

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657109

研究課題名(和文) 光受容タンパク質を利用したタンパク質の局在と活性の制御

研究課題名(英文) Control of protein localization and activity using photoreceptors

研究代表者

岡野 俊行 (Okano, Toshiyuki)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：40272471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者がこれまでに、独自に同定・解析した新しい光受容タンパク質の光スイッチ系を  
発展させ、より広くタンパク質活性や生体分子の制御に利用できる可能性を探った。具体的には、クリプトクロム分子  
の細胞内局在制御およびクリプトクロムの大量発現系の構築を目指した。その結果、哺乳類細胞膜上に蛍光シグナルを  
観察することに成功した。また、出芽酵母を用いた安定発現系において、発色団を保持した状態のクリプトクロムの高  
発現を見だし、精製、分光解析、および生化学的解析に成功した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a system to control the light-switchable gene expression by using  
photoreceptive molecules. In order to polish this system toward application as a novel biological tool,  
we further characterize CRY photoreception and interaction proteins in this study. We have detected the po  
sitive fluorescent signals on the plasma membrane of mammalian cultured cells. We found relatively high e  
xpression levels of chicken cryptochrome in a constitutive expression system using budding yeast. We also  
succeeded in the purification of the cryptochrome protein having the chromophore FAD, investigation of the  
spectral properties, and detection of in vitro structural changes induced by light.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：光生物 バイオイメーjing 生体高分子構造・機能 生物工学

### 1. 研究開始当初の背景

光を利用した生体制御技術には、本研究のように生体物質を利用する方法の他に、人工的な光感受性化合物を用いる方法があり、後者の方だけが実用化されていた。また、前者としては、実用化されていないものの、生体内光スイッチとして赤色感受性のフィトクロムを用いた系[Shimizu-Sato *et al. Nature Biotech.* 20, 1041 (2002)]が知られているが、青色感受性のCRYを用いた系は未報告であった。また、申請者自身のそれまでの青色受容分子CRY4に関する研究の過程で、CRY4の相互作用分子CRIPを同定しており、両者の解離-会合が光によって変化することを見いだしていた。

### 2. 研究の目的

申請者らは、脊椎動物において光センサーの候補分子として多数のCRY分子を多数同定してきた実績があり、特にCRY4に関する基礎研究の蓄積をさらに発展させ、より広くタンパク質活性や生体分子の制御に利用できる可能性を探ることを目的とした。具体的には、遺伝子発現制御のみならずタンパク質活性の光制御系を実現するために、CRYの細胞内局在の解析とタンパク質改変による局在の変更を試みた。また、CRYの機能ドメインの利用を念頭におきつつ、タンパク質の大量発現系の構築を試みた。

### 3. 研究の方法

CRYタンパク質の膜局在をスイッチングする系を構築するために、細胞内にて相互作用するクリプトクロムを膜に固定して可視化することを試みた。クリプトクロムのカルボキシル末端に膜局在化シグナルを付加し、同時に蛍光タンパク質と融合させて発現させ、その局在変化を調べた。一方、CRY4とCRIPの相互作用を検出し *in vitro* におけるクリプトクロムの光スイッチングを詳細に検討するために、クリプトクロムを培養細胞において大量に発現・精製する系の構築を試みた。

### 4. 研究成果

CRYタンパク質と局在化シグナルならびに蛍光タンパク質の融合タンパク質を、酵母ならびに哺乳類細胞において発現したところ、哺乳類細胞の細胞膜上に蛍光シグナルを観察することに成功した。現在、この系を利用し哺乳類細胞においても光スイッチを実現するための条件のスクリーニングを行っている。一方、CRYタンパク質の発現系については、当初、広く利用されている哺乳類培養細胞株や昆虫細胞・バキュロウィルス発現系、あるいは、大腸菌を用いた系を検討したものの、光吸収活性のあるクリプトクロムをほとんど発現することができなかった。

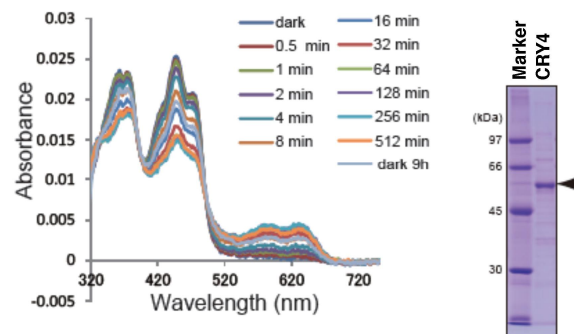


図1 酵母を用いて発現・精製したクロプトクロム (左: 吸収スペクトルと光反応、右: CBB染色像)

そこで、出芽酵母を用いた安定発現系を検討したところ、最終的に1mg/L以上の大腸菌に匹敵する極めて高い発現量を認めることができ、発色団を保持した状態のクリプトクロムの精製とスペクトル測定に成功した(図1)。さらに、精製したタンパク質を用いたスペクトル解析により光サイクルを同定した。

これらと並行して特異的抗体を用いた生化学的解析により、網膜から免疫沈降したクリプトクロムの光依存的な構造変化を検出することに成功した。そこで、さまざまな波長の光を用いて、光感受性の検討を行ったところ、青色光ならびに近紫外光に応答して構造変化をすることを明らかにすることができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Takeuchi T.\*, Kubo Y.\*, Okano K. and Okano T. (\*Equal contribution) Identification and characterization of *cryptochrome4* in the ovary of western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Zool.Sci.* 31 152-159 (2014) (査読あり)

Takebe A., Furutani T., Wada T. Koinuma M., Kubo Y., Okano K. and Okano T. Zebrafish respond to the geomagnetic field by bimodal and group-dependent orientation. *Scientific Reports*, 2 Article Number: 727 (2012) (査読あり)

Watari R., Yamaguchi C., Zemba W., Kubo Y., Okano K. and Okano T. Light-dependent structural change of chicken retinal *Cryptochrome4*. *J. Biol. Chem.*, 287 42634-42641 (2012) (査読あり)

〔学会発表〕(計19件)

[1] 岡野俊行 (招待講演) 青色光による遺伝子発現の制御と青色光受容分子の解析 **分子研研究会『ロドプシン研究の故きを温めて新しきを知る』** 2013年11月18日-11月19日岡崎コンファレンスセンター・大会議室

[2] Hiromasa Mitsui, Toshinori Maeda, Yusuke Tsuji, Ryuji Watari, Yoko Kubo, Keiko Okano, and Toshiyuki Okano Expression in yeast, immunoaffinity purification, blue light-dependent chromophore reduction, and in vitro structural change of chicken Cryptochrome4. The 6<sup>th</sup> Asia and Oceania Conference on Photobiology (AOC2013), Sydney Australia, 10-13 November 2013 口頭発表

[3] Shoichi Ozawa, Keiko Okano, Toshiaki Miyadai, Akihiro Takemura, Toshiyuki Okano A fish cell line Fugu Eye retains intrinsically photosensitive circadian clock. The 6<sup>th</sup> Asia and Oceania Conference on Photobiology (AOC2013), Sydney Australia, 10-13 November 2013 Poster (POS 8)

[4] 大塚祐介、葛川純也、岡野恵子、岡野俊行 ニワトリクリプトクロム1のヘム結合モチーフ(HRM)の解析 日本生物物理学会第51回年会(京都国際会館)2013年10月28日ポスター発表

[5] 三井広大、前田俊徳、山口千秋、辻悠祐、久保葉子、岡野恵子、岡野俊行 ニワトリクリプトクロム4の光反応特性の解析 日本生物物理学会第51回年会(京都国際会館)2013年10月28日ポスター発表

[6] 武野愛里沙、三井広大、岡野恵子、岡野俊行 ゼブラフィッシュクリプトクロム1aの発現・精製 日本生物物理学会第51回年会(京都国際会館)2013年10月28日ポスター発表

[7] 持永聖良、金子直道、岡野恵子、岡野俊行 光受容器官におけるニワトリクリプトクロム1の発現解析 日本動物学会第84回大会(岡山大学)2013年9月26日口頭発表

[8] 岡野恵子、小澤翔一、佐藤駿、宮台俊明、竹村明洋、岡野俊行 フグ培養細胞における光応答遺伝子 日本動物学会第84回大会(岡山大学)2013年9月27日口頭発表

[9] 戸田りこ、岡野恵子、竹内悠記、山内千裕、久保葉子、福代真、竹村明洋、岡野俊行 ゴマアイゴ脳における時計遺伝子発現と月齢応答機構 日本動物学会第84回大会(岡山大学)2013年9月28日口頭発表

[10] 小澤翔一、岡野恵子、宮台俊明、竹村明洋、岡野俊行 Photic responses of gene expression in Fugu Eye cells 第86回日本生化学会大(横浜)2013年9月11日ポスター発表と口演発表(審査採択)

[11] 辻悠祐、三井広大、山口千秋、久保葉子、岡野恵子、岡野俊行 Purification and analysis of chicken cryptochrome4 by using a temperature-sensitive monoclonal antibody. 第35回日本分子生物学会年会(福岡)2012年12月14日ポスター発表

[12] Toshiyuki OKANO, Ryuji WATARI, Chiaki YAMAGUCHI, Wataru ZEMBA, Yoko KUBO, Keiko OKANO Are retinal cryptochrome s non-opsin photoreceptor? Light-dependent structural change of chicken cryptochrome4 in the retina. 15<sup>th</sup> International Conference on Retinal Proteins, September 30-October 05, 2012, Monte Verita, Ascona,

Switzerland, Poster (P-35)

[ 13 ] Rie SAKATA, Keiko OKANO, Yuko KUBO, Satoshi TAMOTSU, Akihiro TAKEMURA, Tetsuya MIWA, Hiroyuki YAMAMOTO, Toshiyuki OKANO Molecular analysis of rhodopsins in snailfishes inhabiting different deep-sea environments. 15<sup>th</sup> International Conference on Retinal Proteins, September 30-October 05, 2012, Monte Verita, Ascona, Switzerland, Poster (P-44)

[ 14 ] 金子直道、岡野恵子、久保葉子、岡野俊行 ニワトリ網膜における CRY1 および CRY2 の解析 第 19 回日本時間生物学会学術大会 (北海道大学) 2012 年 9 月 15 日ポスター発表

[ 15 ] 三井広大、前田俊徳、山口千秋、辻悠佑、久保葉子、岡野恵子、岡野俊行 Overexpression of chicken cryptochrome4 in a budding yeast and its purification using a specific monoclonal antibody. 日本生物物理学会第 50 回年会大会 (名古屋大学) 2012 年 9 月 22-24 日ポスター発表

[ 16 ] 岡野俊行、渡隆爾、山口千秋、前場航、久保葉子、岡野恵子 Localizatiton and light-dependent structural change of chicken retinal cryptochrome4 日本動物学会第 83 回大会 (大阪大学) 2012 年 9 月 13 日口頭発表

[ 17 ] 戸田りこ、岡野恵子、竹内悠記、山内千裕、久保葉子、福代真、竹村明洋、岡野俊行 Analysis of Lunar Phase-Dependent Expression of Cryptochrome of *Siganus guttatus* 日本動物学会第 83 回大会 (大阪大学) 2012 年 9 月 13 日口頭発表

[ 18 ] Rie Sakata, Keiko Okano, Yoko Kubo, Satoshi Tamotsu, Akihiro Takemura, Tetsuya Miwa, Hiroyuki Yamamoto, Toshiyuki Okano Biological clock and photoreception systems of deep-sea snailfish. 日本比較生理生化学会 JCCPB2012 Hayama (総研大) 2012 年 7 月 6-7 日ポスター発表

[ 19 ] Toshiki Furutani, Akira Takebe, Masami Koinuma, Yoko Kubo, Keiko Okano, Toshiyuki Okano Zebrafish respond to the geomagnetic field by bimodal and group-dependent orientation. 日本比較生理生化学会 JCCPB2012 Hayama (総研大) 2012 年 7 月 6-7 日ポスター発表

[ その他 ]

岡野俊行研究室ホームページ

<http://www.okano.sci.waseda.ac.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

岡野 俊行 (OKANO TOSHIYUKI)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号 : 40272471