

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282229

研究課題名(和文) 光に依存した遺伝子発現調節システムの開発と利用

研究課題名(英文) Creation of a new light-dependent gene expression system

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) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：青色光受容体PixDを利用して、任意の遺伝子の発現を光制御する方法の構築を目指した。クロスリンクと質量分析によりPixDのダイマーの予想構造を得た。この情報を利用し、先に開発したPixDによる転写因子光制御法PICCOROの改良を進め、植物の花の形成を司る転写因子AGAMOUSの制御を試みた。PixDを恒常的に発現するシロイヌナズナを複数ライン単離することに成功した。またPixEのPixD相互作用部位をドミナントネガティブ型AGAMOUSに融合した。この融合したコンストラクトを、上記PixD発現シロイヌナズナに導入し、そのホモラインを複数ライン単離することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to construct a novel light-dependent gene expression system. We utilized the light-dependent protein-protein interaction between the blue-light photoreceptor PixD and its interacting protein PixE. We found that PixD interacts with the PixE N-terminal region. The N-terminal region of PixE was fused with the transcription factor AGAMOUS of the model plant Arabidopsis. Previous studies showed that AGAMOUS is necessary for normal flower formation. Thus, blue-light-dependent modulation of AGAMOUS activity could be monitored easily by phenotypic analysis. Biochemical analysis showed that PixD interacts with the chimeric transcription factor, indicating that PixD may control the chimeric transcription factor activity also in vivo. To check this hypothesis, we produce transgenic Arabidopsis expressing constitutively PixD and/or the chimeric transcription factor.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現制御 光受容体 オプトジェネティクス BLUF

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現は生命現象の根幹をなす反応であり、その反応機構の解明と応用は、生命科学の中心的課題である。これまでに、主として薬剤添加による遺伝子発現制御システムが構築され、それらは多くの分野でなくてはならない実験手法として頻りに用いられている。しかし誘導した遺伝子発現を OFF にする技術や、局所的に発現を誘導できるシステムの構築が、特に発生生物学の分野で望まれているが、未だ実現には至っていない。

申請者らは、光合成微生物の転写を調節する青色光受容体を発見し (Cell 2002, Biochemistry 2004)、その機能解析を進めてきた (Biochemistry 2003, 2004, 2010; JACS 2006, 2008)。現在までに、この青色光受容体 PixD は、下流の因子 PixE と光依存的に相互作用することで、光シグナルを伝えることを明らかにした。また、この光依存的相互作用を利用し、ゼブラフィッシュ内で転写因子の活性を制御することに最近成功した。しかしその制御の効率は十分とは言えず、実用化には更なる性能の向上が必要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、青色光受容体 PixD の光依存的タンパク質間相互作用のメカニズムの詳細を明らかにし、その情報を基に、光受容体とその相互作用因子を遺伝学的に改変し、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、シロイヌナズナをモデルに、これまでに確立してきた光依存的転写調節系を実用化レベルまで最適化することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 光受容体の遺伝・生化学的解析

酵母ツーハイブリッドの系により、光受容体 PixD と下流の因子 PixE との光依存的相互作用が先に観察されている。この系を利用して、PixD と PixE の相互作用に必要な最小領

域を同定する。具体的には、PixE の N 末端もしくは C 末端を徐々に削ったコンストラクトを作成し、それらの PixD との相互作用能を同様の実験で調べる。

PixD は暗所において 10 量体を形成し、転写因子様タンパク質 PixE のモノマー 4 つと共に超分子複合体を形成する。光照射により PixD はダイマーとなり、PixE との超分子複合体形成は見られなくなる。この複合体の形成は、光強度に依存しており、光シグナル状態と暗状態それぞれの PixD 分子の割合に依存している。野生型 PixD に光を照射すると、ピコ秒のオーダーで明状態に移行し、その後暗所に戻すと、約 10 秒で暗状態に戻る。そこで、報告されている PixD の結晶構造を基に、光反応に重要と思われる色素結合部位近傍に位置するアミノ酸に変異を導入し、光反応速度が変化する変異 PixD を作出する。暗状態への戻りが遅くなる、もしくは早くなる変異体を作成することで、光受容体の光感受性がそれぞれ高まるもしくは弱まる蛋白質がデザインできる。

(2) ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、シロイヌナズナにおける光による転写制御系の構築

暗所で 10 量体を形成した PixD は PixE と相互作用し、PixE の機能を損なわせる。そこで PixE を NtI に融合したキメラ転写因子を作成し、PixD を恒常的に発現するゼブラフィッシュに導入したところ、NtI の表現型である尻尾の有無が光依存的に観察された (Masuda et al. 2014)。すなわち、PixE を付加しただけで、NtI を光依存型の転写因子に改変することができた。しかし現在の系では、組換え転写因子の RNA を卵に打ち込んだ系で調べており、発生初期段階での制御を確認したに過ぎない。更なる応用を見据え、組換え転写因子をゲノムに組み込み、明暗両条件で表現型を精査することで、遺伝的にコードされた組換え転写因子の活性が光で制御

できるかを調べる。この際、転写因子の発現量が問題になる可能性があるが、いくつかのプロモータを組み合わせ、この点を克服する。

また、この系の普遍性を調べる目的を含め、ショウジョウバエとシロイヌナズナにおける転写因子の光調節を試みる。具体的には、表現型の確認がしやすい、ルシフェラーゼや lacZ などのマーカー遺伝子に加え、ショウジョウバエの体色変化に関わる遺伝子や、シロイヌナズナの花の形成を司る転写因子の光制御を試みる。

4. 研究成果

(1) 光受容体の遺伝・生化学的解析

これまでの研究で、PixD は暗所で 10 量体を形成しており、光照射によってこの 10 量体は 2 量体にコンフォメーションを変化させることがわかっている。また PixE は 10 量体の PixD のみに相互作用し、2 量体の PixD には相互作用しないことがわかっている。したがって、PixD の 10 量体と 2 量体の平衡状態は、PixD の光感受性を決定する重要な因子と考えられる。そこで、PixD 依存の光シグナル伝達のキネティクスをコントロールすることを見据え、PixD 2 量体の構造に関する情報を得ることを試みた。

精製した PixD 対し、クロスリンクを施したところ、PixD 間での架橋反応が確認された。得られた架橋物に対し、マス解析を行うことで、架橋反応位置を特定した。次に、PixD 10 量体のモノマー構造 2 つに対し、ドッキングシミュレーションを行ったところ、PixD の C 末端 5 アミノ酸が相互作用する PixD ダイマーの予想構造を得ることができた。この予想構造を見ると、先の架橋反応を起こしたアミノ酸位置が近接していた。またこのダイマー構造から相互作用が予想された C 末端の 5 アミノ酸残基を削ったコンストラクトを調べたところ、ダイマー構造の不安定化が確認され、得られたダイマー構造の正しさが支持さ

れた。

(2) ショウジョウバエ、シロイヌナズナにおける光による転写制御系の構築

ショウジョウバエにおける光による遺伝子発現制御系の構築を進めた。まず PixD を恒常的に発現するショウジョウバエラインを作成した。プロモータには、恒常的な発現が期待される Act5c を用い、ベクターには汎用性の高い pUASTattB を用いた。同様に PixD と相互作用する PixE の N 末端ドメインを Gl4 転写因子と融合させたコンストを作成した。このキメラ転写因子をショウジョウバエに発現するために、pUASTattB プラスミドにクローニングした。両プラスミドを、異なる染色体の異なるランディングサイトに導入した。得られたラインを掛け合わせることで、両コンストラクトを持つラインを作成することができた。得られた組換えショウジョウバエを、Gal4-USA 下流に lacZ もしくはルシフェラーゼの遺伝子を持つハエと掛け合わせ、その遺伝子発現が光制御され得るかを調べたところ、制御のダイナミクスは大きくないものの、マーカー遺伝子の光制御が確認された。現在同様な実験を、体色変化に関わる遺伝子に応用させるべく、組換え体の作成を進めている。

同様に、花の形成に必須な転写因子 AGAMOUS を対象とし、モデル植物シロイヌナズナにおける転写因子の光制御を試みた。まず PixD を恒常的に発現するシロイヌナズナを作成した。用いるプロモータは、恒常的な発現が期待されるカリフラワーモザイクウイルス由来 35S プロモータを用いた。得られた組換え体は、通常条件下で正常に生育した。次に、PixE と AGAMOUS のドミナントネガティブ融合転写因子を導入した。現在得られた組換え体のホモライン選抜を進めている。

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9件)

1. Masuda, S., Nakatani, Y., Ren, S., and Tanaka, M. (2013) Blue light-mediated manipulation of transcription factor activity in vivo, ACS Chem. Biol. 8: 2649-2653, doi:10.1021/cb400174d. (査読有).
2. 田中幹子 (2013) レーザー技術を応用した発生学研究の新展開. Proceedings of the 79th Laser Materials Processing Conference. 1: 31-35. <http://rnavi.ndl.go.jp/books/2014/01/024462197.php>. (査読有).
3. 朝野継起 (2013) 昆虫外骨格内に存在するメラニン合成酵素. 比較生理化学. 30: 106-114. https://www.jstage.jst.go.jp/article/hikakuseiriseika/30/3/30_106/article/-char/ja/ (査読無).
4. Asano, T., Toaka, M., Yamauchi, Y., Everroad, R.C., Seto, Y., Isobe, T., Kamo M., and Chosa, N. (2015) Re-examination of an a-chymotrypsin-solubilized in the pupal cuticle of the silkworm, Bombyx mori. Insect Biochem. Mol. Biol. 55C: 61-69. Doi:10.1016/j.ibmb.2014.10.004. (査読有).
5. Maesaki, R., Satoh, R., Taoka, M., Kanabe, T., Asano, T., Fujita, C., Fujiwara, T., Ito, Y., Isobe, T., Hakoshima, T., Maenaka, K., and Mishima, M. (2014) Scientific Rep. 4: 6016. Doi:10.1038/srep06016. (査読有).

6. Ren, S., Sugimoto, Y., Kobayashi, T., and Masuda, S. (2015) Cross-linking analysis reveals the putative dimer structure of the cyanobacterial BLUF photoreceptor PixD. FEBS Lett. 589: 1879-1882. Doi:10.1016/j.febslet.2015.05.019. (査読有).

7. Shimizu, T., Chen, Z., Matsuura, K., Masuda, S., and Bauer C.E. (2015) Evidence that altered cis element spacing affects PpsR mediated redox control of photosynthesis gene expression in Rubrivivax gelatinosus. PLoS One, 10: e0128446. Doi: 10.1371/journal.pone.0128446. (査読有).

8. Tsukatani, Y., and Masuda, S. (2015) Elucidation of genetic backgrounds necessary for chlorophyll a biosynthesis toward artificial creation of oxygenic photosynthesis. Origins Life Evol. Biosph. 45: 367-369. Doi:10.1007/s11084-015-9446-1. (査読有).

9. Masuda, S., and Tanaka, M. (2016) PICCORO: A technique for manipulating the activity of transcription factors with blue light. Methods Cell Biol. 135: in press. (査読有).

[学会発表](計13件)

1. 清水隆之, Zhuo Chen, 松浦克美、増田真二、Carl Bauer. レドックス応答性転写因子 PpsR の光合成遺伝子発現制御における cis 配列の重要性. 第55回日本植物生理学会年会、2014.3.19 富山大学.

2. 清水隆之, Zhuo Chen, 松浦克美、増田真二、Carl Bauer. 紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* における光合成遺伝子の制御に関わる転写因子 PpsR の性質. 第4回日本光合成学会年会. 2013.5.31-6.1 名古屋大学.

3. 田中幹子. レーザー技術を応用した発生学研究の新展開. 第79回レーザー加工学講演会(招待講演). 2013.5.7-8. 関西大学.

4. 相澤研介、相垣敏郎、朝野維起. 昆虫外骨格内に必須な遺伝子 *laccase2* の機能解析. 日本動物学会第84大会. 2013.9.26-28. 岡山大学.

5. 朝野維起. 昆虫脱皮時のラッカーゼ活性調節. 日本動物学会第84回大会. 2013.9.26-28. 岡山大学.

6. 増田真二. BLUF タンパク質の光化学とオプトジェネティクス. 第52回日本生物物理学会年会.(招待講演).2014.9.26、札幌コンベンションセンター.

7. Akutsu, H., and Masuda, S. BLUF タンパク質 PapB の FTIR による構造解析. 第52回日本生物物理学会年会. 2014.9.25-27、札幌コンベンションセンター.

8. Masuda, S. BLUF: the highly conserved blue light-photoreceptor controlling a wide variety of physiological activities in microorganisms. 環境微生物系学会合同大会 2014 (招待講演). 2014.10.24.アクトシティー浜松.

9. Masuda, S., Nakatani, Y., Ren, S., and Tanaka, M. PICCORO- a novel technique for manipulating the activity of transcription factors with blue light. 6th

strategic conference of zebrafish investigators. 2015.1.17-21. Pacific Grove, USA.

10. Masuda, S., Nakatani, Y., Ren, S., and Tanaka, M. Blue light-mediated manipulation of transcription factor activity in zebrafish embryos. 47th annual meeting of the Japanese society of developmental biologists. 2014.5.27-5.30. 愛知県産業労働センター.

11. Masuda, S. Significance of dynamic interaction between the BLUF photoreceptor PixD and its downstream factor PixE for controlling phototaxis in cyanobacteria. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (招待講演). 2015.12.15-21. Honolulu, Hawaii, USA.

12. Masuda, S., Tsukatani, Y., Mori, H., and Kurokawa, K. Genome structure of the marine purple photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. The International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes. 2015.8.2-6. Tübingen, Germany.

13. Sugimoto, Y., and Masuda, S. Cyanobacterial BLUF photoreceptor PixD-dependent light signal transduction mechanism. 第57回日本植物生理学会. 2016.3.18-20. 岩手大学.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)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

(2)研究分担者

田中 幹子（Tanaka, Mikiko）
東京工業大学 生命理工学研究科・准教授
研究者番号：40376950

朝野維起（Asano, Tsunaki）
首都大学東京 理工学研究科・助教
研究者番号：40347266