

令和元年6月26日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21293

研究課題名(和文)青色光受容体「クリプトクロム」の磁場認識メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of magnetic field recognition in blue light receptor Cryptochrome

研究代表者

直原 一徳 (Zikihara, Kazunori)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：90458000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光依存の磁気センサータンパク質として仮説が立てられている青色光受容体「クリプトクロム」を用いて、青色光照射に伴う磁気の発生について磁気特性測定装置(MPMS3)を用いて測定することを試みた。

2018年度に入って、ゼブラフィッシュ由来のクリプトクロムの一種「Zf_Cry-DASH」のタンパク質溶液を用いて青色光照射を行い、光反応に伴って形成されるラジカル状態の磁化発生をMPMS3により検出する測定を遂行した。結果としては、現在のところまだ磁気特性を示すMPMS3シグナルの検出には至っておらず、さらなる測定条件の検討が必要であると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、光依存の磁気センサータンパク質として仮説が立てられている青色光受容体「クリプトクロム」を用いて、青色光照射に伴う磁気の発生を磁気特性測定装置(MPMS3)により測定することを試みた。

渡り鳥や回遊魚が地球規模の移動を迷うことなく実行することは、私たち驚かせるとともに興味を引き立てる現象である。それらの生物は地磁気を認識しているという考え方が一般的にあり、磁気センサータンパク質が存在するという仮説が報告されていた。しかしながら、未だにその真偽やメカニズムは謎に包まれていたため、本研究により少しでも知見が得られれば大きなインパクトがあることが期待された。

研究成果の概要(英文)：In this study, using a blue light receptor "cryptochrome" hypothesized as a light-dependent magnetic sensor protein, we tried the measuring of the magnetism generation associated with blue light irradiation by Magnetic Property Measurement System (MPMS 3). Protein solution of zebrafish-derived cryptochrome "Zf_Cry-DASH" was irradiated by blue-light LED, and the measurement of the detecting the magnetization generation of the radical state formed along with the photoreaction was performed using MPMS3. As a result, it has not yet reached the detection of MPMS3 signal showing magnetic properties at present, and it is considered that further study of measurement conditions is necessary.

研究分野：生物物理学

キーワード：クリプトクロム 生物磁気センサー 光有機電子移動反応 ラジカル形成 磁気特性測定装置(MPMS3)

1. 研究開始当初の背景

渡り鳥や回遊魚が地球規模の移動を迷うことなく実行することは、私たち驚かせるとともに興味を引き立てる現象であった。それらの生物は地磁気を認識しているという考え方が一般的にあり、磁気センサータンパク質が存在するという仮説が報告されていた。しかしながら、未だにその真偽やメカニズムは謎に包まれていたため、本研究により少しでも知見が得られれば大きなインパクトがあることが期待された。近年、磁気センサータンパク質の候補として、生物界に広く分布している青色光受容体的一种「クリプトクロム」が注目され始めた。ちょうど我々は数種類のクリプトクロム試料を、良質な溶液として大量調整する技術を有しており、またクリプトクロム光反応の基礎的なデータや知見を得ていた。

そのため研究当初は、外部磁場がある状態および無い状態でクリプトクロムの光反応(光誘起電子移動反応)がどのように変化するかを、紫外・可視分光光度計にて光反応中心の吸収スペクトル変化を経時測定し、反応速度定数の変化量の算出から検証することを計画していた。

しかし、クリプトクロムの磁気認識の有無を測定するために考案していた光学系と磁界発生系の(分光光度計におけるクリプトクロム試料の位置に、任意の強度および角度の外部磁場を発生させる系)構築が計画通りには進まなかった。しかしながら一昨年より、所属していた大阪府立大学理学系研究科において、磁気特性測定装置(MPMS3)の実験系が使用可能になった。そのため「MPMS3を用いた青色光照射によるクリプトクロムの磁化変化」の測定に、研究手法をシフトした。

2. 研究の目的

渡り鳥や回遊魚が方向認識する際、地球磁場を認識していると言われる。しかし、そのメカニズムはまだ解明されていない。これまで、生物の磁気認識を説明するために「Magnetite-based mechanism (MBM)」および「Radical-pair mechanism (RPM)」が提唱されてきた。近年になって、ショウジョウバエでの遺伝子変異体を用いた研究から、青色光受容体「クリプトクロム」が光依存的な磁気認識に関与することが発表されてトピックになっていた。本研究は、高純度の精製クリプトクロムを用いて、その光誘起磁気認識メカニズムを、物理化学的側面から解明することを目指した。本研究の測定結果によっては、クリプトクロムが生物磁気センサーとして機能する可能性を支持し、生物の磁気認識という長年謎に包まれていた現象を分子レベルで解明することができる。

3. 研究の方法

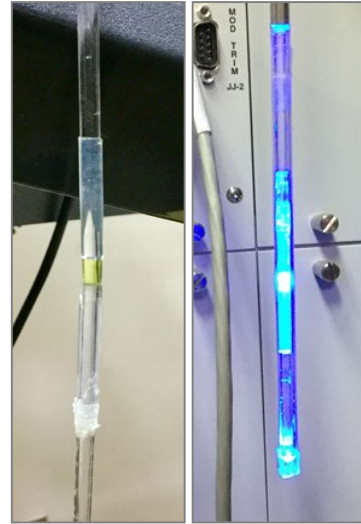
生物磁気センサーの測定対象として、数百 μM レベルの高濃度かつ良質であるゼブラフィッシュ由来のクリプトクロム的一种(Zf_Cry-DSAH)の溶液を大量調整した。クリプトクロムは光反応中心の発色団としてフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)を非共有的に結合しており、光照射により「酸化型→ラジカル型→還元型」と変化する。FADの3状態のうち、ラジカル型は電子スピン磁気モーメントを有するため、磁気測定の対象となる。そのためクリプトクロムの光反応中間体が形成する過程においては、磁気特性測定装置(MPMS3)を用いて磁化シグナルの検出が期待された。

MPMS3で常温の溶液試料の測定を可能にするために、熱収縮チューブを用いて溶液を封入する特殊な試料ホルダーを作成した。また、遠隔操作でクリプトクロムの光照射をコントロールするために青色LEDの光を石英ガラス経由で試料ホルダーへ照射する系を構築した。

測定は、暗状態におけるZf_Cry-DSAH溶液のMPMS3シグナルに対して、光照射によりどれだけ磁化(emu)が変化するかを観測を試みた。試料の温度条件が整った後に、暗状態での保持時間を30分間置き、青色LED($\lambda_{\text{max}}=450\text{nm}$)の連続光照射を行い、MPMS3による磁化の時間変化を測定した。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

- ・左図：Zf_Cry-DASH 溶液を試料ホルダーにセットした磁気特性測定装置 (MPMS3)
- ・右図：高濃度 Zf_Cry-DASH 溶液サンプルの光照射前 (黄色溶液) および青色光照射中。



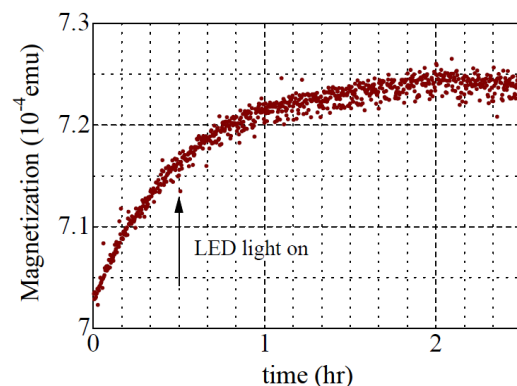
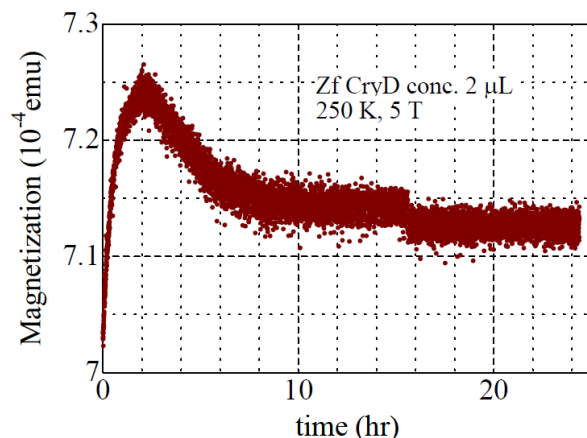
4. 研究成果

約 300 μ M の高濃度クリプトクロム (Zf_Cry-DASH) 溶液に対して、450nm をピークに持つ青色光 LED を照射して MPMS3 の測定を試みた。生理的条件下での磁化効果を確認する目的で、最初は室温 (298K) で測定を行った。しかしながら MPMS3 の試料室を真空状態にする際、試料ホルダーのリークにより溶液が蒸発してしまい、解析不可能なノイズばかりの結果となった。(data-not-shown)

そこで、試料室温度を 250K にし、0.3mM の Zf_Cry-DASH 溶液で MPMS3 の測定を行った。この温度下においてクリプトクロム溶液は凍結状態であるため、蒸発によるノイズは検出されなかった。光反応速度は 10 倍以上低下するが、十分にラジカル状態を形成する温度条件であることは先行研究で明らかであった。

下左図は、250K で Zf_Cry-DASH 溶液に青色光照射した際に、MPMS3 によって測定された磁化変化の 24hrs タイムコースである。測定開始の 2 時間後まで磁気が増大し、その後減衰している様子が観察された。この 2 つの指数関数の重なりで表されるような増減は、クリプトクロムの光反応におけるラジカル形成のタイムコースを酷似していた。

しかしながら本測定において、青色光 LED 照射を開始したのは測定開始から 30 分後であった。測定開始から 2 時間後までを拡大すると、照射前から磁気が増大が観測されていることが伺えた(右下図)。このことから、観測されていた磁化の減衰曲線はクリプトクロムのラジカル形成によるものではなく、MPMS3 のベースライン変化を検出しているに過ぎない可能性が大きかった。



様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

以上より、MPMS3 を用いてクリプトクロム光反応における磁気特性の測定を行うためには、より精密に測定系を考える必要があり、またクリプトクロムの高濃度化も必要であることが予測された。

今後は、さらに高濃度クリプトクロム溶液(2mM レベル)を調整し、測定に際しては MPMS3 のベースライン変化が検出されなくなるまで暗状態の待機時間を長くした条件で、連続光照射を行い MPMS3 による磁化変化の検出を試みることを検討している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kuroi K, Sato F, Nakasone Y, Zikihara K, Tokutomi S, Terazima M.

Time-resolved fluctuation during the photochemical reaction of a photoreceptor protein: phototropin1LOV2-linker.
Phys Chem Chem Phys. 2016 Feb 17;18(8):6228-38. doi: 10.1039/c5cp07472j.
10.1039/C5CP07472J

〔学会発表〕(計 1 件)

直原一徳

シロイヌナズナ Phytochrome-B 光反応における直線偏光・左右円偏光の影響
植物円偏光研究会

2016年01月25～26日

北海道大学 (エイレンソウ 2F 第2会議室)

〔図書〕(計 1 件)

直原一徳 他、

朝倉書店

光と生命の事典 (78. クリプトクロム)

2016年02月25日

ISBN978-4-254-17161-7 C3545

400 (160-161)

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：野口悟

ローマ字氏名：NOGUCHI SATORU

所属研究機関名：大阪府立大学理学系研究科 教授

(2)研究協力者

研究協力者氏名：徳富哲

ローマ字氏名：NOGUCHI SATORU

所属研究機関名：大阪府立大学理学系研究科 名誉教授

(現：東北大学理学部附属植物園)

(3)研究協力者

研究協力者氏名：桂ひとみ

ローマ字氏名：KATSURA HITOMI

所属研究機関名：大阪府立大学 研究推進課 管理運営グループ

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

(4)研究協力者

研究協力者氏名：藤堂剛

ローマ字氏名：TODO TAKESHI

所属研究機関名：大阪大学 医学系研究科 教授

(現：大阪大学 放射線科学基盤機構附属ラジオアイソトープ総合センター 招へい教授)

(5)研究協力者

研究協力者氏名：石川智子

ローマ字氏名：ISHIKAWA TOMOKO

所属研究機関名：大阪大学 医学系研究科 助教

(現：大阪大学 放射線科学基盤機構 特任研究員)

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。