

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06093

研究課題名(和文)磁覚の情報伝達機構における蛋白質分子基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidation of protein molecular basis in the information transmission mechanism of magnetoreception

研究代表者

新井 栄揮 (Arai, Shigeki)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・上席研究員

研究者番号：00391269

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)：光受容蛋白質の一種であるCRY4は、鳥類における磁気感覚を担う物質の一つと考えられている。本研究では、X線小角散乱法を駆使し、代表的磁覚保有種であるヨーロッパコマドリ由来erCRY4の三次構造や自己会合性が光応答的に変化することを幅広い空間分解能スケールで明らかにした。また、電位依存性カリウムチャンネルサブファミリーVの細胞内ドメインの一部(erKCNV2-2)がerCRY4と相互作用することを明らかにし、その相互作用によってerCRY4が空間秩序的に配列した会合体を形成しうることを発見した。得られた知見は、erCRY4を起点とした磁場情報知覚化の機構解明に資する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果は、CRY仮説の大きな問題点の一つである量子論的現象と分子論的機構の接点の解明に資するものであり、磁気感覚の蛋白質分子基盤の解明に大きく貢献する。また、本成果は、磁場情報と感覚モダリティとの関係性を調べる際の重要な基礎的知見の一つとなる。将来的には、erCRY4やerKCNV2と構造的に相同なCRYやCRY-R候補分子を保有する生物種をゲノム情報等から網羅的に調べることで、磁場影響を受けやすい生物種を分子論的に推定することが可能になると期待できる。このようなアプローチは、人工磁場等の生物影響を体系的に研究するための新たな手段となり得る。

研究成果の概要(英文)：CRY4 is one of the photoreceptor proteins thought to be involved in the mechanism by which birds recognize the inclination angle of geomagnetic field. By using the small-angle X-ray scattering method, which can provide structural information on a wide range of spatial resolution scales, we revealed that the tertiary structure and oligomeric state of erCRY4 from European robin, a representative magnetoreceptor species, change in response to light. We also confirmed that a part of the intracellular domain of the voltage-gated potassium channel subfamily V (erKCNV2-2) interacts with erCRY4. Moreover, we found that the interaction between erKCNV2-2 and erCRY4 could induce the spatially ordered oligomerization of erCRY4. These findings contribute to the elucidation of the mechanism of magnetic field information perception originating from bird's CRY4.

研究分野：生物物理学

キーワード：磁覚 X線小角散乱 タンパク質 相互作用

1. 研究開始当初の背景

鳥類・哺乳類・両生類・爬虫類・魚類・甲殻類・昆虫類など多くの動物種が渡り・帰巢・採餌・繁殖などの行動に磁場の方位・角度・強さなど情報を利用する[1]。これらの能力は「磁気感覚」あるいは「磁覚」と呼ばれる。代表的な磁覚保有種として知られるヨーロッパコマドリなどの渡り鳥や 1000km 以上の距離を帰巢するカワラバトなどでは、光受容蛋白質クリプトクロム(CRY)を利用する仮説が有力視されている。CRY 仮説では、「CRY 分子内の補因子であるフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)が青色光を含む波長領域の光(紫外～青色光)を受容すると、FAD とトリプトファン(Trp) からなるラジカル対(RP)が発生し、その RP が有する孤立電子の電子スピンを利用して地磁気のような弱地場を検出する」という機構が基本原理とされている。これまで CRY の光化学反応スキーム・量子論的機構が詳細に調べられてきたが[2]、その反応機構は非常に複雑であり、全容は未解明である(図 1)。当該研究分野では、多くの研究者がこの反応スキームの解明を目指しているが、CRY が検出した磁場情報を神経系へ伝達して知覚化する機構については殆ど明らかにされていない。この知覚化機構を解明するためには、CRY からのシグナル伝達を仲介するエフェクター分子(CRY 受容体、以下 CRY-R)の探索が必要である。これまでに、ヨーロッパコマドリ由来 erCRY4 においては、グアニンヌクレオチド結合蛋白質 G(t)サブユニット 2(GNAT2)、長波長感受型オプシン(LWS)、グアニンヌクレオチド結合蛋白質サブユニット 10(GNG10)、カリウム電位依存性チャネルサブファミリー V メンバー 2(KCNV2)、レチノール結合蛋白質 1(RBP1)、レチノール G 蛋白質共役受容体(RGR)などが CRY-R の候補に挙げられている[3]。また、カワラバト由来 dCRY4 では、鉄硫黄クラスターアセンブリ 1 ホモログ(ISCA1)などが CRY-R の候補に挙げられている[4,5]。しかし、それら CRY-R 候補分子と CRY4 との相互作用の実態や、相互作用に伴う CRY4 の構造・物性への影響は明らかにされていない。例えば、LWS・KCNV2・RGR は膜貫通ドメインを有する蛋白質であり、先行研究[3]では酵母 2 ハイブリッドシステムにより膜貫通ドメインも含めた全長体を細胞質内で発現させて erCRY4 との相互作用が調べられている。従って、膜蛋白質である CRY-R 候補分子は非天然状態となって CRY4 と相互作用した可能性も否定できない。また、各 CRY-R 候補自体の構造・物性も未解明な点が多い。更に、CRY4 の RP と磁力線との相対角を定めるためにも機構も不明であり、且つ、そもそも CRY4 の構造・物性に関する知見も不足していた。

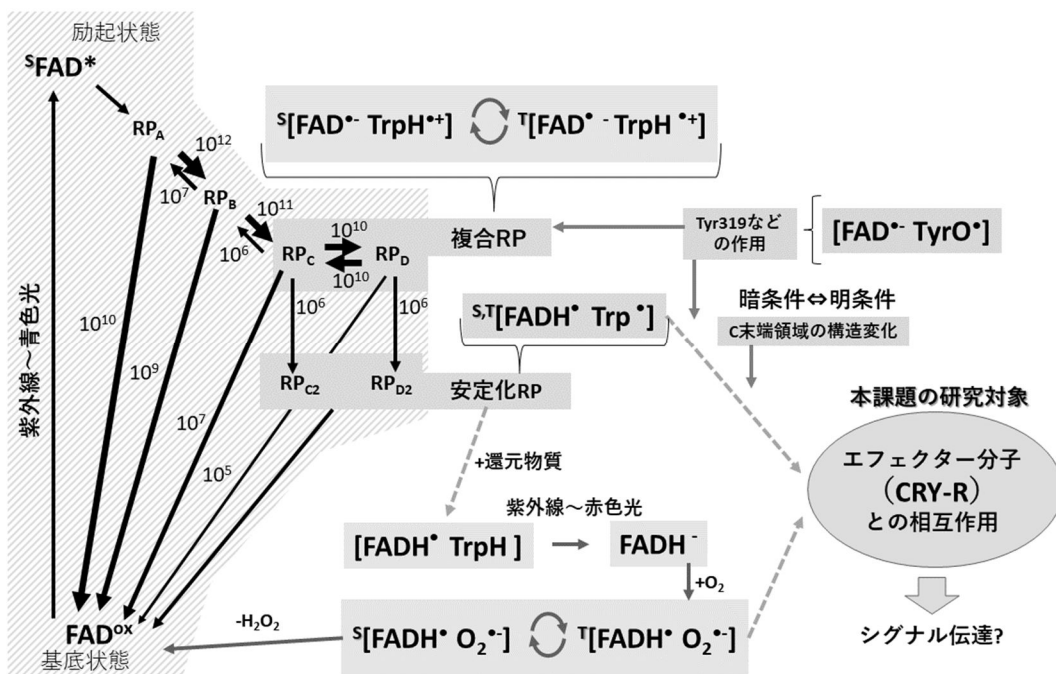


図 1 2024 年 5 月時点までに報告されている反応プロセスをまとめた CRY の光化学反応の全体像。S 及び T は、それぞれ一重項状態と三重項状態。斜線部分はヨーロッパコマドリ由来 erCRY4 において明らかにされた反応プロセス(数値は大まかな反応速度定数(s⁻¹))。曲線矢印は、電子スピン相関状態にある RP の外部磁場依存的な項間交差。破線矢印は未解明の反応プロセス。

2. 研究の目的

鳥類の CRY4 が受容した磁場情報を知覚化する機構の解明に向けた基礎的知見を得ることを目標とし、下記の検討を実施した。

- CRY4 の光受容時の分子挙動や構造的特徴を明らかにする。
- CRY-R 候補を作製し、その構造・物性を明らかにする。
- CRY4 と CRY-R 候補との相互作用時の分子挙動を明らかにする。

3. 研究の方法

前述の CRY-R 候補分子のうち、RBP1・RGR・ISCA1 は細胞質蛋白質であり、GNAT2・LWS・GNG10 は細胞質側の細胞膜上に固定された蛋白質である。CRY4 は細胞質蛋白質であることから、これらの CRY-R とは細胞質内で相互作用すると考えられる。そこで、CRY4 及びこれら CRY-R 候補分子は、全長体をコードした人工遺伝子を設計し、大腸菌遺伝子組換えにより作製を試みた。一方、LWS・KCNV2・RGR は膜貫通ドメインを有する蛋白質であり、封入体として発現するため、細胞質に露出している細胞質ドメインのアミノ酸配列のみをコードした人工遺伝子を設計し、大腸菌遺伝子組換えによる作製を試みた。結果として、ヨーロッパコマドリの erCRY4・erGNAT2・erISCA1 の全長体、erKCNV2 の細胞質ドメイン 2 (以下、KCNV2-2)、カワラバトの cISCA1 全長体を可溶化状態で作製することに成功した。

作製した各蛋白質は、高エネルギー加速器研究機構の放射光施設 Photon Factory の BL-10C を利用した X 線小角散乱解析(SAXS)により溶液構造を調べるとともに (課題番号 2020G003, 2022G003) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) やリアルタイム PCR を用いた熱安定性測定により CRY4/CRY-R 候補分子との相互作用を調べた。特に、CRY4 については、光受容時 (明状態) と遮光時 (暗状態) の溶液構造の違いを調べるために、上記 SAXS や SEC の光環境を制御しつつ、CRY4 の光受容と構造・機能との相関の解明を試みた。

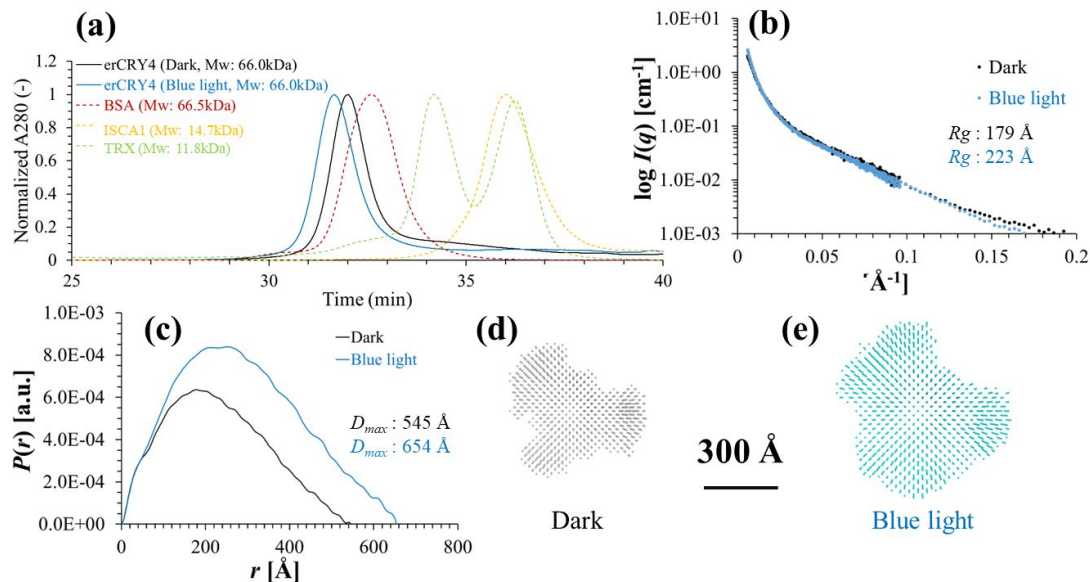


図 2. erCRY4 自己会合体の構造的特徴。黒は暗状態、青は明状態 (青色光受容時)。 (a) SEC による溶出ピークのプロファイル。点線は標準試料としての牛血清アルブミン (BSA)、ISCA1、チオレドキシン (TRX)。 (b), (c) erCRY4 の SAXS 測定によって得られた小角域 ($q=0.006\text{--}0.195\text{ \AA}^{-1}$) の散乱関数 $I(q)$ 及び距離分布関数 $P(r)$ 。 (d), (e) *Dammin* プログラムによって SAXS データから推定された erCRY4 自己会合体の外形。

4. 研究成果

(1) 光応答的な erCRY4 の構造可変性の特徴を解明

SEC による分析の結果、erCRY4 (分子量 66.0kDa) は標準試料である牛血清アルブミン (66.5kDa) よりも SEC カラムから早く溶出することが分かった (図 2a)。この SEC の結果は erCRY4 が自己会合体を形成して二量体以上に多量体化していることを示唆する。また、明状態と暗状態の erCRY4 について SEC による比較を行ったところ、明状態の方が暗状態よりも分子サイズが増大していることを示す結果が得られた (図 2a)。そこで、SAXS により実空間分解能

$d=32-1047 \text{ \AA}$ の構造情報を反映する q 領域 ($q=0.006-0.195 \text{ \AA}^{-1}$) の散乱曲線 $I(q)$ を測定し、明状態と暗状態の erCRY4 の構造的特徴を比較した (図 2b)。その結果、 $I(q)$ の Guinier 近似により求まる erCRY4 自己会合体の平均慣性半径 R_g は光照射によって 179 \AA から 223 \AA へ増大していることが明らかになった。また、 $I(q)$ のフーリエ変換処理によって得られる距離分布関数 $P(r)$ からは、分子内ベクトル分布の重心に相当するピーク位置、及び、 $P(r)=0$ の位置から定まる粒子の最大径 (D_{max}) とともに、暗状態よりも明状態の方が増大していた (図 2c)。これらの結果は、明状態では erCRY4 の自己会合が促進されたことを示唆する。更に、より具体的な会合体形状を見積もるために、プログラム *Dammin* [6] により、SAXS データから erCRY4 自己会合体の外形を反映するビーズモデルを構築した (図 2d,e)。その結果、明状態・暗状態とも不定形な会合体を形成しうるが、そのサイズは明状態の方が増大していることが示唆された。

次に、上述の SAXS データよりも高分解能域 ($q=0.05-0.5 \text{ \AA}^{-1}$) の構造情報 (実空間分解能 $d=13-126 \text{ \AA}$) を反映する $I(q)$ を測定し、明状態・暗状態における erCRY4 単分子~分子内構造の特徴を比較した。その結果、erCRY4 単量体レベルでは、暗状態よりも明状態の方が、三次構造が収縮している可能性が明らかになった (図 3a,b)。また、より具体的な分子モデルを構築するために、erCRY4 の相同蛋白質の X 線結晶構造 PDB: 3FY4 (配列相同性 44.8%) および PDB: 6PU0 (配列相同性 87.9%) を鋳型として erCRY4 単量体の分子モデルを構築し、実測した $I(q)$ と整合性の高い三次構造モデルを基準振動解析により探索する *SREFLEX* 解析 [7] を行った。その結果、青色光受容により、erCRY4 の C 末端領域付近は erCRY4 本体側に接近して分子収縮する分子モデルが最適解として推定された (図 3)。ニワトリ由来 ggCRY4 を用いた先行研究では、明状態において ggCRY4 の C 末端領域の運動性が抑制されていることが示されている [8]。本研究の結果は、そのような他種鳥類の先行研究の結果とも整合する。本研究では、erCRY4 は光受容によりラジカル対を発生するとともに、erCRY4 単量体レベルでの構造変化も生じ、更には自己会合性の変化も生じることなどが明らかになった。

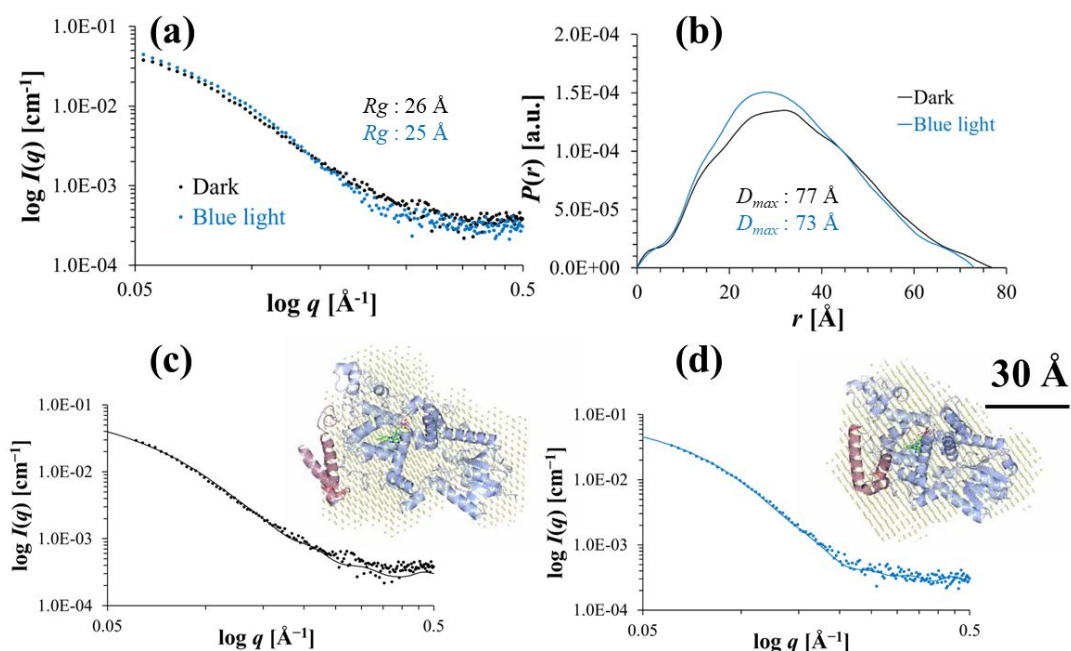


図 3. erCRY4 における $q=0.05-0.5 \text{ \AA}^{-1}$ の領域の SAXS 測定結果。黒は暗状態、青は明状態 (青色光受容時)。 (a), (b) はそれぞれ $I(q)$ と $P(r)$ 。 (c), (d) はそれぞれ *SREFLEX* 解析によって推定された暗状態と明状態の erCRY4 単量体レベルでの分子モデル。赤色の鎖は C 末端領域。 (c), (d) のプロットにおいて、点線は実測した散乱関数、実線はモデルに基づく理論散乱関数を示す。

(2) erCRY4/erKCNV2-2 相互作用時の分子挙動の特徴を解明

作製した CRY-R 候補分子のうち、erKCNV2-2 (6kDa) は erCRY4 と相互作用する可能性が高いことが確認できた。リアルタイム PCR の技術を応用し、青色光照射下における erCRY4 単独、erKCNV2-2 単独、erCRY4/erKCNV2-2 混合液の熱安定性を比較した結果、erCRY4/erKCNV2-2 混合液の熱転移温度は erCRY4 単独よりも 2 程度上昇していた (図 4)。この結果は、erCRY4 と erKCNV2-2 が青色光受容時に相互作用して熱安定性が向上したことを示唆する。一方、*in vitro* においてカワラバト由来 clCRY4 と相互作用することが知られる clISCA1 は、erCRY4 と混合しても熱転移温度の変化は $0.4 \text{ }^\circ\text{C}$ 程度であった。この結果から、erCRY4 と clISCA1 は生物種を超えた交差反応を生じる可能性が低いことや、生物種によって

CRY-R の種類が異なる可能性が示された。

更に、erKCNV2-2 混在時の erCRY4 の構造への影響を調べるために、erCRY4 単独 (約 9 mg/mL)、erKCNV2-2 単独 (約 3 mg/mL)、erCRY4/erKCNV2-2 混合液 (約 2.5 mg/mL、モル比 1:3.3) に 10 分間太陽光を照射した後、それらの構造的特徴を SAXS 測定により調べた。本検討により、太陽光受容時においても、erCRY4 単独では青色光受容時と同様の分子形状が推定された。また、erKCNV2-2 単独では、低濃度且つ低分子量であったため、明確な散乱 X 線を検出できなかった。一方、erCRY4/erKCNV2-2 混合液では、erCRY4 単独の際に推定された会合体とは異なり、柱状会合体が形成されることが明らかになった (図 5)。SEC によってこの会合体を分取すると FAD に起因する 380nm 付近の UV 吸収が観測されたため、柱状会合体には erCRY4 が含まれていると推測された。ただし、この柱状会合体中に erKCNV2-2 が含まれているか否かは明らかにできていない。

(3) まとめ

本研究により、以下の成果・知見が得られた。

- erCRY4 の光応答的な構造変化の特徴を幅広い空間スケールで始めて明らかにすることができた。光受容により erCRY4 単量体の分子サイズは収縮し、C 末端領域は erCRY4 本体側に接近する可能性が明らかになった。また、それに伴い、erCRY4 の自己会合性が增大することを明らかになった。
- 光受容時に erCRY4 と erKCNV2-2 が混在していると、erCRY4 単独時に形成される不定形な会合体とは異なる柱状の会合体が形成されることが明らかになった。erCRY4 が柱状会合体中で空間規則的に配置して細胞膜上に固定されれば、CRY4 の RP と磁力線との相対角が定まるとともに、相互作用した erKCNV2 の細胞膜上の局所密度や配置規則性も高まる可能性がある。その際、磁場情報の一端は細胞膜電位を通じて神経系に伝達される可能性がある。

今後、erCRY4 が erKCNV2-2 だけでなく他の CRY-R 候補分子とも同時に相互作用する可能性や、CRY/CRY-R の相互作用の生物種依存性なども精査し、磁場情報知覚化機構の全容解明を目指す。

【引用文献】

- S. Johnsen and K. J. Lohmann, *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 703 (2005).
Xu J *et al.*, *Nature*. 594, 535 (2021).
H. Wu *et al.*, *Sci Rep* 10, 7364 (2020).
S. Qin *et al.*, *Nature Mater* 15, 217 (2016).
S. Arai *et al.*, *Protein Sci.* 31, e4313 (2022).
D.I. Svergun *Biophys J.* 76, 2879 (1999).
A. Panjkovich and D.I. Svergun, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18, 5707 (2016).
R. Watari, *et al.*, *J Biol Chem.* 287, 42634 (2012).

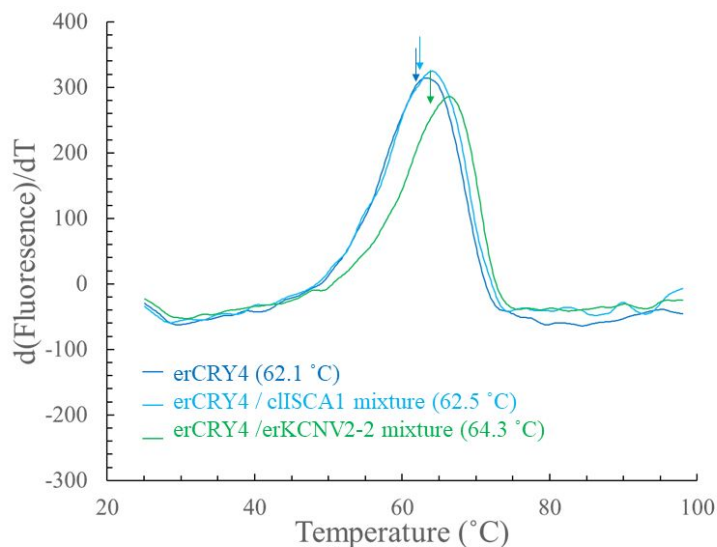


図 4. erCRY4 が含有する FAD の自家蛍光を利用して測定されたリアルタイム PCR による各種試料の熱転移曲線。転移温度は矢印及び括弧内に示す。

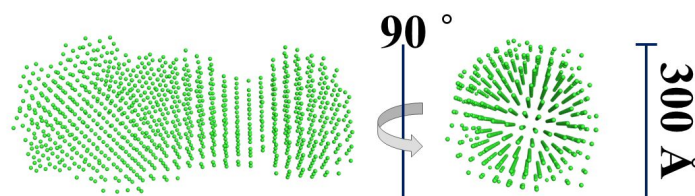


図 5. *Dammin* プログラムによって SAXS データから推定された erCRY4/erKCNV2-2 混合液中の会合体の外形。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Arai Shigeki, Shimizu Rumi, Adachi Motoyasu, Hirai Mitsuhiro	4. 巻 31
2. 論文標題 Magnetic field effects on the structure and molecular behavior of pigeon iron-sulfur protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 e4313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.4313	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shigeki ARAI, Rumi SHIMIZU, Motoyasu ADACHI, Mitsuhiro HIRAI	4. 巻 40
2. 論文標題 Novel Function of Pigeon Iron-Sulfur Protein for the Magnetoreception Predicted by SAXS Analysis with a Permanent Magnetic Device	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Photon Factory Activity Report	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Arai Shigeki, Shimizu Rumi, Adachi Motoyasu, Hirai Mitsuhiro	4. 巻 38
2. 論文標題 Fe-S cluster binding mechanism of pigeon's ISCA1 clarified by SEC-SAXS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photon Factory Activity Report	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 新井栄揮, 清水瑠美, 安達基泰, 平井光博	4. 巻 39
2. 論文標題 ISCA1蛋白質の分子挙動への磁場印加効果	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Photon Factory Activity Report	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Arai Shigeki, Shimizu Rumi, Adachi Motoyasu, Hirai Mitsuhiro	4. 巻 1
2. 論文標題 Self-Oligomerization of Pigeon Iron-Sulfur Protein Induced by Magnetic Field	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Photon Factory Highlight 2022	6. 最初と最後の頁 22-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 3件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 新井栄揮、清水瑠美、安達基泰
2. 発表標題 Structural change of cryptochrome 4 of European robin by blue light absorption
3. 学会等名 量子生命科学会第4回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shigeki Arai, Rumi Shimizu, Motoyasu Adachi, Mitsuhiro Hirai
2. 発表標題 Magnetic field response of cryptochrome partner candidate protein
3. 学会等名 Gordon Research conference, Quantum Biology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新井栄揮
2. 発表標題 「磁覚」～動物が磁場を感知する謎の能力～
3. 学会等名 千葉市科学館・大人が楽しむ科学教室(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新井栄揮
2. 発表標題 鳥たちの磁覚 ～磁場を感じる不思議な感覚の科学～
3. 学会等名 量子科学技術研究開発機構 量子生命・医学部門一般公開（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新井栄揮, 清水瑠美, 安達基泰, 平井光博
2. 発表標題 Structural changeability and oligomerization of the magnetoreceptor candidate ISCA1
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新井栄揮, 清水瑠美, 安達基泰
2. 発表標題 青色光照射によって誘導されるクリプトクロム4の構造変化と自己会合
3. 学会等名 2021年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Arai Shigeki, Shimizu Rumi, Adachi Motoyasu, Mitsuhiro Hirai
2. 発表標題 Structural studies of magnetic field-responsive proteins by small-angle X-ray scattering analysis
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新井栄揮, 清水瑠美, 安達基泰
2. 発表標題 鳥類の磁覚の機構における蛋白質基盤の構造学的洞察
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新井栄揮
2. 発表標題 小角散乱法による蛋白質の磁場応答性と磁覚の研究展開
3. 学会等名 PF研究会「物質・生命研究における小角散乱法の展開：現状と展望のための討論会」（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 日経サイエンス副編集長・出村政彬 52巻8号55～57ページ	4. 発行年 2022年
2. 出版社 株式会社 日経サイエンス	5. 総ページ数 3
3. 書名 日経サイエンス「動物たちの磁気感覚」	

1. 著者名 令和4年5月11日21面	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日刊工業新聞社	5. 総ページ数 1
3. 書名 日刊工業新聞「鳥の帰巣本能 タンパク質磁場情報変換」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

鳥の“帰巢本能”を解明する新たな手掛かりを発見
<https://www.qst.go.jp/site/press/20220511.html>
動物たちの磁気感覚
https://www.nikkei-science.com/202208_055.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------