

平成 21 年 4 月 4 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770028

研究課題名（和文） 青色光情報伝達による光合成細菌の遺伝子発現の分子機構

研究課題名（英文） Blue-light regulation of gene expression in purple bacteria

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

研究成果の概要：

- 1) 光受容体 AppA がリン酸化することを明らかにした。
- 2) リン酸化部位が T30 であることを明らかにした。
- 3) リン酸化は二成分制御系のレスポンスレギュレーターとの機能的相互作用に重要であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学/植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答

1. 研究開始当初の背景

申請者は近年紅色細菌よりフラビンを発色団とする新規の青色光受容体 AppA を同定した。そのフラビン結合ドメインは原核・真核生物に幅広く保存されていることがわかり、フォトトロピンおよびクリプトクロムに次ぐ、フラビンを色素とする新規の青色光受容体であることがわかった。生化学、分光学、結晶構造解析を組み合わせ、この光受容体の光サイクル反応においては、色素の大きな構造変化は起こらず、

フラビンと特定のアミノ酸側鎖との水素結合ネットワーク変化が起こり、それが光依存的な活性制御に重要であることを明らかにした。これは通常の光受容体が、発色団の光異性化や共有結合形成により、光シグナル伝達を行なうことと対照的であり、極めて特異な性質である。また AppA は光依存的に直接転写因子 PpsR と相互作用することがわかり、光シグナルを直接転写因子へ受け渡すという点が、他の光受容体には見られない大きな特徴であった。この

ように光依存的なAppAの構造変化のメカニズムは明らかとなってきたが、その構造変化がどのように下流の因子PpsRに伝達されるのかはわかっていない。

一方、申請者が現在所属する研究室では、光依存的に光合成遺伝子発現を制御する因子SPBを同定している。SPBは光合成遺伝子のプロモーターに結合する因子として同定されたが、近年の研究から大腸菌におけるヒストン様タンパク質HN-Sファミリーに属することが明らかにされた。SPBは*in vivo*で光依存的にリン酸化されることがわかっており(Shimada et al. 1993)、それが光合成遺伝子発現の制御において重要であると考えられている。しかしながらSPBのリン酸化タンパク質は未だ不明である。またAppA-PpsRの制御システムとSPBのそれとがどのようにリンクし、光合成遺伝子の発現制御を行なうのかに関しても仮説すら無いのが現状であった。

2. 研究の目的

予備的実験からAppAは自己リン酸化能を持つことがわかった。このAppAの自己リン酸化活性は光依存的であった。ロドブシンやフォトリピン等多くの光受容体において自己リン酸化反応が報告されており、多くの場合、それら光受容タンパク質の光感受性に影響を与えることがわかっている。このことからAppAにおいては、1)自己リン酸化がAppAの光反応に影響を及ぼす、2)自己リン酸化後リン酸をSPBに渡すことでその機能を制御する、という2つの可能性が考えられた。2つの観点から研究を進め、最終的に光合成細菌の光受容から遺伝子発現制御に至る光シグナル伝達系の全過程を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

- (i) 精製タンパク質の試験管内での自己リン酸化活性を放射性同位体実験で調べる。
- (ii) リン酸化アミノ酸分析によりリン酸化部位の特定を行う。
- (iii) リン酸化部位に部位特異的変異を起こし、その変異体の活性を調べる。
- (iiii) 部位特異的変異をゲノムに戻し、リ

ン酸化の生理的役割を調べる。

4. 研究成果

- (i) AppAは光依存的にリン酸化することがわかった。
- (ii) リン酸化部位はT30であった。
- (iii) リン酸化は転写因子PpsRとの相互作用には影響を及ぼさず、二成分制御系のレポンスレギュレーターPrrAとの相互作用に重要であることがわかった。
- (iiii) リン酸化部位に変異を持つ組換え体は光合成遺伝子の発現が恒常的に上昇しており、光抑制が失われていた。

以上の結果からAppAのリン酸化はPrrAの活性化能を失わせるのに必要であることがわかった。二成分制御系と光受容体が機能的相互作用している初めて結果であり重要な発見である。

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., Hasegawa, K., Ohta, H. and Ono, T. (2008) Crucial role in light signal transduction for the conserved Met93 of the BLUF protein PixD/Slr1694. *Plant Cell Physiol.* 49: 1600-1606. 査読有
- ② Masuda, S., Berleman, J., Hasselbring, B. M. and Bauer, C. E. (2008) Regulation of aerobic photosystem synthesis in the purple bacterium *Rhodospirillum centenum*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7: 1267-1272. 査読有
- ③ Masuda, S., Tozawa, Y. and Ohta, H. (2008) Possible targets of "magic spots" in plant signaling. *Plant Signaling Behavior* 3: 1021-1023. 査読有
- ④ Mizusawa, K., Masuda, S. and Ohta, H. (2008) Expression profiling of four RelA/SpoT-like proteins, homologues of bacterial stringent factors, in *Arabidopsis*

thaliana. *Planta* 228: 553-562. 査読有

⑤ Masuda, S., Mizusawa, K., Narisawa, T., Tozawa, Y., Ohta, H. and Takamiya, K. (2008) The bacterial stringent response, conserved in chloroplasts, controls plant fertilization. *Plant Cell Physiol.* 49: 135-141. 査読有

⑥ Wakita, M., Masuda, S., Motohashi, K., Hisabori, T., Ohta, H. and Takamiya, K. (2007) The significance of Type II and PrxQ peroxiredoxins for antioxidative stress response in the purple bacterium *Rhodospira rubra*. *J. Biol. Chem.* 282: 27792-27801. 査読有

⑦ Nakasone, Y., Ono, T., Ishii, A., Masuda, S. and Terazima, M. (2007) Transient dimerization and conformational change of a BLUF protein: YcgF. *J. Am. Chem. Soc.* 129: 7028-7035. 査読有

⑧ Masuda, S., Tomida, Y., Ohta, H. and Takamiya, K. (2007) The critical role of a hydrogen bond between Gln63 and Trp104 in the blue-light sensing BLUF domain that controls AppA activity. *J. Mol. Biol.* 368: 1223-1230. 査読有

⑨ Chung, Y., Masuda, S. and Bauer, C. E. (2007) Purification and reconstitution of PYP-phytochrome with biliverdin and 4-hydroxycinnamic acid. *Methods Enzymol.* 422: 184-189. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

① 増田真二 “新規青色光受容体の同定と機能の解析” 日本植物生理学会、名古屋、2009年3月22日

② 増田真二、富田祥之、松岡大介、太田啓之、高宮建一郎 “紅色細菌の青色光受容 BLUF タンパク質 AppA のリン酸化を介した光シグナル伝達” 日本植物学会、高知、2008年9月25日

③ 増田真二、“BLUF タンパク質における青色光シグナルの受容と伝達の分子機構” 大阪大学蛋白質研究所セミナー「生物における光情報変換の一般性と多様性」、大阪、2008年4月15日

④ 富田祥之、増田真二、富田祥之、松岡大介、太田啓之、高宮建一郎 “BLUF タンパク質 AppA はリン酸化を介した光シグナル伝達を行う” 日本植物生理学会、札幌、2008年3月20日

⑤ Masuda, S. “Site-directed mutagenesis study of BLUF proteins” Gordon Research Conferences, Photosensory Receptors & Signal Transduction. January 30th, 2008. Ventura, USA

⑥ 増田真二、富田祥之、太田啓之、高宮建一郎：“紅色細菌の光合成装置形成における青色光受容 BLUF タンパク質 AppA の Q63L/W104A 変異の影響” 日本生物物理学会第43回年会、横浜、2007年12月20日

⑦ Masuda, S., Ikeda, R., Masuda, T., Hashimoto, H., Tsuchiya, T., Mimuro, M., Ohta, H. and Takamiya, K. “Complementation analysis of an Arabidopsis *PORA* knockdown mutant by cyanobacterial *PORs*” 7th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors in Photosynthetic Organisms. December 10th, 2007, Kyoto, Japan.

⑧ Masuda, S. “Blue-light control of bacterial photosystem synthesis” International Symposium on Biosynthesis of Tetrapyrroles” December 8th, 2007. Shiga, Japan.

⑨ Masuda, S., Ikeda, R., Masuda, T., Tsuchiya, T., Mimuro, M., Ohta, H. and Takamiya, K. “Cyanobacterial NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR) compensates for knockdown mutation of *PORA* in Arabidopsis *thaliana*” 14th International Congress of Photosynthesis. August 15th, 2007. Glasgow, Scotland.

〔図書〕（計 1 件）

① Klug, G. and Masuda, S. (2008) Regulation of genes by light. In *The Purple Photosynthetic Bacteria: Advances in Photosynthesis and Respiration* (Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C., Beatty, J.T., Eds.), Vol. 28, pp. 727-742, Springer, Dordrecht, The Netherlands.

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