

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20644

研究課題名(和文) 光依存的磁気受容体候補分子の反応機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the reaction mechanism of the light-dependent magnetoreceptor candidate molecule

研究代表者

大塚 浩晨(Otsuka, Hiroaki)

早稲田大学・理工学術院・助手

研究者番号：20907167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：鳥類等の生物は地磁気を認識する能力を有し、この磁気受容能には光受容タンパク質の量子的な反応特性が関与すると考えられている。しかしながら鳥類をはじめとした脊椎動物については、磁気受容分子の実態すら推定の段階である。そこで本研究では、磁気受容能を持つニワトリのクリプトクロム4(cCRY4)に着目し、cCRY4が磁気受容モデルに沿った光反応を示すこと、cCRY4を構成するチロシンのラジカル化が光反応にとって重要な役割を担う可能性があることを見出した。また、cCRY4における磁気シグナル受容状態の特定を目標とし、その準備段階として特定の状態で反応が留まる変異体を大量に作製する手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鳥類が持つ光依存的な磁気受容能の機構解明は、鳥類の生態把握や新規バイオ磁気センサーの開発、磁気を利用した非侵襲性ドラッグデリバリーシステムの開発等に役立つのみならず、量子効果の新たな応用につながる可能性もある。磁気受容機構の解明のために理論計算に基づくモデルが提唱され、磁気受容分子が磁気情報を検出し得ることが示されてきた。しかしながら、生体において磁気受容分子が獲得した磁気情報を、どのように情報伝達可能な形に変換していくのかはほとんど分かっていない。本研究の知見から、磁気受容分子が磁気情報を化学反応に変換している可能性が見いだされ、磁気情報検出機構の解明の一助になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Organisms such as birds have the ability to recognize the geomagnetic field, and it is believed that the quantum properties of photoreceptor proteins are involved in this magnetoreceptive ability. However, for vertebrates such as birds, even the substance of magnetoreceptor molecules is still at the estimation stage. In this study, we focused on Cryptochrome4 (cCRY4) in chickens, which has magnetoreceptive ability, and found that cCRY4 exhibits photoreaction in accordance with the magnetoreception model. In addition, we suggested that radicalization of tyrosine, one of the amino acids comprising cCRY4, may have the important role in the photoreaction of cCRY4. Moreover, with the goal of identifying the magnetoreception state in cCRY4, we established a method to produce a large number of mutant samples in which the reaction stays in a specific state as a preparatory step.

研究分野：分子生物学

キーワード：磁気受容 ラジカルペア 分光解析 光受容体

## 1. 研究開始当初の背景

鳥類や爬虫類、魚類、昆虫、細菌に至るまで、様々な生物において地磁気を受容する能力が見出されている。中でも鳥類や昆虫では、光のエネルギーによって駆動される磁気受容メカニズムが見出されている。この光駆動型磁気受容の根底を成すメカニズムに関しては未解明の部分が多く、磁気受容分子の実体すら未だ推定の段階である。これまでにいくつかの理論計算によって、光受容タンパク質の光励起によって生み出される 2 つの対電子 (ラジカルペア) がたどる化学反応の経路決定における磁気依存性を利用することによって地磁気情報を検出するという、ラジカルペアメカニズムが提唱された。ラジカルペアは、一重項状態または三重項状態のいずれかの状態を取り、さらに項間交差によってそれぞれの状態を行き来する。この項間交差によって三重項状態が形成される確率は、外部の磁気方向によって変化すると考えられている。一重項状態と三重項状態はそれぞれ反応性が異なるため、ラジカルペアを形成した磁気受容分子の反応は、ラジカルペアの状態が一重項か三重項かによって分岐し、それぞれ別々の反応経路をたどると考えられている。生物は、最終的に形成された 2 つの反応産物の量比を検出して磁気情報を獲得していると推定されている。このラジカルペアメカニズムにおいて、磁気受容分子はラジカルペアの形成のために高いエネルギーの光を受容する必要があり、このような光受容特性を有する生体分子として青色光受容体のクリプトクロム (CRY) が挙げられ、磁気受容分子の候補であると推定されている。特に昆虫では 1 つまたは 2 つの *Cry* 遺伝子しか見出されておらず、これらの *Cry* 遺伝子のノックダウンによって磁気応答性が見られなくなることから、昆虫において CRY は磁気センシングや磁気情報伝達など、少なくとも磁気検出経路のいずれかを担っていると考えられている。

一方、鳥類をはじめとした脊椎動物は昆虫と異なり 2~7 と非常に多くの CRY 遺伝子を有し、遺伝子変異による実験も昆虫と比べて困難であることから、どの CRY が磁気受容を担っているかの同定には至っていない。これまでに鳥類では、II 型 CRY と IV 型 CRY が磁気受容分子の候補として挙げられている。いずれの分子も鳥類の光受容器官である網膜に発現しており、光受容分子または光情報伝達分子として機能する可能性が考えられている。II 型 CRY については、*in vitro* において組換えタンパク質を作製した際に発色団の結合が見られないことから、光受容体あるいは光依存的な磁気受容体として機能するかは疑問が残る。そこで本研究では、IV 型 CRY (CRY4) に着目する。

申請者らのグループのこれまでの研究によって、磁気受容能が報告されているニワトリの組換え体 CRY4 (cCRY4) が、(i) 発色団としてフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を有すること、(ii) 青色光への暴露によって立体構造を変化させること、(iii) FAD を介した青色光受容によってフラビン中性ラジカル (FADH<sup>•</sup>) を形成すること、が明らかになった。(i) と (ii) から cCRY4 は光受容能と光情報伝達能を持つ可能性があり、それに加えて (iii) のラジカル形成能を有することから、cCRY4 はラジカルペアメカニズムにおける磁気受容分子の有力候補であると考えられる。さらに、cCRY4 の光励起直後の反応を解析したところ、FADH<sup>•</sup> の前駆体である陰性ラジカル (FAD<sup>•-</sup>) と、FAD<sup>•-</sup> から FADH<sup>•</sup> へのプロトン化、さらに FAD<sup>•-</sup> から基底状態である酸化型 (FAD<sub>ox</sub>) への酸化の様子が観測された。さらに、FAD<sup>•-</sup> の酸化反応と同時期に消失するチロシン中性ラジカル (Tyr-O<sup>•</sup>) の存在も示唆された。興味深いことに、酸化反応の時定数が百ミリ秒以下、プロトン化反応の時定数が数百ミリ秒と、酸化反応の方が高速の反応であったにもかかわらず、それぞれの反応の量比はプロトン化:酸化 = 6:4 と、プロトン化反応される FAD<sup>•-</sup> の量が多かった。このことから、FAD<sup>•-</sup> を形成する cCRY4 の状態は、FAD<sup>•-</sup> が酸化されやすいものとプロトン化されやすいものの 2 つに分岐している可能性があるかと推定された。この反応は、磁気方向によって分岐した反応の産物を検出して磁気情報が得られるというラジカルペアメカニズムによく類似しているため、cCRY4 における酸化反応とプロトン化反応の分岐は磁気受容の実体を担っている可能性が類推される。この cCRY4 の反応過程において、FAD<sup>•-</sup> と同時期に Tyr-O<sup>•</sup> の形成も示唆されたことから、Tyr-O<sup>•</sup> が FAD<sup>•-</sup> とラジカルペアを形成しており、分岐反応を支えているというモデルが考えられた。

## 2. 研究の目的

これまでの研究によって、cCRY4 の光反応における Tyr-O<sup>•</sup> の形成と、反応分岐における Tyr-O<sup>•</sup> 形成の重要性が示唆された。しかしながら、実際に Tyr-O<sup>•</sup> が cCRY4 の光反応においてどのような役割を担っているのかは不明であり、さらに cCRY4 を構成するアミノ酸の中でどのチロ

シン残基がラジカルを形成しているのかもわかっていない。そこで本研究では、Tyr-O•を形成するチロシン残基の同定と、cCRY4の光反応におけるTyr-O•の役割を推定することを目的とする。また、cCRY4の(磁気)情報伝達メカニズムを推定するためには、cCRY4の立体構造変化とFADの酸化還元状態との関連性を調査することが重要であり、特にcCRY4の磁気情報検出を担うと期待されるFAD•が形成されている際のcCRY4の構造変化を調べる必要がある。しかしながら、FAD•の寿命は百ミリ秒以下であるため、FAD•結合状態のcCRY4の生化学的な実験は困難である。そこで申請者らのグループでは、cCRY4の光反応制御を目的とした変異体の作製に着手しており、これまでにcCRY4の391番目のアスパラギンを変異させたcCRY4 N391変異体を作製することによってFAD•を長時間維持することに成功した。しかしながら変異体cCRY4は野生型に比べて不安定であり、組換え体サンプルの収量は野生型に比べて1/100以下であった。そこで本研究では、上述したTyr-O•に関する研究と平行して、cCRY4 N391変異体サンプルの収量増加に向けた組換えタンパク質の発現・精製系の改良を試みる。

### 3. 研究の方法

Tyr-O•の形成位置を特定するためには、Tyr-O•を形成していると目されるチロシン残基を変異させた変異体を作製し、その反応を野生型と比較することが最も直接的であると考えた。CRYファミリー分子では、立体構造においてFADが埋没しているタンパク質コアからタンパク質表面へ向かって並んだ4つのトリプトファン残基(Trp-tetrad)に沿ってFADへ電子が供与されていると考えられており、このトリプトファン残基はcCRY4にも保存されている。さらにcCRY4をはじめとしたCRY4分子に限り、このTrp-tetradのさらに近傍にチロシン残基が保存されている。従って、このチロシン(cCRY4におけるY319)から最終的に電子が放出され、Tyr-O•が形成されていると考えた。そこで、cCRY4 Y319変異体を作製し、その光反応を野生型と比較しようと考えた。変異先のアミノ酸は、チロシンに構造が類似したフェニルアラニン、II型CRYにおいてY319の位置に相当するアスパラギン酸、アミノ酸をほぼ完全に欠損させた場合に近いアラニン、の3つとした。いずれのアミノ酸も整理条件下において電子を放出しづらく、Y319が電子供与体として機能しているのであれば変異によってその機能を欠損させることができると考えた。これらの変異体および野生型のcCRY4にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)タグを付与したタンパク質を出芽酵母に発現させ、培養した出芽酵母の破碎抽出液からグルタチオンとGSTタグとの相互作用を利用したアフィニティー精製によって目的タンパク質を得た。GSTタグは精製の過程で切断した。

cCRY4に結合するFADは、紫外から可視の領域において光吸収を持つため、得られたサンプルの光吸収特性を紫外-可視分測定によって得られたデータから解析し、FADの状態を推定した。また、サンプルに対して種々のエネルギー量の青色光を照射し、青色光照射とFADの状態変化の関連性を調査した。これらの結果から、Y319の変異によるcCRY4の光反応特性の変化を推定した。さらに、cCRY4の光励起直後の反応をミリ秒時間スケールの過渡吸収分光器によって測定し、FAD<sub>ox</sub>の光励起によって形成されたFAD•の反応を測定した。得られたデータを様々な計算手法によって解析し、分岐した酸化・プロトン化反応の量比やそれらの時定数、Tyr-O•形成の有無などを定量的に解析した。

上記のcCRY4 Y319変異体と平行して、cCRY4 N391変異体の収量増加を試みた。出芽酵母による目的タンパク質の発現、酵母の破碎および可溶性成分の抽出、抽出液からの目的タンパク質の精製といった一連のサンプル獲得の手法を見直し、特に破碎と精製の手法を改良することによってサンプルの収量増加を目指した。

### 4. 研究成果

本研究では、まずcCRY4 Y319変異体を作製し、サンプルを大量に獲得できる発現・精製系を確率した。得られた変異体と野生型のサンプルを分光学的に解析し、Y319の変異がcCRY4の光反応に与える影響を推定した。その結果、全ての変異体においてFADの反応における明瞭な量子収率の低下が見られ、Y319がFADへの電子供与源として機能していることが示唆された。続いてミリ秒時間スケールの過渡吸収分光解析によって、FAD•の反応を測定し、野生型と変異体の反応分岐を比較解析した。その結果、野生型において見られていたTyr-O•のシグナルは変異体において見られなくなり、代わりにトリプトファンラジカル(Trp•)に由来すると思われるシグナルが見出された。cCRY4においてFADとY319の間には4つのトリプトファン残基が保存されているため、変異体においてY319からの電子供与がなくなった結果、これらのトリプトファンのいずれかのラジカル状態の寿命が延長したと考えられる。さらに、大量に獲得し

た野生型と変異体のサンプルを用いた測定によって、それぞれのサンプルにおける FAD<sup>•-</sup>の酸化・プロトン化の反応の時定数や量比を定量的に解析することが可能となった。その結果、変異体ではほとんどの FAD<sup>•-</sup>が FAD<sub>ox</sub> へと酸化されており、FAD<sup>•-</sup>の反応分岐が著しく減弱または消失していることが判明した。以上のことから、cCRY4 において観測された Tyr-O<sup>•</sup>は Y319 のラジカル化によって形成されていることが示唆され、さらに Tyr-O<sup>•</sup>の役割は cCRY4 の光反応における FAD<sup>•-</sup>の反応分岐を安定化させることにあるというモデルを推定できた。FAD<sup>•-</sup>の分岐反応は磁気受容の根幹を担っている可能性があるため、Tyr-O<sup>•</sup>は cCRY4 の磁気受容能の獲得または高感度化に寄与していると期待される。現在これらの内容を学術論文として投稿する準備を進めている。

また、cCRY4 N391 変異体の破碎・精製系を改良し、さらに最適な条件を探索した結果、従来に比べて最大約 30 倍程度まで収量を増加させることに成功した。これによって従来は過渡吸収分光解析が不可能だった cCRY4 N391 サンプルの解析に成功しており、同様に構造解析のための生化学的な実験も可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大塚浩晨、三井広大、三浦宏太、岡野恵子、今元泰、岡野俊行
2. 発表標題 ニワトリクリプトクロム4のAsn391点変異を用いた発色団結合部位の解析
3. 学会等名 量子生命科学会 第3回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大塚浩晨、三井広大、三浦宏太、岡野恵子、今元泰、岡野俊行
2. 発表標題 Formation of flavin anion tyrosine radicals in avian Cryptochrome4
3. 学会等名 The 4th International Forum on Quantum Metrology and Sensing (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅諒祐、大塚浩晨、岡野恵子、今元泰、岡野俊行
2. 発表標題 磁気受容体候補分子ニワトリクリプトクロム4における電子伝達の分子メカニズム
3. 学会等名 第11回生物物理学会関東支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大塚浩晨、三宅諒祐、岡野恵子、今元泰、岡野俊行
2. 発表標題 鳥類の磁気受容機構解明に向けたクリプトクロム4チロシン変異体の分光解析
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 大塚浩晨、三宅諒佑、岡野恵子、今元泰、岡野俊行
2. 発表標題 ole of a tyrosine radical in the photoreaction of chicken Cryptochrome 4, a magnetoreceptor candidate molecule
3. 学会等名 The 5th International Forum on Quantum Metrology and Sensing (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大塚 浩晨、岡野恵子、今元泰、岡野俊行
2. 発表標題 ニワトリクリプトクロム4 における光反応の分岐と磁気受容
3. 学会等名 第22回 日本光生物学協会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大塚浩晨、三宅諒佑、金悠旻、岡野恵子、今元泰、岡野俊行
2. 発表標題 鳥類磁気受容候補分子クリプトクロム4の分岐反応におけるチロシンラジカル役割
3. 学会等名 量子生命科学会 第5回大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------