

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18559

研究課題名(和文)植物青色光受容体の分子内・分子間光信号伝達機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of intramolecular and intermolecular signaling mechanisms in the plant blue light receptor

研究代表者

岡島 公司 (Okajima, Koji)

慶應義塾大学・理工学研究科(矢上)・特任助教

研究者番号：20438245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物の青色光受容体キナーゼであるフォトトロピンの分子内・分子間信号伝達機構の解明のために、大腸菌から調整したシロイヌナズナphotの解析を行った。phot1 LOV2-STKの変異体のリン酸化活性測定や分光解析から、リンカー領域にキナーゼ制御にかかわる複数のアミノ酸残基を見出した。また、LOV2のN末端領域の変異体(K475A)のX線小角散乱解析から、光依存的な凝集体形成と解消がみられた。アミノ酸変異によって、本来の構造変化ができず、凝集体を形成したと考えられる。LOV2のN末端領域やリンカーが分子内信号伝達にかかわっている。

研究成果の概要(英文)：Phototropin (phot) is a blue light receptor in Plant. To elucidate intramolecular and intermolecular signaling mechanism, biochemical and structural analyses of Arabidopsis phot prepared from E. coli were performed. Some amino acid residues involved in the light dependent regulation of kinase activity were found in the linker region, by the mutation analysis of phot1 LOV2-kinase (LOV2-STK). The mutant in the N-terminal lateral region in LOV2 (K475A) showed the light dependent aggregation and dissociation by small angle X-ray scattering. The substitution would prevent usual conformational changes between LOV2 and STK. The N-terminal in LOV2 and the linker is critical for intramolecular signaling in phot.

研究分野：光生物学

キーワード：光受容体 フォットロピン 構造機能相関 植物環境応答

### 1. 研究開始当初の背景

植物の青色光受容体 phot は 700-1000 アミノ酸残基からなる、光制御型のセリン・スレオニンキナーゼ (STK) である。phot の STK 活性制御は特徴的な光反応を有する LOV によって行われる。青色光によって、LOV に非共有的に結合している FMN が、その近傍にあるシステイン残基と一過的に共有結合を形成 (S390) すると、LOV2 の C 末端側、リンカー中の J-ヘリックスが構造変化し、STK 活性が亢進されると考えられている。S390 は熱緩和により数秒～数分で元の状態 (D450) に戻り、STK 活性を抑制する。自己リン酸化した phot は、基質蛋白質をリン酸化し、光信号を下流に伝える (図 1)。phot の光依存的 STK 活性制御機構は、光信号を生体信号に変換する重要なステップであり、分子レベルでの詳細な理解が希求されている。シロイヌナズナ (At)、ムギ、クラミドモナス (Cr) 由来の phot について生理・生化学的解析が行われてきたが、生物物理学的解析は世界的にも進んでいない。特に立体構造に関しては、LOV の解析だけである。その要因として STK を含む試料評品の大量調製が困難な点が挙げられる。

申請者は大腸菌での phot の発現、精製方法の改善により、At や Cr 由来の phot について、最小機能ユニットである LOV2-STK や全長蛋白質の調製法を確立した。これらの分光解析、STK 活性、X線小角散乱 (SAXS) による構造解析により以下のような phot 分子内信号伝達機構の解明に向けた 2 つの足場を築くことが出来た。

At phot1 の自己リン酸化領域を人工基質といった LOV2-STK の活性測定系により、STK の青色光強度依存性が LOV の光反応速度と相関することを示した。さらに SAXS 測定から、At phot2 LOV2-STK では青色光依存的に LOV2 と STK のドメインの相対位置が変化して分子が伸張することを見いだした。At phot1 LOV2-STK でも phot2 と同様の構造変化を確認した。

Cr phot 全長の解析を可能にした。分光解析と変異体解析、STK 活性測定、SAXS 解析から LOV2 と STK 間の構造変化が普遍的に活性制御に関与している可能性を示した。この SAXS 解析は、phot 全長構造についての初めての報告となった。At phot の知見とあわせると LOV2-STK 間にある、天然変性領域として同定されるリンカー領域が STK 活性の制御に重要であることが強く示唆された。

一方、At phot の植物細胞内で phot が直接リン酸化する基質蛋白質として、BLUS1 を気孔開口経路で、TH1 を葉緑体定位運動で発見している。BLUS1、TH1 とも、暗所で phot と複合体を形成していることが示唆されている。このような状況から、phot 光信号伝達機構全貌の解明には、『リンカー領域の構造機能相関の解明』、『分子間信号伝達への展開』、『分子の時間的動態解析』が必須である。

### 2. 研究の目的

植物の光情報伝達機構の一つ、迅速な応答を可能にしているフォトトロピン (phot) リン酸化信号カスケードの初期過程 (光受容体 phot による基質のリン酸化) の分子内、分子間信号伝達過程の分子機構を構造学的視点、および時間的視点から明らかにすることがねらいである。phot 分子内信号伝達経路の探索、phot-複合体の信号伝達における時間的展開に注目し、光信号伝達機構全貌の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

phot の構造機能相関に関わる時空間発展に注意を払いながら生化学実験、SAXS、結晶構造解析等の手法を用いて以下のことを明らかにする。

(1) phot 分子内信号伝達に関わるアミノ酸残基の探索。特にリンカー領域に注目し、信号伝達経路上に位置するアミノ酸残基を見つける。

(2) phot および phot との相互作用が知られている BLUS1 や TH1 との複合体の構造解析を行い、構造機能相関を見いだす。

(3) phot および、phot 複合体の光誘起による分子動態の時間的展開の追跡を行う。これらにより、phot における青色光受容からリン酸化シグナルカスケードに至る過程の分子レベルでの信号伝達機構、信号伝播の時間的展開を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) Phot1 LOV2-STK のリンカー領域のアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体のリン酸化活性の解析を行った (図 1)。

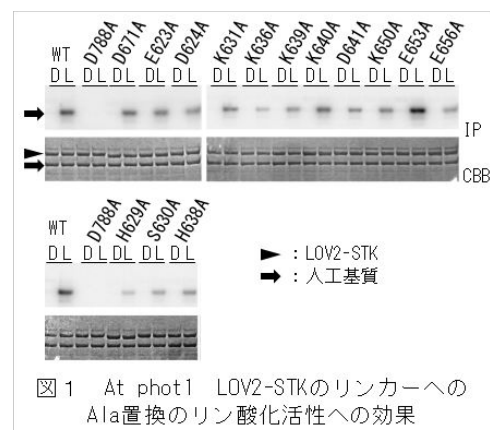


図 1 At phot1 LOV2-STK のリンカーへの Ala 置換のリン酸化活性への効果

His629, Ser630, Lys636 の変異体では、LOV2 の光反応には影響はわずかであったが、活性の低下がみられたことから、これらのアミノ酸残基が分子内情報伝達やキナーゼの制御にかかわっていることが示唆された。トリプシンによるペプチドマップの解析では、LOV2-リンカーのほうが LOV2-J よりも切断が起こりにくく、リンカーが安定化にかかわっていると考えられた。また、リンカー領域は、ヘリックスを形成していることが 2 次構造予測により示唆された。phot において、リ

ンカー領域が STK の制御に重要な役割を担っていることが考えられる。この成果は、Kashojiya S. *et. al.* (2016)として学術誌に発表した。

(2) Cr\_phot 全長の単体での結晶化を目指し、キットによる初期スクリーニングを行った。複数条件から結晶形成がみられたため、結晶の最適化を試みた結果、30  $\mu\text{m}$  程度の結晶を得ることが出来た。研究室所有の装置にて結晶の反射を測定したが、結晶が小さいことと結晶性が低いことから構造解析が可能な散乱パターンが得られなかったため、SP-ring8 BL32 ビームラインでの測定を行った。回折パターンの解析から、結晶格子の大きさが SAXS で得られた分子概形よりも小さいことがわかった。結晶が黄色を呈していることを考慮すると、ここで得られた結晶は、分解した LOV1 もしくは LOV2 の結晶であったと考えられる。At\_phot2 全長についても、結晶化条件の検討を行っているが結晶は得られていない。Cr および At\_phot2 は精製したサンプルの分解が全長での結晶化の妨げになっている1つの要因であると考えられた。Phot が結晶化が困難なタンパク質である可能性が考えられたため、クライオ電子顕微鏡による構造解析を行った。この測定法では、調整したサンプル溶液を凍結し、測定を行うため結晶化の必要がなく、サンプル分解の問題も回避できる等の利点がある。測定条件検討として酢酸ウランでのネガティブ染色での観察を At\_phot2 全長で行った。At\_phot2 全長の二量体と思われる、20 nm ほどの分子が確認できた。この大きさは、SAXS 解析から得られている分子の大きさに近い。クライオ電子顕微鏡測定を行ったところ、ネガティブ染色で見られたような分子は観察できなかった。At\_phot2 の溶液が 0.5M の NaCl と 10% (w/v) のグリセロールを含むことがクライオ電子顕微鏡観察の測定条件に適していないことが考えられた。そこで、NaCl とグリセロールを低濃度にし、タンパク質濃度 5mg/ml で凝集が起こらない条件の検討を行ったが、低濃度での凝集の回避できなかった。変異体等を含めたサンプルの条件検討が必要である。

(3) phot1\_LOV2-STK に関して、SPRing-8 BL45XU にて SAXS 実験を実施し、青色光依存的な構造変化の解析をおこなった。さらに、青色光・暗条件だけでなく青色光励起状態から暗状態への時間分解解析も行った。過渡的な構造変化を示すプロファイルを得た。phot1\_LOV2-STK では、phot2 と異なり 2 量体を形成していた。青色光照射依存構造変化は、phot2 と同じような LOV2 と STK ドメイン間の配向の変化が示唆された。また、キナーゼ活性の低下が起こる LOV2 の N 末端領域の変異体 K475A やリンカー領域の K636A 変異体の解析も行った。K475A では、青色光照射依存的に分子の凝集

と暗所での凝集の解消が観察された(図2)。凝集の解消は LOV2 の暗回帰に遅れて起こっていた。アミノ酸残基の置換により、本来の分子内信号伝達をする構造変化が起こらなくなり、代わりに凝集が起こったものと考えられる。LOV2 の N 末端領域が LOV2 での光受容の信号をキナーゼに伝える上で構造的にも重要な役割を担っていることが示された。また、最小機能領域でのドメイン配向が phot1 と phot2 とで異なることから、phot1, phot2 の全長の構造が異なることが示唆された。これらの結果は、Oide M. *et. al.* (2016)として学術誌に発表した。

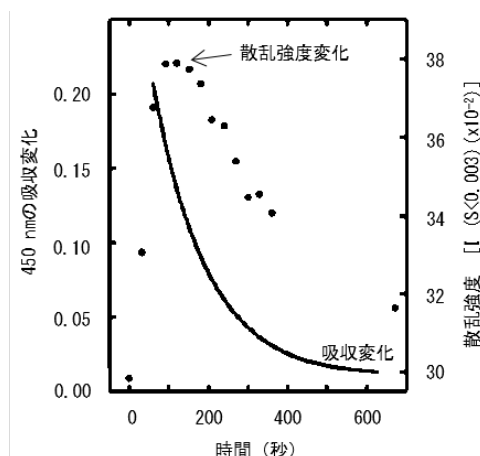


図2 At phot1 LOV2-STK K475Aにおける LOV2の暗回復と光依存的凝集解消の時間変化

(4) Phot2 全長の自己リン酸化活性測定、non-RI 実験系としてリン酸基結合試薬を使った検出法の検討を行った。リン酸化状態の異なる phot2 の検出はできたが、光依存的な自己リン酸化の検出はシグナルが弱くできなかった。調整したサンプルの比活性が低いことと光依存的ではないリン酸化部位のリン酸化が多いことが検出を困難にしている原因であると考えられる。

(5) phot2 との相互作用が知られている BLUS1 と TH1 について、*in vitro* での複合体形成を試みた。BLUS1、TH1 とともに大腸菌で発現させ、精製することができた。調整した BLUS1 や TH1 を精製した phot2 と混合後、ゲル濾過クロマトグラフィーによる溶出時間の違いにより複合体形成の検出を行った。しかし、phot2 の溶出時間は変化せず、複合体は検出できなかった。そこで、phot2/BLUS1、phot2/TH1 の大腸菌での共発現系からの His タグを使ったプルダウンアッセイを行った。しかし、複合体の形成は見られなかった。BLUS1 はキナーゼドメインの C 末端側にテールを持ち、TH1 は N 末端側に天然変性領域を持つ。これらが *in vitro* の条件下では不安定で phot2 との複合体形成ができなかった可能性がある。

(6) LOV ドメインの光反応サイクルの数理モデルを基にして、LOV2-STK のリン酸化活性

についてのモデルの作成を行った。LOV2 の S390 状態が STK の活性化状態であると仮定し、基質のリン酸化の量が S390 状態の量に比例すると近似して、光量の変化や LOV2 の暗回帰速度の違いによる基質のリン酸化量を見積もった。この見積もりが、以前得ていた phot1 LOV2-STK とその変異体のリン酸化活性の実験結果がよく一致したことから、上記モデルのような機構で LOV2 による STK 活性の調節が行われていると考えられる (図 3)。この結果については学術誌 (岡島、2016、光合成研究) に発表した。

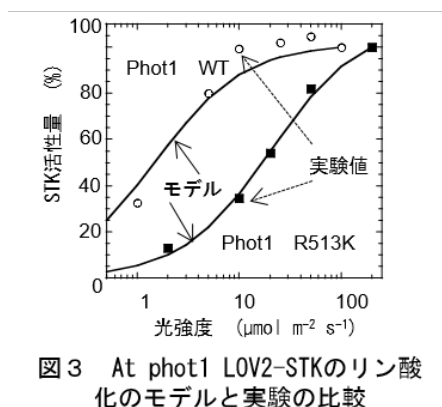


図 3 At phot1 LOV2-STK のリン酸化のモデルと実験の比較

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

岡島 公司

フラビン結合型光受容体の多様な光反応とシグナル伝達機構

光合成研究、査読有、26 号 2 巻、2016 年 138-148

Oide M, Okajima K, Kashojiya S, Takayama Y, Oroguchi T, Hikima T, Yamamoto M, Nakasako M

Blue-light-excited LOV2 triggers a rearrangement of the kinase domain to induce phosphorylation activity in Arabidopsis phototropin1

Journal of Biological Chemistry. 査読有 Vol. 291, No. 38, (2016), pp.19975-19985.

DOI: 10.1074/jbc.M116.735787

Okajima K

Molecular mechanism of phototropin light signaling

Journal of Plant Research 査読有 (2016) Vol. 129 No. 2, 2016, 149-157.

DOI:10.1007/s10265-016-0783-6

Kashojiya S, Yoshihara S, Okajima K, Tokutomi S.

The Linker between LOV2-J $\alpha$  and STK Plays an Essential Role in the Kinase Activation by Blue Light in Arabidopsis Phototropin1, a Plant Blue Light Receptor

FEBS Lett. 査読有 (2016) Vol. 590 No. 1, 2016,

139-47.

DOI: 10.1002/1873-3468.12028.

Takemiya A, Doi A, Yoshida S, Okajima K, Tokutomi S, Shimazaki K

Reconstitution of an initial step of phototropin signaling in stomatal guard cells

Plant Cell Physiology 査読有 (2016) Vol. 57 No. 1, 152-9.

DOI:10.1093/pcp/pcv180.

徳富 哲、岡島 公司、吉原 静江  
紫外光から遠赤色光まで、多様な植物光受容体

生物物理 査読無、2015 年、55 巻 181-186

DOI: 10.2142/biophys.55.181

〔学会発表〕(計 2 件)

藤井 亮太、岡島 公司、児玉 豊  
ゼニゴケにおけるフォトトロピンの LOV ドメインを介する葉緑体逃避反応  
第 58 回日本植物生理学会年会

2017 年 3 月 16 ~ 18 日

鹿児島大学 (鹿児島県・鹿児島市)

吉原 静江、石黒 志保、田中 大樹、大久保 陽子、加川 貴俊、西塚 順子、岡島 公司、徳富 哲

phyC の短波長吸収特性は進化的に保存されている

第 57 回日本植物生理学会年会

2016 年 3 月 18 日 ~ 20 日

岩手大学 (岩手県・盛岡市)

〔図書〕(計 1 件)

岡島 公司

フォトトロピン

光と生命の事典

朝倉書店 pp. 162-163

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡島 公司 (Koji Okajima)

慶應義塾大学 理工学研究科 特任助教

研究者番号: 20438245