

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20608001

研究課題名 (和文) シアノバクテリオクロムの縦断・横断的解析によるフィトクロム型光受容機構の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of phytochrome-type photoreception mechanism based on the comprehensive analysis of cyanobacteriochromes

研究代表者

成川 礼 (NARIKAWA REI)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：30456181

研究成果の概要 (和文)：

本研究課題では、植物において様々な光応答を制御する赤/遠赤色光受容体・フィトクロムと似て非なる新規光受容体群シアノバクテリオクロム (CBC) の網羅的解析を行った。シアノバクテリオクロムはフィトクロムとは異なり、多様な分光特性を持つ。特に、緑/赤色光受容体・AnPixJに着目し、構造解析・詳細な分光解析を行い、それ以外の CBC についても網羅的解析を推し進めることで、開環テトラピロール結合型光受容体の光変換機構について、理解を深めることができた。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, I performed comprehensive analysis of novel photoreceptor superfamily, cyanobacteriochrome that is distinctive relative of the plant red/far-red photoreceptor, phytochrome. Cyanobacteriochromes have diverse spectral properties. Among these, structural and various spectral analyses such as time-resolved and FTIR measurements of AnPixJ were performed. Further, other various cyanobacteriochromes are comprehensively analyzed. As a result, I could provide valuable insights into the photoperception mechanism of linear tetrapyrrole-binding photoreceptors including phytochrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：光生物学

科研費の分科・細目：光生命科学

キーワード：光受容体、フィトクロム、AnPixJ、結晶化、分光解析

1. 研究開始当初の背景

光合成生物にとって光は最重要な情報であり、複雑な応答機構が予想される。植物のフィトクロムは、開環テトラピロールを結合し、赤/遠赤色光受容体として様々な光応答に関わる。シアノバクテリアにおけるフィトクロムのホモログはフィトクロムの色素結合 GAF ドメインと似て非なる GAF ドメインを持ち、

シアノバクテリオクロム (CBC) と呼ばれている。それらの中で、我々の研究グループにより、TePixJ が青/緑色光吸収型間の光変換を示す走光性の新規光受容体として同定された。さらに、私の研究により、新たな CBC が続々と同定され、緑/赤色光吸収型間、紫外-紫/緑色光吸収型間の光変換を示す光受容体が見出された。つまり、従来型のフィト

クロムを含め、紫外から遠赤色領域まで広範囲の光受容が示された。これら CBC は同じ色素を結合しながら、色素の異性化や共役系の変化により吸収波長を多様化していた。

2. 研究の目的

本研究課題では、CBC の更なる解析により、フィトクロム型光受容機構の普遍的・特異的側面の理解を目指す。その目標に対して、私は二つのストラテジーを適用する。緑/赤色光受容体・AnPixJ の“縦断的”網羅解析と多様な CBC の“横断的”網羅解析である。前者は「狭く深く」を、後者は「広く浅く」を目指し、互いの解析を補完し合う。さらに配列比較により光反応機構を予測し、部位特異的変異導入や新たな CBC の解析により検証する。

3. 研究の方法

本研究課題では、AnPixJ の縦断的網羅解析とそれ以外のシアノバクテリオクロム (CBC) の横断的網羅解析という二つのストラテジーと適用し、フィトクロム型光受容機構の解明を目指した。AnPixJ はタンパク質が大量に安定的に調製できるため、詳細な分光解析 (低温分光・ラマン分光・FTIR・NMR など) と結晶構造解析を行い、光応答機構の全容解明を目指した。一方、それ以外の CBC に関しては、基本的な生化学解析・分光解析を網羅的に行い、それぞれのタンパク質の機能分類を行った。両者の研究成果とそれぞれの配列比較から見出された仮説について、新たな CBC の解析や部位特異的変異導入解析により検証した。

4. 研究成果

(1) AnPixJ の縦断的解析：

AnPixJ の色素結合 GAF ドメインの赤色光吸収型 (Pr) の結晶構造を 1.8 Å の高分解能で決定した (図 1)。その結果、色素とアポタンパク質はそれぞれ、フィトクロムの Pr 型とよく似ていたが、アポタンパク質に対する色素の相対的な結合位置は異なり、色素結合ポケットは両者で全く異なっていた。特に、フィトクロムにおいて、C 環の窒素にプロトンを提供し、A, B, C 環の窒素に水素結合している水分子が AnPixJ には存在していなかった。AnPixJ では、アスパラギン酸残基が水素結合を形成し、かつ、プロトンドナーとしても機能し、独自のプロトネーション機構が存在することが示唆された。また、AnPixJ 独自の Pg 型が形成されるのに重要だと示唆されるアミノ酸を Pr 型の結晶構造から推測し、部位特異的変異導入解析を行った。その結果、トリプトファン残基が Pr 型だけでなく、Pg 型の形成にも重要な役割を果たしていることが示唆された。Pr 型の結晶構造と分光的特徴から、AnPixJ の Pr 型の色素はプロトン化されている可能性が示唆されたため、Pr 型の

吸収スペクトルの pH 依存性を調べたところ、塩基性バッファーでは、Pr 型の Qy バンドの吸収係数が有意に低下し、Pr 型がプロトン化されていることが確かめられた。先行研究の時間分解吸収変化測定から、Pg 型から Pr 型、Pr 型から Pg 型への変換過程それぞれの中間体が得られている。低温で中間体をトラップする実験も行っており、Pr 型から Pg 型への変換においては、時間分解とほぼ同様な中間体が得られた。一方、逆反応では、時間分解ではトラップできなかった新たな中間体が得られている。

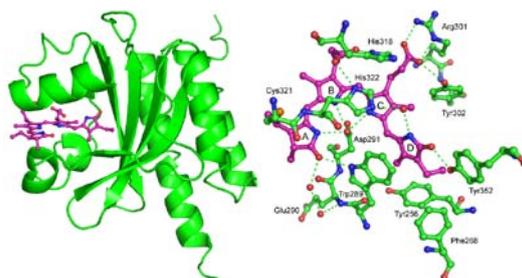


図 1. AnPixJ GAF ドメインの構造

AnPixJ の色素結合 GAF ドメインのアポタンパク質を精製し、フィコシアニン色素と再構成することにより、タンパク質と色素とのフォールディング過程を解析した。その結果、再構成直後に、AnPixJ の Pr 型よりも長波長のピークを持つ中間体が観察され、その後速やかに Pr 型が形成された。また、安定同位体ラベルされた色素と再構成したホロタンパク質の FTIR 解析を行い、Pg 型から Pr 型への光変換過程で、アミノ酸のカルボン酸のプロトン脱離反応が起こっていることが示唆された。Pr 型の結晶構造と考え合わせると、Pr 型において、アスパラギン酸のカルボン酸のプロトンが色素に付加していたものが、Pg 型において脱離していることを反映していると示唆された。さらに、中間体の FTIR 解析も行っており、AnPixJ の光変換過程を詳細に解析できている。現在、安定同位体ラベルされた色素と再構成したホロタンパク質の NMR 解析を進めるための準備中で、より詳細な反応メカニズムの解明が期待される。

(2) 他の CBC-GAF ドメインの横断的解析：

① 推定概日リズム光センサーである、SyCikA の GAF ドメインをシアノバクテリアと大腸菌からそれぞれ精製し、その分光特性を調べた。その結果、ともに紫色光吸収型から黄色光吸収型への片方向光変換とその逆方向への暗反転を示すという、特異な分光特性であった。

結合している色素は、TePixJ や SyPixJ1 と似たフィコビオロブリンだと推測された。

②走光性の光受容体である SyPixA について、生化学・分光解析を行った。SyPixA をシアノバクテリアとフィコシアノビルリンを合成する大腸菌のそれぞれから精製し、分光特性を調べたところ、ともにフィコビオロブリンを結合し、紫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。これらの分光特性は先行研究の TePixJ とよく似ている。

TePixJ と SyPixA は色素結合ドメイン全長では保存性が低い、TePixJ の分光特性に重要な役割を果たすシステイン残基が保存されており、局所的なアミノ酸が分光特性を決定していることが示唆された。

③好熱性シアノバクテリアに存在する新規 CBC Tlr1999 について分光特性を解析したところ、青/緑色光変換型であったが、通常の緑色光吸収型よりも短波長シフトしていた。さらに、青/緑色光変換型 GAF ドメインにおいては、高度に保存された第二の Cys 残基が過渡的に色素に共有結合することで青色光吸収型ができると考えられている。Tlr1999 において、IAA という Cys をブロックする試薬を加えることで、確かに青色光吸収型ができず、その代わりに長波長吸収型が生成されたことから、やはり第二の Cys 残基が過渡的に共有結合することで短波長吸収の青色光吸収型が形成されることが強く示唆された。

以上の解析から、CBC の光受容機構について、システインの色素への脱着やプロトンの色素への脱着が重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの解析結果は、フィトクロムを含めた開環テトラピロール型光受容体の光感知機構を理解する上で、非常に重要な知見といえる。

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 11 件) 全て査読有り

*: corresponding author

1. Kawano, Y., Saotome, T., Ochiai, Y., Katayama, M., Narikawa, R., and Ikeuchi, M. (2011) Cellulose accumulation and a cellulose synthase gene are responsible for cell aggregation in the cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus* RKN. *Plant Cell Physiol.* accepted.

2. Ishizuka, T., Kamiya, A., Suzuki, H., Narikawa, R., Noguchi, T., Kohchi, T., Inomata, K., and Ikeuchi, M. (2011) The cyanobacteriochrome, TePixJ, isomerizes

its own chromophore by converting phycocyanobilin to phycoviolobilin. *Biochemistry.* 50 (6): 953-961.

3. Watanabe, M., Kubota, H., Wada, H., Narikawa, R. and Ikeuchi, M. (2011) Novel supercomplex organization of photosystem I in *Anabaena* and *Cyanophora paradoxa*. *Plant Cell Physiol.* 52 (1): 162-168.

4. Hirose, Y., Narikawa, R., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2010) Cyanobacteriochrome CcaS regulates phycoerythrin accumulation in *Nostoc punctiforme*, a group II chromatic adapter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (19): 8854-8859.

5. Fujisawa, T., Narikawa, R., Okamoto, S., Ehira, S., Yoshimura, H., Suzuki, I., Masuda, T., Mochimaru, M., Takaichi, S., Awai, K., Sekine, M., Horikawa, H., Yashiro, I., Omata, S., Takarada, H., Katano, Y., Kosugi, H., Tanikawa, S., Ohmori, K., Sato, N., Ikeuchi, M., Fujita, N., and Ohmori, M. (2010) Genomic structure of an economically important cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39. *DNA Res.* 17 (2): 85-103.

6. Midorikawa, T., Matsumoto, K., Narikawa, R., Ikeuchi, M. (2009) An Rrf2-type transcriptional regulator is required for expression of *psaAB* genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* 151 (2): 882-892.

7. Watanabe, M., Iwai, M., Narikawa, R. and Ikeuchi, M. (2009) The Photosystem II Complex is a Monomer or a Dimer? *Plant Cell Physiol.* 50 (9): 1674-1680.

8. Narikawa, R.*, Muraki, N., Shiba, T., Kurisu, G. and Ikeuchi, M. (2009) Crystallization and preliminary X-ray studies of the chromophore-binding domain of cyanobacteriochrome AnPixJ from *Anabaena* sp. PCC 7120. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 65 (2): 159-162.

9. Narikawa, R.*, Kohchi, T. and Ikeuchi, M. (2008) Characterization of the photoactive GAF domain of the CikA homolog (SyCikA, Slr1969) of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7 (10): 1253-9.

10. Hirose, Y., Shimada, T., Narikawa, R., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2008) Novel

cyanobacteriochrome CcaS is green/red light receptor and up-regulates the expression of phycobilisome linker protein by green light. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (28): 9528-9533.

11. Narikawa, R.*, Fukushima, Y., Ishizuka, T., Itoh, S. and Ikeuchi, M. (2008) A novel photoactive GAF domain of cyanobacteriochrome AnPixJ that shows reversible green/red photoconversion. J. Mol. Biol. 380 (5): 844-855.

[学会発表] (計 13 件)

1. 成川礼 緑／赤色光変換型シアノバクテリオクロム AnPixJ の in vitro 再構成解析
第 5 2 回日本植物生理学会年会
2011 年 3 月 21 日 東北大学川内北キャンパス

2. 成川礼 真核藻類における光受容体の分布
第 5 回日本ゲノム微生物学会年会
2011 年 3 月 15 日 東北学院大学土樋キャンパス

3. 成川礼 シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における走光性を制御する新規光受容体の解析 日本植物学会第 73 回大会 2009 年 9 月 18 日 山形大学小白川キャンパス

4. Rei Narikawa Spectral and structural characterization of a novel cyanobacteriochrome-type photoreceptor AnPixJ 第 8 回国際テトラピロール会議 (8th ICTPPO) 2009 年 7 月 31 日 Asilomar Conference Center (アメリカ, カリフォルニア)

5. 成川礼 新規光受容体群シアノバクテリオクロムの構造－機能相関 第 50 回日本植物生理学会年会 2009 年 3 月 21 日 名古屋大学東山キャンパス

6. 成川礼 シアノバクテリアの概日リズム入力系レドックスセンサー CikA のホモログ SyCikA の光センサーとしての役割 日本植物学会第 72 回大会 2008 年 9 月 26 日 高知大学朝倉キャンパス

7. Rei Narikawa Novel crystal structure of red-absorbing form of cyanobacteriochrome AnPixJ-GAF2 第 21 回国際結晶学連合会議 (IUCr2008) 2008 年 8 月 26 日 大阪国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者 成川 礼

(NARIKAWA REI)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：30456181