に特定の生理機能を制御する。しかし、そのメカニズムを分子レベルで具体的に示した例は少ない。光受容体は光で容易にON/OFFすることができ、シグナル変換機構の詳細を調べる格好の材料である。本研究で明らかとなった光シグナル伝達の詳細は、タンパク質同士がどのように相互作用し、シグナルを一定方向へ伝達しているのか、といった一般的な問題の理解に重要なものとなる。また本研究で明らかとなったBLUFの光反応の化学的基盤は、フラビン分子の新しい光化学反応機構として注目を集めることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Here we aimed to comprehensively understand the molecular mechanism of intracellular signal transduction by analyzing photoreceptor BLUF. Spectroscopic analysis revealed that although several BLUF proteins form radicals immediately after light irradiation, their rate constants differ, which may reflect differences of the growth light environments of the originated organisms. Biochemical and genetic analysis of BLUF photoreceptor PixD, which controls phototaxis of cyanobacteria, revealed that PixD is localized at specific positions of thylakoid or envelope membranes. Yeast two-hybrid experiments showed that PixE, which functions downstream of PixD, interacts with a specific protein involved in controlling pilus formation. Various mutants and multiple mutants of PixD and PixE were prepared and their phototaxis phenotypes were analyzed in detail. From the obtained results, a model was constructed in which a PixD-dependent light signal moves cells to a certain direction.

研究分野：光生物学

キーワード：光受容体 BLUF シグナル伝達 シアノバクテリア 光走性 線毛

1. 研究開始当初の背景

細胞内シグナル伝達は生命現象の根幹をなす反応であり、そのメカニズムの詳細な理解は、生命科学の中心的課題であり続けてきた。これまでに、増殖因子やホルモン等のリガンド結合に端を発する細胞内シグナル伝達系の研究が行われ、それぞれのシグナル伝達を担うタンパク質とその相互作用経路の全体像が明らかとなってきた。教科書を開けば、個々のシグナル伝達系を構成する因子とその伝達経路を矢印で図示した表が多数散見される。しかしながら、それら多数の因子が協調して実現させている細胞内シグナル伝達の分子メカニズムに関しては理解が進んでいない。特定のシグナル伝達に特化した詳細な解析が必要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の代表者は、光合成微生物の様々な形質を光依存的に調節する青色光受容体 BLUF を発見し (Masuda & Bauer, Cell, 2002) その機能解析を進めてきた。現在この光受容体は、クロプトクロム、LOV ドメインに続く、第3種目のフラビン型青色光受容体として認知され、世界中で重点的に研究が進められている (Reviewed in Masuda, PCP, 2013)。これまでの研究により、1) BLUF 型光受容体は細菌界に幅広く (約 10% の細菌種に) 保存されていること、2) 独自の光化学反応により光シグナル変換を行うこと、3) シアノバクテリアの BLUF タンパク質 PixD は、下流の因子 PixE と協調して光走性の制御を担うこと、が明らかとなった。光受容体タンパク質は、非侵襲な光照射によりその反応を一斉にトリガーすることができるため、細胞内シグナル伝達を解析する格好のモデルとなる。またシアノバクテリアの BLUF 型光受容体 PixD は、下流の因子が明らかとなった現在唯一の光受容体である。これらのことから、BLUF 型光受容体は、細胞内シグナル伝達の分子機構を調べる最も重要な研究対象の一つと考えられる。

本研究では、分光学的 / 生化学的 / 遺伝学的 / 生理学的解析を組み合わせ、BLUF 型光受容体の光依存的構造変化、下流の因子の同定、光依存的タンパク質間相互作用、部位特異的変異体の表現型解析、を実施し、それらの結果を基に、極性をもった細胞内シグナル伝達が達成される分子メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、以下3つのサブチームを構成することで、異なる実験手法を効率良く組み合わせることで研究の推進を図った。

I. 分光学的解析サブチーム (光受容体の分光学的解析) : 多くの微生物に保存されている BLUF タンパク質は、光シグナル変換機構の解析が進んでいる光受容体のファミリーの一つである。ここでは、シアノバクテリア由来の BLUF タンパク質 PixD もしくは紅色光合成細菌由来の BLUF タンパク質 PapB を材料に、安定同位体標識と様々な分光測定を組み合わせることで、BLUF の光反応機構の詳細を調べた。

II. 遺伝学的・生化学的解析サブチーム (光受容体の遺伝学的・生化学的解析による相互作用因子の同定と光依存的蛋白質相互作用の解析) : これまでに、シアノバクテリア由来の BLUF タンパク質 PixD は、下流の因子 PixE と光依存的に相互作用することで、この菌の光走性を制御することがわかっている。しかし、PixD-PixE の相互作用が実際に細胞内で達成されているのかはわかっていない。また PixE の下流の因子もわかっていない。そこで PixD 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い、細胞内における PixD-PixE の相互作用様式の詳細を調べた。また、PixD/PixE 二重変異体をバックグラウンドに、新規の光走性変異体単離と解析を行った。

III. 生理学的解析サブチーム (シアノバクテリアの生理学的解析) : シアノバクテリア細胞が光の方向を認識するためには、関連タンパク質が細胞内で偏在している必要があると考えられる。免疫電子顕微鏡法や蛍光タンパク質などを利用して、PixD と PixE の局在解

析を実施した。また、上記II)で作成した各種変異体の表現型を詳細に実施した。

4. 研究成果

紅色細菌のBLUF光受容体PapBとシアノバクテリアのBLUF光受容体PixDの分光学的解析を行い、PixDとPapBは共に光照射直後にラジカルを形成することがわかった。しかしその時定数には若干の違いが存在すると考えられた。また、大腸菌のフラビン要求株を用いて、フラビン分子の特定の窒素原子を重窒素に置換した分子をBLUFタンパク質に取り込ませる系を構築した。その系により作成したPapBの発色団とタンパク質の構造変化を、赤外分光法（FT-IR）により調べた。その結果、FT-IRスペクトルで観測される色素の特異的な構造変化に由来するバンドの帰属を明確化することができた。

FLAGタグを融合したPixEを発現するシアノバクテリア株を作成し、その免疫電子顕微鏡観察から、PixEは細胞内のチラコイド膜もしくは包膜の一点に局在することを明らかにした。また細胞内における会合状態をBlue-native PAGEとウエスタンブロットング解析により調べたところ、PixDは、暗所では10量体、光照射条件下ではダイマーにコンフォメーション変化させることを明らかにした。

酵母ツーハイブリッドの実験から、PixDの下流で機能する PixEは線毛伸長に関わる特定のタンパク質と相互作用することがわかった。PixEは、先の免疫沈降実験から光捕集系フィコビリソームの構成因子とも相互作用することが示唆されている。このことから、暗所においてPixD-PixEは、光捕集系と相互作用することで一細胞中でも光の方向を感じることができるよう細胞内の一点に局在しており、ひとたび光が当たりPixD-PixE複合体が解離すると、フリーとなったPixEは近くの線毛合成部位に存在する構成因子と相互作用し、その活性を制御することで、細胞の特定の位置の線毛の脱重合を促進していると考えられた。この仕組みにより、細胞は光に対して一定の方向へ移動することができると考えられた。上記仮説を検証するために、PixD、PixEと上記線毛構成因子の各種変異体および多重変異体を作成し、その光走性を詳細に解析した。遺伝学的解析結果と合わせ、PixDの光励起によりPixEがフリーとなり、PilBと相互作用することで線毛の伸長制御を行うとするモデルを提唱することができた。

さらに本研究では、光に対して正の走行性を示すPixD-PixE二重変異体をバックグラウンドに、負の走性を示す変異体の単離に成功した。その原因遺伝子をゲノムリシーケンシングによって明らかにしたところ、それらは、これまでに同定されていた光走性に関わる因子とは異なるものであった。今後、これら新規因子を解析することにより、ベクトル性をもった細胞内シグナル伝達の仕組みの理解をさらに進めることができるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

1) Shimizu, T., Shen, J., Fang, M., Zhang, Y., Hori, K., Trinidad, J. C., Bauer C. E., Giedroc, D. P., and Masuda, S. (2017) The sulfide-responsive transcriptional repressor SqrR functions as a master regulator of sulfide-dependent photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114: 2355-2360 (査読有)

2) Sugimoto, Y., Nakamura, H., Ren S., Hori, K., and Masuda, S. (2017) Genetics of the blue light-dependent signal cascade that controls phototaxis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol.* 58: 458-465 (査読有)

3) Ito, D., Ihara, Y., Nishihara, H., and Masuda, S. (2017) Phylogenetic analysis of proteins involved in the stringent response in plant cells. *J. Plant Res.* 130: 625-634 (査読有)

- 4) Shimizu, T. and Masuda, S. (2017) Characterization of redox-active cysteine residues of persulfide-responsive transcriptional repressor SqrR. *Commun. Integr. Biol.* 10: e1329786 (査読有)
- 5) Honoki, R., Ono, S., Oikawa, A., Saito, K. and Masuda, S. (2018) Significance of accumulation of the alarmone (p)ppGpp in chloroplasts for controlling photosynthesis and metabolite balance during nitrogen starvation in Arabidopsis. *Photosyn. Res.* 135: 299-308 (査読有)
- 6) Sato, R., Kono, M., Harada, K., Ohta, H., Takaichi, S. and Masuda, S. (2017) Fluctuating-Light-Acclimation Protein1, conserved in oxygenic phototrophs, regulates H⁺ homeostasis and non-photochemical quenching in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 58: 1622-1630 (査読有)
- 7) Kawashima, R., Sato, R., Harada, K. and Masuda, S. (2017) Relative contributions of PGR5- and NDH-dependent photosystem I cyclic electron flow in the generation of a proton gradient in Arabidopsis chloroplasts. *Planta* 246: 1045-1050 (査読有)
- 8) Fujisawa, T. and Masuda, S. (2018) Light-induced chromophore and protein responses and mechanical signal transduction of BLUF proteins. *Biophys. Rev.* 10: 327-337 (査読有)
- 9) Shimizu, T., Horiguchi, K., Hatanaka, Y., Masuda, S., Shimada, K., Matsuura, K. and Haruta, S. (2018) Nitrite-reducing ability is related to growth inhibition by nitrite in *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 82: 148-151 (査読有)
- 10) Sato, R., Kawashima, R., Trinh, M.D.L., Nakano, M., Nagai, T., Masuda, S. (2019) Significance of PGR5-dependent cyclic electron flow for optimizing the rate of ATP synthesis and consumption in Arabidopsis chloroplasts. *Photosynth. Res.* 139: 359-365 (査読有)
- 11) Nakasone, Y., Kikukawa, K., Masuda, S. and Terazima, M. (2019) Time-Resolved Study of Interprotein Signaling Process of a Blue Light Sensor PapB-PapA Complex. *J. Phys Chem. B* in press (査読有)

[学会発表](計12件)

- 1) Masuda, S. Significance of light-induced electron transfer between a flavin molecule and an amino-acid side chain for controlling phototaxis in cyanobacteria. 4th Awaji International Workshop on “Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications” (5th AWEST 2017) (招待講演) (国際学会) 2016年06月
- 2) 増田真二 “Genetic, biochemical and biophysical studies on flavoprotein photoreceptors applicable for optogenetics” 第54回日本生物物理学会年会(招待講演) 2016年11月
- 3) 小林厚子、中村広志、杉本優希、増田真二 「シアノバクテリアの光走性を制御するシグナル伝達タンパク質PixDおよびPixEの細胞内局在解析」 第58回日本植物生理学会年会

2017年03月

4) 増田真二「植物の栄養応答における葉緑体型緊縮応答の果たす役割」 第3回植物の栄養研究会 2017年6月

5) Ryoichi Sato and Shinji Masuda “ Identification and characterization of a novel chloroplast protein controlling non-photochemical quenching under fluctuating light ” 8th International Conference Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability(国際学会) 2017年8月

6) Shinji Masuda and Takayuki Shimizu “ Mechanism for H₂S and reactive-sulfur-species recognition in cells “ 第59回日本植物生理学会年会(招待講演) 2018年3月

7) 中村広志、Annik Jakob, 小林厚子、杉本優希、Annegret Wilde、増田真二 “ シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803の光走性を制御するPixDおよびPixEの細胞内シグナル伝達機構 ” 第59回日本植物生理学会年会 2018年3月

8) Shimizu, T., Shen, J, Fang, M., Zhang, Y., Hori, K., Trinidad, J.C., Bauer, C.E., Giedroc, D.P. and Masuda, S. “ Persulfide-responsive transcriptional repressor SqrR regulates sulfide-dependent photosynthesis ” 18th International Symposium of Phototrophic Prokaryotes. 2018年8月

9) Nakamura, H., Jakob, A., Ren, S, Sugimoto, Y., Wilde, A. and Masuda, S. “ Intracellular signaling by PixD and PixE controlling phototaxis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 ” 18th International Symposium of Phototrophic Prokaryotes. 2018年8月

10) Tsukatani, Y., Sugimoto, S., Azai, C., Harada, J., Mizoguchi, T., Tamiaki, H. and Masuda, S. “ Glycolipid and chlorophyll a biosynthesis are required for heterologous assembly of the type-I photochemical reaction center in purple bacteria ” International Symposium of Phototrophic Prokaryotes. 2018年8月

11) Ito, D. and Masuda, S. “ Role of a new gene for the stringent response in *Chlamydomonas reinhardtii* ” ISPR Conference on Microbial Photosynthesis 2018年8月

12) Masuda, S., Ito, D., Ihara, Y., Honoki, R. and Maekawa, M. “ Impact of the stringent response for controlling photosynthesis and chloroplast function in photosynthetic microorganisms ” ISPR Conference on Microbial Photosynthesis (招待講演) 2018年8月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：活性イオウ分子種に応答して遺伝子発現を制御するタンパク質

発明者：増田真二、清水隆之

権利者：同上

種類：特許

番号：特願2017-15348

出願年：2017年
国内外の別： 国内

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：塚谷祐介
ローマ字氏名：Tsukatani, Yusuke
所属研究機関名：国立研究開発法人海洋研究開発機構
部局名：海洋生命理工学研究開発センター
職名：研究員
研究者番号（8桁）：10421843

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小林厚子
ローマ字氏名：Kobayashi, Atsuko

研究協力者氏名：藤澤知績
ローマ字氏名：Fujisawa, Tomotsumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。