

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570162

研究課題名（和文） 光制御型転写因子オーレオクロームの機能メカニズム

研究課題名（英文） Molecular mechanism of a light-regulated transcription factor, aureochrome.

研究代表者

久富 修 (HISATOMI OSAMU)

大阪大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：60231544

研究成果の概要（和文）：

光制御型転写因子と考えられているオーレオクローム（AUREO）に関して、その機能メカニズムを明らかにするために、長さの異なる6種類の組換えタンパク質を作成した。解析の結果、AUREOのLOVドメインでは、光照射により α ヘリックスが減少し、bZIP-linker部分では増加していることが示唆された。さらに、光照射によりAUREOの流体力学的半径の増大が見られたことから、光照射によりAUREOの構造変化が誘起されることが示された。

研究成果の概要（英文）：

To understand the molecular mechanism of a blue light (BL)-regulated transcription factor, aureochrome (AUREO), we prepared six kinds of recombinant AUREOs. BL appeared to induce a shift of the α -helical structure of the LOV domain to a β -sheet structure, and an approximately 5% increase in the hydrodynamic radius of recombinant AUREOs. Our results support a schema where BL-induced changes in the LOV domain may cause global conformational changes in the bZIP and/or the linker of AUREO.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：光制御転写因子、LOVドメイン、DNA結合

1. 研究開始当初の背景

本申請研究で対象としたオーレオクロ

ム（AUREO）は、LOV (light-oxygen-voltage 感受性) ドメインを持つタンパク質として、

2007年に連携研究者である片岡博尚博士らにより報告された。AUREOには類似体AUREO 1とAUREO 2が存在し、フォトトロピンと同様フラビンモノヌクレオチド(FMN)を結合して、青色光を受容する。RNAiを用いた実験により、AUREOは、フシナシミドロの青色光依存的な分枝反応に関与していることが明らかにされた。興味深いことに、AUREOはbZIP(塩基性ロイシンジッパー)型のDNA結合領域を持ち、AUREO 1はDNAの特異的配列(TGACGT)に結合することが明らかになった。さらに、その結合性は光により変化することから、AUREOは光制御型転写因子であると考えられている。

一般にLOVドメインを持つタンパク質はC末側に効果ドメインを持っており、LOVドメインで受容した情報はその効果ドメインの活性を変調する形で出力される。しかし、AUREOにはC末側にドメイン構造はなく、実際にN末側に情報が伝達されるかどうかは明らかにされていない。

このようにAUREOは大変興味深い性質を持つが、N末側に情報が伝達される機構や、転写調節の制御機構は明らかになっていない。タンパク質の機能メカニズムを解析するためには、組換えタンパク質を用いた解析が有効であるが、AUREOを多量に得ることは困難であった。申請者は、連携研究者である片岡らとの共同研究により、大腸菌中でのAUREO1の発現系を作成した。得られたAUREO 1は光反応性を持ち、DNAに配列特異的に結合することが明らかになった。我々の発現系を用いることで、1Lの培養液あたり1mg程度のAUREO 1が得られると見積られた。

2. 研究の目的

本研究は、この発現系を用いてAUREOの分子メカニズムを明らかにすることを目的として行った。また、その発展として、bZIP型転写因子全体に共通する機能メカニズムの解明や、新しい性質を持つ転写調節因子の作成も試みた。具体的には、すでに発現・精製に成功しているAUREO 1(野生型およびN末の欠失タンパク質)に加え、光反応しない変異体やキメラタンパク質などを作成し、それらを定量的かつ動的に解析して、AUREOの分子メカニズムを解明することを目標とした。また、それらの研究を、bZIP型転写因子全体の理解や、新しい性質を持つ転写因子の開発などにもつなげていくことをめざした。

3. 研究の方法

AUREO1 翻訳領域全長を含む組換えタンパク質(FL)、N末部分を欠失してbZIPドメインとLOVドメインからなる組換えタンパク質(ZL)、およびN末部分とbZIPドメインを欠失しLOVドメインのみからなる組換えタンパク質(LOV)に対し、それぞれのN末あるいは

C末にヒスチジン6量体のタグ(His6:組換えタンパク質名の前後にhをつけて表記する)を有する計6種の組換えタンパク質(FLh, hFL, ZLh, hZL, LOVh, hLOV)を発現させるためのプラスミドベクターを作成した。発現条件を最適化することにより、これらの組換えタンパク質の発現量を増加させることができた(ZLh, hZL, LOVh, hLOVでは培養液1ℓあたり数mgの精製したタンパク質が得られる)。さらに、精製の手法に改良を加えることにより、組換えタンパク質の純度を上げることが可能となった(Toyooka *et al.*, 2011; Hisatomi *et al.*, 2013)。これらの組換えタンパク質を用いて、いかに述べるような、生物物理学的、あるいは分子生物学的な手法を用いてオーレオクロームの分子メカニズムを解析した。

4. 研究成果

(1) DNAへの結合性

作成した6種の組換えタンパク質について、DNAとの結合性をゲルシフトアッセイにより調べたところ、basic領域を持つFLh, hFL, ZLh, hZLは配列(TGACGT)特異的にDNAに結合することが明らかになった。このことから、組換えタンパク質のbZIP領域がDNA結合能を持つ(functionalである)ことが示唆された(Hisatomi *et al.*, 2013)。

(2) 吸収・蛍光スペクトル測定

組換えタンパク質の物理化学的性質を把握するために、分光学的測定を行った。吸収・蛍光スペクトルに関しては、6種類の組換えタンパク質にほとんど差異が認められないことから、N末領域-bZIP領域およびHis6は、いずれもLOVドメインに存在するフラビンモノヌクレオチド(FMN)の π 電子系にほとんど影響を及ぼしていないことが示された。また、組換えタンパク質の暗順応に伴うスペクトル変化にも大きな差異は認められなかったが、N末側を削除するにつれ活性化エネルギーが上昇する傾向にあった(Hisatomi *et al.*, 2013)。この結果から、N末側の領域がLOVドメインと何らかの相互作用をしていることが示唆された。

(3) 二次構造の変化

円偏光二色性(CD)スペクトルを比較したところ、ZLhでは光照射前後の変化がごくわずかであったのに対し(Toyooka *et al.*, 2011)、LOVhでは光照射による有意な α ヘリックス含量の減少が認められた(Hisatomi *et al.*, 2013)。この結果から、 α ヘリックス含量は、光照射によりLOVドメインでは減少し、bZIP領域では増加することが示唆された。

(4) 分子サイズの測定

分子の形状と会合状態を明らかにするために、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を行った。その結果、光照射に伴いZLhとLOVh

の両者で、わずかな換算分子量の変化が認められた。このことから、光照射により ZLh と LOVh の構造が変化することが示唆されたが、100 μ M 以下の低濃度では、会合状態の変化は観測されなかった (Toyooka *et al.*, 2011; Hisatomi *et al.*, 2013)。

(5) 光散乱による測定

過渡回折格子法 (TG 法) によって、ZLh と LOVh の拡散定数を時分割測定した結果、光照射後 2.8 μ sec で FMN のシステイン付加物が形成されること、ZLh ではその後 160msec で拡散係数が変化することが示された。このことは、光照射により ZLh に何らかの構造変化が生じていることを示唆している (Toyooka *et al.*, 2011)。また、動的光散乱法 (DLS) による流体力学的半径 (RH) の解析において、LOVh では光による RH の変化がほとんど認められないのに対し、FLh および ZLh では約 5% の RH の増加が認められた。このことは、光による LOV 領域の変化が N 末側の bZIP 領域に伝搬することを示唆している。DLS によりタンパク質の構造変化が観測されたことは非常に興味深く、光散乱測定の有用性を示すものであると考えている。

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 4 件)

① Hisatomi, O., Takeuchi, K., Zikihara, K., Ookubo, Y., Nakatani, Y., Takahashi, F., Tokutomi, S., Kataoka, H. (2013)

Blue light-induced conformational changes in a light-regulated transcription factor, aureochrome-1.

Plant Cell Physiol., 54(1), 93-106.

② Goto, Y., Tokunaga, F., Hisatomi, O. (2012)
Hematological- and neurological-expressed sequence 1 gene products in progenitor cells during newt retinal development.

Stem Cells International, vol. 2012, Article ID 436042, 6 pages.

③ Toyooka, T., Hisatomi, O., Takahashi, F., Kataoka, H., Terazima, M. (2011)

Photoreactions of aureochrome-1.

Biophys J., 100(11), 2801-2809.

④ Kataoka, Y., Kitadai, N., Hisatomi, O., Nakashima, S. (2011)

Hydrogen bonding natures of water molecules in aqueous solutions of glycerol by Attenuated Total Reflection Infrared spectroscopy.

Applied spectroscopy, 65(4), 436-441.

[学会発表] (計 14 件)

国際会議

① Hisatomi, O., Takeuchi, K., Takahashi, F. and Kataoka, H. (2012)

Blue-light induced conformational change of recombinant AUREO1.

15th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas. Potsdam, Germany. 2012.6.5-10.

② Hisatomi, O., Takeuchi, K., F. Takahashi, and Kataoka, H. (2012)

Expression and characterization of recombinant aureochrome-1

The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing. Todaiji Temple Cultural Center, Nara, Japan. 2012.3.19-21.

③ Hisatomi, O., Murakami, T., Furuya, K., Takahashi, F. and Kataoka, H. (2011)

Characterization of a light-regulated transcription factor, AUREO1, expressed in *E. coli*.

5th Asia and Oceania Conference on Photobiology (AOCP2011), Nara Prefectural New Public Hall, Nara, Japan. 2011.7.31.

④ Hisatomi, O. and Furuya, K. (2011)

DNA binding properties of a bHLH transcription factor fused with green fluorescent protein

8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (ICCPB2011), Nagoya Congress Center, Aichi, Japan. 2011.5.31-6.5.

国内学会

⑤ Hisatomi, O., Takeuchi, K., Nakatani, Y., Takahashi, F., Kataoka, H.

Blue-light induced conformational change of a transcription factor, AUREO1.

日本生物物理学会第 50 回年会、名古屋大学 (東山キャンパス)、2011 年 9 月 22-24 日

⑥ Ito, S., Zhang, Yu., Iwata, T., Hisatomi, O., Takahashi, F., Kataoka, H., Kandori, H.

FTIR study of Aureochrome that possesses LOV domain at the C-terminus.

日本生物物理学会第 50 回年会、名古屋大学 (東山キャンパス)、2011 年 9 月 22-24 日

⑦ 古家景悟、久富修

イモリの網膜再生に参与する bHLH 型転写因子の解析

日本動物学会第 82 回大会、旭川大雪クリスタルホール (北海道)、2011 年 9 月 21 日

⑧ Hisatomi, O., Takeuchi, K., Murakami, T.,

Takahashi, F., Kataoka, H.
Photoreaction of a light-regulated transcription factor, AUREO1.
日本生物物理学会第 49 回年会、兵庫県立大学 (兵庫県)、2011 年 9 月 18 日

⑨ Kataoka, Y., Kitadai, N., Hisatomi, O., Nakashima, S.
Hydration behavior of biomolecules as studied by attenuated total reflection infrared spectroscopy.
平成 22 年度 日本分光学会年次講演会、京大 (吉田キャンパス)、2010 年 11 月 18-20 日

⑩ 久富修、古家景悟、榎村直義
網膜形成に関与する bHLH 型転写因子の解析
日本動物学会第 81 回大会、東大 (駒場キャンパス)、2010 年 9 月 23-25 日

⑪ Hisatomi, O., Ohata, R., Furuya, K., Takahashi, F., Kataoka, H.
Analyses of a light-regulated transcription factor, AUREO1, expressed in *E.coli*.
日本生物物理学会第 48 回年会、東北大 (川内キャンパス)、2010 年 9 月 20-22 日

⑫ Furuya, K., Hasegawa, K., Hisatomi, O.
Analyses of DNA binding properties of a bHLH transcription factor using site-directed mutants.
日本生物物理学会第 48 回年会、東北大 (川内キャンパス)、2010 年 9 月 20-22 日

⑬ Kataoka, Y., Kitadai, N., Nakashima, S., Hisatomi, O.
Attenuated Total Reflection Infrared spectroscopy of water molecules in the presence of biomolecules.
日本生物物理学会第 48 回年会、東北大 (川内キャンパス)、2010 年 9 月 20-22 日

⑭ 久富修、古家景悟、高橋文雄、片岡博尚
大量発現系を用いた光制御転写因子オーレオクロームの解析
光生物学協会講演会、阪大 (吹田キャンパス)、2010 年 8 月 10-11 日

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://gabriel.ess.sci.osaka-u.ac.jp/html/hisatomi/hisatomi-jp.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久富 修 (HISATOMI OSAMU)
大阪大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：60231544

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

片岡 博尚 (KATAOKA HIRONAO)
東北大学・情報公開センター・研究員
研究者番号：30108568