

平成22年 4月19日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19370070

研究課題名(和文) 高等植物フィトクロムの結晶構造解析

研究課題名(英文) Crystallographic analysis of higher plant phytochrome

研究代表者 徳富 哲 (TOKUTOMI SATORU)

大阪府立大学大学院・理学系研究科・教授

研究者番号：90142009

研究成果の概要：固着生活を送る植物は光を重要な環境情報として用いており、進化の過程で主に赤色光領域の光受容体であるフィトクロムとフォトトロピンなどの複数の青色光受容体を獲得してきた。本研究ではフィトクロムの結晶構造解析を目指して研究を行ったが結晶を得ることができなかった。結晶化条件スクリーニングで幾つかの有望な結果を得て引き続き研究を行っている。一方、当初目的にはなかったが、フォトトロピンに関して、シロイヌナズナの2種類のフォトトロピンの光受容ドメインの一つである LOV1 の結晶構造解析を行い、LOV ドメインの初めての二量体構造を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
年度			
総計	8,500,000	2,550,000	11,050,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

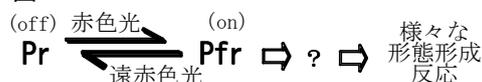
キーワード：植物、光受容体、フィトクロム、フォトトロピン、結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

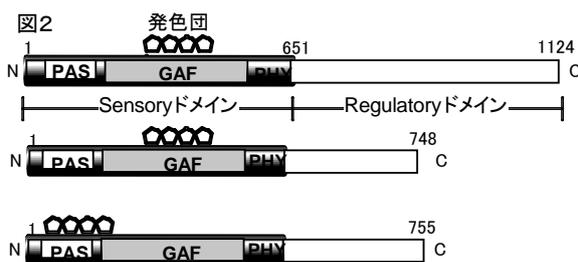
固着生活をおくる植物は、環境変化を正確に感知し、それに対して適切に応答して、発芽・成長し、効率よく光合成を行い、開花・結実して子孫を残さなければならない。光は重要な環境要因の一つであり、いずれの過程にも光による制御機構が働いている。フィトクロムは、これらの光形態形成反応の主要な光センサーの一つであり、今から約55年前に見つけられて以来、世界中で多くの生理学的研究が成されてきた。

フィトクロムは色素タンパク質で、常温で安定な赤色光吸収型 Pr、および遠赤色光吸収型 Pfr のいずれかの状態をとり、その間を可逆的に光変換することができる。Pfr が生理反応を誘き起こす活性型であり、可逆的な光スイッチとして働くと考えられてきた(図1)。高等植物には、A型(phyA)からE型

図1



(phyE)まで5種類のファミリーの存在が知られている。植物フィトクロム分子はホモダイマー構造をとっており、モノマー分子は大まかに、N-末端側の光受容に関わる sensory ドメインと、C-末端側の光シグナル伝達に関わると考えられている regulatory ドメインに分けることができる。sensory ドメイン内にはGAFと呼ばれるドメインが存在して、保存されたシステインに開環テトラピロール発色団(フィトクロモビルン)を共有結合している。そのN-末端にPASドメインおよびC-末端側にフィトクロム特異的なPHYドメインが存在する(図2上)。



近年、ゲノムプロジェクトの進展にともない、シアノバクテリア等の光合成細菌、さらには非光合成性細菌などにもフィトクロム様タンパク質が見つかり、これらはバクテリオフィトクロムと総称されている。バクテリオフィトクロムの regulatory ドメインの多くはヒスチジンキナーゼモチーフをもち、二成分系を介したシグナル伝達に関与していると考えられる。一方、その sensory ドメインには、植物フィトクロム同様に発色団をGAFドメイン内の保存されたシステインに結合するシアノバクテリアのCph1などのタイプI(図2中)と、GAFドメインでは無くN-末端のPASドメインに保存されたシステインに結合するタイプII(図2下)の2種類が存在する。

フィトクロムの可逆的な光反応は、高等動物ロドプシンのベクトル的あるいはバクテリオロドプシン、PYPなどのサイクル的な光反応と異なり、二つの準安定状態間を相互変換し、トリガーではなくスイッチとして働くというユニークな性質を持つ点で注目されている。これは植物に必要な光情報およびその処理システムの特徴、例えば光による遺伝子発現制御などの分子機構の特徴を反映していると考えられる。植物およびバクテリオフィトクロムともに sensory ドメインのみで、全長フィトクロムと同様な可逆的な吸収スペクトル変化を示すことから、光反応の可逆性に関わる分子パーツは、総て sensory ドメイン内に存在すると考えられ、その立体構造および光反応にともなう構造変化の解明が期待されていた。

本研究申請前年の2005年、世界初のフィトクロム sensory ドメインのPr型の部分(PAS-GAF部分)立体構造が発表された(Wagner et al., *Nature* 438, 325-331, 2005)。この研究で用いられたのは、放射線耐性菌のDrBphPと呼ばれるタイプIIのバクテリオフィトクロムで、発色団は植物フィトクロムと異なりフィトクロモビルンホモログのビリベルジンであり、結合場所もGAFドメインでは無くN-末端PASドメインである(図2下)。発表された結晶構造(図3上、PDBデータ1ztuより作成)の大きな特徴は、PAS(紺色)およびGAFドメイン(橙色)間の相互作用面で、発色団結合システインを含むN-末端フラグメントが、GAFドメインから投げ縄の様に延びたループをくぐり、三つ又の結び目を形成していることである。

2. 研究の目的

DrBphPも、植物フィトクロムとよく似た吸収スペクトル変化を示すことから、発色団結合サイトの差異にも拘わらず、植物フィトクロムとタイプIIバクテリオフィトクロムの発色団結合ポケットの立体構造は似ていると考えられる。しかし、京大の長谷らのグループにより、シロイヌナズナB型フィトクロム(phyB)で、センソリードメインが光反応のみならずシグナル伝達機能も保持することが示されており(Matsushita et al., *Nature*, 2003)、センソリードメインの可逆的な光反応の分子機構を解き明かすことから、光シグナル伝達機構解明の糸口をつかめる可能性もある。以上のように生物物理学のみならず植物生理学にとっても重要な結果を与えると考えられる。バクテリオフィトクロムに比べて重要度が圧倒的に高い植物フィトクロムの sensory ドメインの構造解明は、急務であると考えられた。さらにヒスチジンキナーゼとは異なるシグナル伝達メカニズムをもつ regulatory ドメインを含む植物フィトクロム全長構造を解明することは、フィトクロム研究者にとって長年の夢である。本研究ではこれらの立体構造解析を目的とした。

3. 研究の方法

発色団を結合した光変換活性をもつホロタンパク質は以下の三通りの方法で調製を試みた。1) アポタンパク質を大腸菌発現系で調製した後に、フィトクロモビルンアナログ発色団であるフィコシアノビルンと再構成し、発色団を結合したホロタンパク質を精製して用いる。2) フィコシアノビルン発現系をもつ大腸菌内でアポタンパク質を共発現させ、大腸菌内でホロタンパク質を作らせる。以上の二つにシロイヌナズナフィトクロムBを用いた。3)

これ以外にアラスカエンドウ黄化芽生えより生化学的に調製した large (N-末端の約 60 アミノ酸残基、NTS, を欠損) フィトクロム A も用いた。

(1) 再構成系を用いる方法

・アポタンパク質の調製

大腸菌を用いた発現系では全長フィトクロム B は、大部分が不溶性画分に行くために調製が非常に難しくこれは取り扱わなかった。シロイヌナズナ phyB センソリドメインは N-末端より 651 アミノ酸残基 (N651) である。また、phy ドメインを欠く 450 アミノ酸残基 (N450) を発色団と再構成すると、N651 と良く似た紫外-可視吸収差スペクトルを示すので、N450 は Pr/Pfr 可逆的な光変換を持つ光分子スイッチの最小単位と言える。さらに N450 から上記 NTS を欠損させた N450 Δ は、Pr と褪色した吸収スペクトルを示す吸収型中間体 (meta-Rc) との間を可逆的に光変換反応することが報告されており、可逆性という意味では N450 Δ も保持していることになる。さらにこのコンストラクトから PAS を欠損 (N450 Δ 2) させても、発色団結合能をもつことが知られているが、その光反応に関しては詳細なデータが無く、この中に可逆性の分子基盤の一部が存在する可能性もある。以上の 4 種類のコンストラクトを GST 融合タンパク質として大腸菌発現系により発現させ、グルタチオンカラムで精製後トロンピンカットによりアポタンパク質の精製を行う。

・フィコシアノピリンとの再構成

再構成用の発色団はフィトクロモピリンアナログの一つであり、調製の容易なフィコシアノピリン (PCB) を用いた。PCB はフィコシアニンよりメタノリシスで精製し、Lagarias and Lagarias, 1989 の方法で行った。植物フィトクロムアポタンパク質はバクテリオフィトクロムと異なりと PCB との再構成効率が低く、光活性を持たない分子種の混入率が高いという問題点を持つ。分光学的な測定ではこれは問題にならないが、結晶化に供する純度の試料を得るために、純品の精製が必要である。様々なカラムクロマトグラフィーによる精製を試みたが、未だ結晶化に供する純品の充分量の調製に成功していない。

(2) 共発現系を用いた試料調製

当研究室では、バクテリオフィトクロムの一つ PixJ1 の GAF ドメインの研究で、PCB 共発現系をもつ大腸菌を作成し、PixJ1 に特有の青色光吸収型-緑色光吸収型間を可逆的に光変換する GAF ドメインの調製に成功している。この PCB 発現大腸菌を用いて、上記アポタンパク質のコンストラクトを共発現し、大腸菌内でホロタンパク質の再構成を目指したが、1)と同じ理由で未だ結晶化に供

する純品の充分量の調製に成功していない。

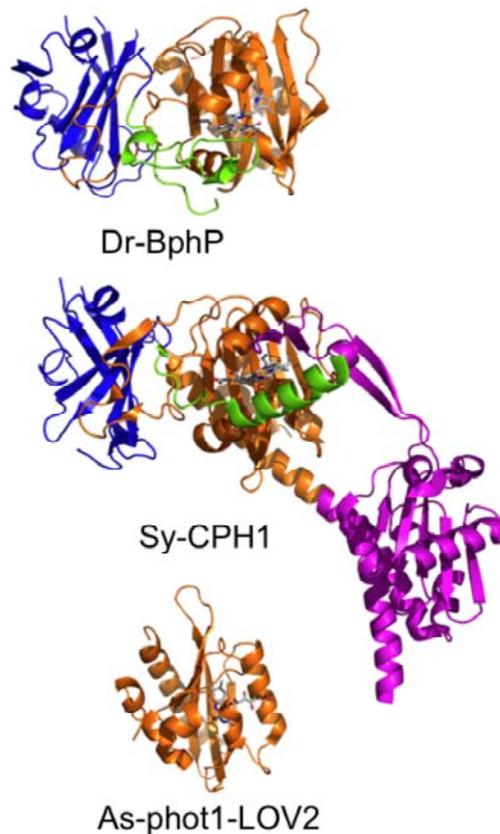
(3) 黄化芽生えからの生化学的調製

1)、2)の試料調製法が暗礁に乗り上げたためにアラスカエンドウ黄化芽生えからの large フィトクロム A の調製を試み、純品を得て、クリスタルスクリーンキットを用いた結晶化条件のスクリーニングを行った。幾つかの結晶化条件で有望な結果を得ているが、未だ結晶化には至っていない。

(4) フォトトロピン LOV1 ドメインの結晶化

フィトクロムが赤色光域の光センサーであるのに対して、フォトトロピンは植物の青色光受容体で、光屈性の光受容体として見つけられ、その他光合成活性の最適化を行う光制御反応の光受容体としても働くことが明らかになり注目されている。フォトトロピン分子 N-末端側に、PAS ドメインサブファミリーである LOV ドメインと呼ばれる光受容ドメインを二つ、それぞれ LOV1 と LOV2、C-末端にセリン/スレオニン・キナーゼドメインをもち、光により制御されるタンパク質リン酸化酵素の機能をもつ(図 4)。LOV ドメインは FMN を発色団として非共有的に結合しているが、GAF ドメインとよく似た α/β フォールドを持ち、発色団ポケットの位置もよく似ている (図 3 下、オート麦 phot1-LOV2 の結晶構造、PDB データ 2v0u より)。

図3



上記フィトクロムの結晶化に挑戦しているのと同時期に、大腸菌発現系を用いて調製したシロイヌナズナの2種類のフォトロピン、**phot1** と **phot2** の LOV1 の結晶構造解析に成功した。本来の研究目的とは異なるが、ここでこの結果も取りあげたい。

図4



4. 研究成果

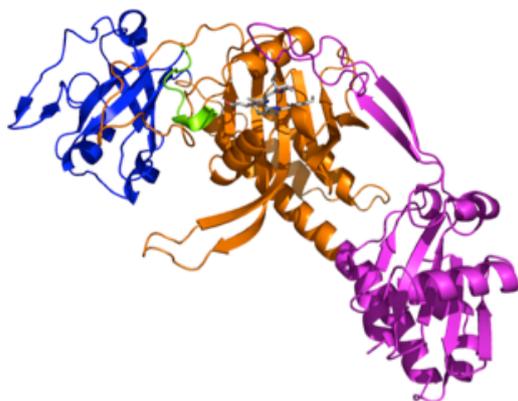
(1) シロイヌナズナ phyB センソリドメイン

現在までの所シロイヌナズナのフィトクロム B センソリドメインの4種類のポリペプチドについては、純品精製に成功して居らず引き続き研究を継続中である。

(2) アラスカエンドウ large フィトクロム A

精製試料を用いて結晶化条件のスクリーニングを行い、幾つかの有望な条件が浮かんできたのでこれをさらに詰める実験を行っている。その最中に、タイプ I のバクテリオフィトクロム (図2中) の一つであるシアノバクテリア **Cph1** のセンソリドメインの結晶構造が報告された (Essen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008) (図3中、PDBデータ 2vea、紺色: PAS ドメイン、橙色: GAF ドメイン、紫色: PHY ドメイン)。どちらも Pr 型の結晶構造であるがタイプ I の GAF ドメイン中の発色団ポケットとタイプ II の PAS と GAF との間に存在する発色団ポケットの構造および発色団の構造がかなり異なっていることが解る。regulatory ドメインが同じヒスチジンキナーゼである二種類のバクテリオフィトクロム間の、これらの差異を見ると、シグナル伝達様式の全く異なる高等植物フィトクロムの構造解析の重要性が改めて示された。参考のため図5に、シロイヌナズナ **phyB** の PAS (紺色)、GAF (橙色)、PHY (紫色) ドメインの立体構造予測モデルを示す。図4中の **Cph1** と比べて GAF ドメインの構造がかなり異なっているのがわかる。

図5 (<http://swissmodel.expasy.org/>)

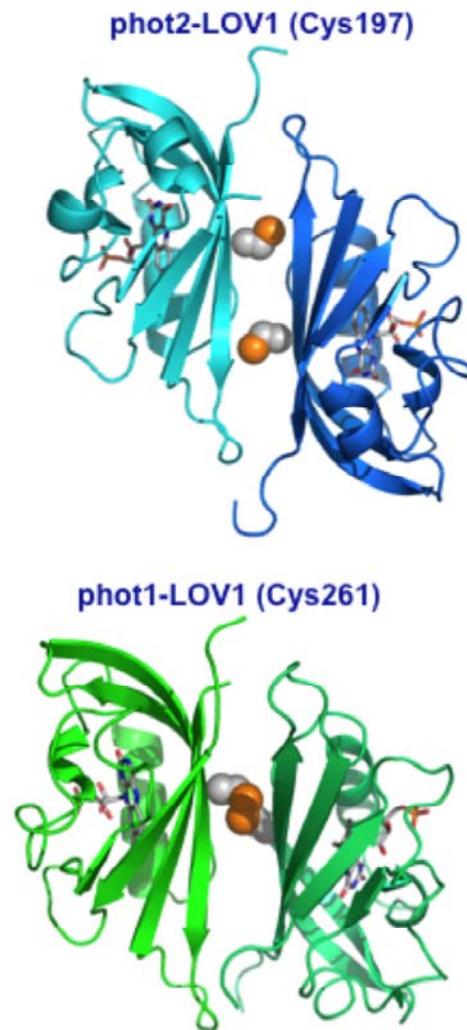


結晶構造解析は地道な長い努力が必要であり、現在も研究は継続している。

(3) シロイヌナズナ phot-LOV1 ドメイン

フォトロピンキナーゼの光による活性制御には主として LOV2 が分子スイッチの役割を果たし、LOV1 は光感度調節とダイマーサイトとして働くと考えられていたが、これまで提出されたデータで LOV1 のダイマー構造を示す物は結晶構造を含めて無かった。我々は、シロイヌナズナの **phot1** と **phot2** の LOV1 の結晶構造を解き、これらが5本βストランドからなる反応平行βシートからなるβスcaffoldingで逆向きに結合して二量体を作っていることが解った (図6)。興味深いことに **phot1** の LOV1 ダイマーでは、保存されたシステインが S-S 結合を形成できる距離にあり、ダイマー構造が S-S 結合により安定化されているのに対して、**phot2** では対応するシステムの位置が遠すぎて S-S 結合が形成できない (図6のボールモデル)。Phot2 では **phot1** のシステインの位置にスレオニンが有り、水素結合を介したダイマー安定化機構が

図6



働いていると考えられる。これらのダイマー構造が溶液中でも保存されているかどうかを、化学架橋、還元剤の効果などを調べて検証し、このS-S結合を介したダイマー安定化機構が還元的な雰囲気の中で存在できることを証明した。

この phot1 と phot2 でのダイマー安定化機構の違いは、phot1 と phot2 の機能の違い、phot1 が低光量から中強光領域の光をセンスするのに対して、phot2 が強光センサーとして働く、の分子基盤の一つになっている可能性があり、これらの点を調べるための重要な分子的知見を与えた。

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 17 件)

- ① Koyama, T., Iwata, T., Yamamoto, A., Sato, Y., Matsuoka, D., Tokutomi, S. and Kandori, H. Different role of the J α helix in the light-induced activation of the LOV2 domains in various phototropins. *Biochemistry* 48 巻 7621-7618 2009 年 有
- ② Tanaka, K., Nakasone, Y., Okajima, K., Ikeuchi, M., Tokutomi, S. and Terazima, M. Oligomeric State-Dependent Conformational Change of the BLUF Protein TePixD (T110078) *J. Mol. Biol.* 386 巻 1290-1230 2009 年 有
- ③ Yamamoto, A., Iwata, T., Sato, Y., Matsuoka, D., Tokutomi, S. and Kandori, H. Light Signal Transduction Pathway from the Flavin Chromophore to the J α helix of *Arabidopsis* Phototropin1. *Biophys. J.* 96 巻 2771-2778 2009 年 有
- ④ Kikuchi, S., Unno, M., Zikihara, K., Tokutomi, S., and Yamauchi, S. Vibrational Assignment of the Flavin-Cysteine Adduct in a Signaling State of the LOV Domain in FKF1. *J. Phys. Chem.* 113 巻 2913-2921 2009 年 有
- ⑤ Pfeifer, A., Majerus, T., Zikihara, K., Matsuoka, D., Tokutomi, S., Heberle, J. and Kottke, T. Time-Resolved FT-IR Study on Photoadduct Formation and Secondary Structural Changes within the Phototropin LOV Domain. *Biophys J* 96 巻 1462-1470 2009 年 有
- ① Katsura, H., Zikihara, K., Okajima, K., Yoshihara, S. and Tokutomi, S. Oligomeric structure of LOV domains in *Arabidopsis* phototropin. *FEBS Lett.* 583 巻 526-530 2009 年 有
- ⑦ Nakasone, Y., Eitoku, T., Zikihara, K., Matsuoka, D., Tokutomi, S. and Terazima, M. Stability of Dimer and Domain-Domain Interaction of *Arabidopsis* Phototropin 1 LOV2. *J. Mol. Biol.* 373 巻 904-913 2008 年 有
- ⑧ Nakasako, M., Zikihara, K., Matsuoka, D., Katsura, H. and Tokutomi, S. Structural Basis of the LOV1 Dimerization of *Arabidopsis* Phototropins 1 and 2. *J. Mol. Biol.* 381 巻 718-733 2008 年 有
- ⑨ Nakasako, M., Hirata, M., Shimizu, N., Hosokawa, S., Matsuoka, D., Oka, T., Yamamoto, M. and Tokutomi, S. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the LOV1 domains of phototropin 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallogr. Sect F* 64 巻 617-621 2008 年 有
- ⑩ Zikihara, K., Ishikawa, T., Todo, T. and Tokutomi, S. Involvement of electron transfer in the photoreaction of Zebrafish Cryptochrome-DASH. *Photochem. Photobiol.* 84 巻 1016-1023 2008 年 有
- ⑪ Yamamoto, A., Iwata, T., Tokutomi, S. and Kandori, H. Role of Phe1010 in the Light-Induced Structural Changes of the neol-LOV2 Domain of *Adiantum*. *Biochemistry* 47 巻 922-928 2008 年 有
- ⑫ Tokutomi, S., Matsuoka, D. and Zikihara, K. Molecular structure and regulation of phototropin kinase by blue light. *Biochim. Biophys. Acta* 1784 巻 133-142 2007 年 有
- ⑬ Matsuoka, D., Iwata, T., Zikihara, K., Kandori, H. and Tokutomi, S. Primary processes during the light-signal transduction of phototropin. *Photochem. Photobiol* 83 巻 122-130 2007 年 有
- ⑭ Nakasone, Y., Eitoku, T., Matsuoka, D., Tokutomi, S. and Terazima, M. Dynamic studies of conformational changes of *Arabidopsis* phototropin 1 LOV2 with the linker domain. *J. Mol. Biol.* 367 巻 432-442 2007 年 有
- ⑮ Eitoku, T., Nakasone, Y., Zikihara, K., Matsuoka, D., Tokutomi, S. and Terazima, M. Photochemical intermediates of *Arabidopsis* phototropin 2 LOV2 associated with conformational changes. *J. Mol. Biol.* 371 巻 1290-1303 2007 年 有
- ⑯ Sato, Y., Nabeno, M., Iwata, T., Tokutomi, S., Sakurai, M. and Kandori, N. He

terogeneous Environment of the S-H Group of Cys966 near the Flavin Chromophore in the LOV2 Domain of *Adiantum* Neochromel. *Biochemistry* 46 巻 10258-10265 2007年 有

- ⑰ Iwata, T., Yamamoto, A., Tokutomi, S. and Kandori, H. Hydration and Temperature Similarly Affect Light-Induced Protein Structural Changes in the Chromophoric Domain of Phototropin. *Biochemistry* 46 巻 7016-7021 2007年 有

〔学会発表〕(計9件)

- ① Tokutomi, S. 「Molecular basis for regulation of phototropin kinase by blue light」 Memorial Symposium for the 24th International Prize for Biology, Celebrating Dr. Winslow R. Briggs “Biology of Sensing” 2009年12月2～3日 Kyoto
- ② Yoshihara, S., Zikihara, K., Tokutomi, S. 「Photoreaction of a Blue/Green Reversible Phytochrome-Like Photoreceptor Studied By Low-Temperature Spectroscopy」 International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic Organisms - 2009年7月26～31日 Montlay CA USA
- ③ Tokutomi, S. 「Regulation of phototropin kinase by blue light」 15th International Congress on Photobiology- 2009年6月18～23日 Düsseldorf Germany
- ④ 徳富哲、直原一徳、岡島公司、桂ひとみ、吉原静恵 「フォトリロピンの光受容ドメインの分子構造、光反応、キナーゼ活性光制御」日本植物生理学会第50回年会, シンポジウム2009年3月21～24日 名古屋
- ⑤ Tokutomi, S. 「How blue light regulates kinase activity of phototropin」 34th Annual Meeting of American Society for Photobiology 2008年6月20～25日 San Francisco USA
- ⑥ Tokutomi, S., Zikihara, K., Okajima, K., Katsura, H., Yoshihara, S., Nakasko, M. 「Structural basis for the photoreception of Arabidopsis phototropin」 15th Anniversary Meeting for Korean Society of Photoscience 2008年9月26～28日 Jeju Korea
- ⑦ 中迫雅由、直原一徳、松岡大介、桂ひとみ、徳富哲 「シロイヌナズナ・フォトリロピン1および2、LOVドメインのダイマー形成分子基盤」日本植物生理学会第49回年会 2008年3月20日～22日 札幌
- ⑧ Tokutomi, S. 「Structural basis of the light regulation of phototropin Ki

nase」 Gordon Research Conference 2008年1月20日～26日 Ventura CA USA

- ⑨ 中迫雅由、松岡大介、直原一徳、桂ひとみ、徳富哲 「シロイヌナズナ・フォトリロピン1および2 LOV1ドメインの結晶構造解析」日本生物物理学会第45回年会 2007年12月21日～23日 横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~toxan/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳富 哲 (TOKUTOMI SATORU)

大阪府立大学大学院・理学系研究科・教授
研究者番号：90142009

(2) 研究分担者

中迫 雅由 (NAKASAKO MASAYOSHI)

慶応義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：30227764

吉原 静恵 (YOSHIHARA SHIZUE)

大阪府立大学大学院・理学系研究科・助教

研究者番号：20382236