

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657105

研究課題名（和文）LOV 光モジュールによる細胞機能光制御

研究課題名（英文）Regulation cell function by light using LOV photoreceptive module

研究代表者

徳富 哲 (TOKUTOMI SATORU)

大阪府立大学・理学系研究科・教授

研究者番号：90142009

研究成果の概要（和文）：植物の光屈性などの光受容を行う青色光センサータンパク質であるフォトトロピンは光によって活性制御されるタンパク質リン酸化酵素として機能する。この光スイッチ機構を応用して、動物培養細胞が分裂増殖するか分化して神経細胞になるという異なる二つの生理応答反応の切り換えを担う鍵となる酵素の活性を光制御して、細胞の分裂と増殖を光でスイッチして切り替えることが可能な細胞培養系を作り出すことを目的として研究を行い、鍵酵素の活性制御系の部分的な構築を行った。

研究成果の概要（英文）：Phototropin is a blue light sensor in plant which mediates phototropic response et al., and act as a blue light regulated protein kinase. Using the photoactivation mechanism of kinase in the phototropin, we aim to produce a new animal cell of which physiological responses, cell division and cell differentiation, can be switchable by light illumination through controlling the kinase activity of the key protein kinase involved. We introduced the *in vitro* analysis system in which the regulation of the key enzyme activity can be studied.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：フォトトロピン、LOV ドメイン、MAP キナーゼ、キナーゼ活性光制御、

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで、主要な植物青色光受容体であるフォトトロピン (phot) の光受容・シグナル伝達機構の研究を行ってきた。フォトトロピンは植物の光屈性（フォトトロピズム）の光受容体として 1998 年に見つけられその後、葉緑体光定位運動や、気孔の開閉、葉の伸展や形態形成などの光受容体としても機能することが見つけられ、光合成活性の最適化に重要な役割を果たしていることが明らかになった。代表者は本研究申請時に phot およびその類似光受容体が、どのような分子構造をもち、光シグナルをどのようにして下

流に伝えるかその分子機構を研究し多くの研究成果をあげていた。

phot は N-末端側に LOV とよばれる光受容ドメインを二つ (LOV1 と LOV2) もち、C-末端側は Ser/Thr・キナーゼとなっている (図



1)。phot は青色光により活性制御される Ser/Thr・キナーゼであるといえる。代表者

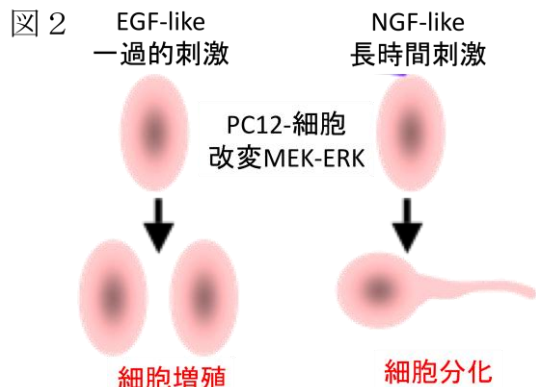
らは遺伝子発現系を用いて調製した様々なコンストラクトをもつ phot 試料を用いて *in vitro* の キナーゼ・アッセイ系を開発し、1) constitutive に活性をもつ phot キナーゼの光による活性調節機能を LOV2 がもつこと、LOV1 はその際の光感度調節に効くことを見つけていた (Matsuoka & Tokutomi, PNAS 2005 他) (図 1)。

これ以外にも、LOV ドメインの光反応、分子構造、光反応にともなう構造変化を、様々な生物物理学的な手法により明らかし、キナーゼ活性制御に関わる分子構造変化が LOV2 ドメインとキナーゼドメインの間のヒンジ領域に起こること (図 1) も報告した。

図 1 で示す研究結果を基に、LOV2+ヒンジ-モジュール (図 1 下線部分) を用いて phot 以外の Ser/Thr・キナーゼの活性制御を行えないかと考え研究計画を暖めていた。もしこれができるれば、様々な細胞内シグナル伝達系の光制御が可能となり、そのメカニズム研究に貢献することが出来る

2. 研究の目的

1) このフォトトロピン・キナーゼの光によるスイッチ活性をもつ最小のモジュールである LOV2-キナーゼのキナーゼ光活性化機構を応用して、神経系株化培養細胞 PC12 の EGF (上皮成長因子) および NGF (神経成長因子) 刺激応答のスイッチングに関わる MAP キナーゼ・カスケード中の鍵キナーゼである ERK およびその上流のキナーゼである MEK を改変して、光により活性制御される MAP キナーゼ系を作製し、2) これにより PC12 培養細胞の、EGF(上皮細胞増殖因子) 応答反応である細胞増殖および NGF (神経細胞成長因子) 応答反応である細胞分化の、二つの異なる細胞機能を光によりスイッチングできる系 (図 2) の確立を目的とした。

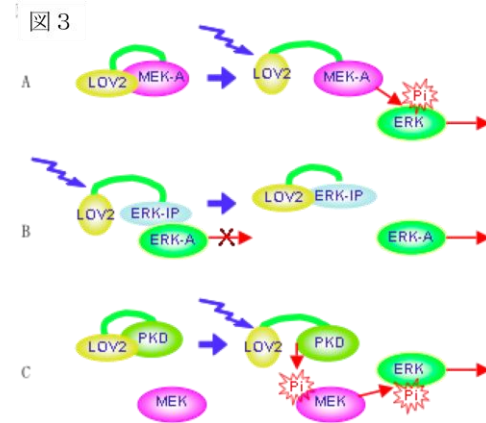


鍵キナーゼである ERK が MEK によりリン酸化された活性状態が長時間持続する (NGF による刺激) と PC12 細胞の分化が、一過的

な活性化 (EGF による刺激) では細胞増殖がひき起こされることが知られている。

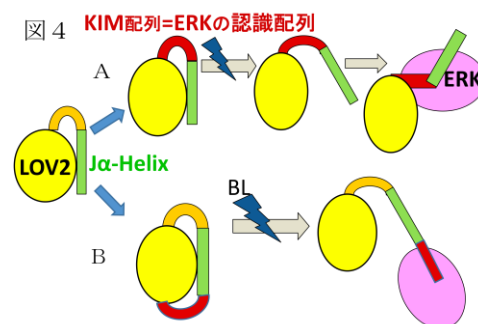
3. 研究の方法

申請時、図 3 に示す 3 つの MEK-ERK 系の改変法を提案していた。



これまでの研究結果などからヒンジ中の LOV2 の C 末端に存在する J α ヘリックスとよばれるヘリックスがキナーゼ活性の光制御に重要な役割を示すことがわかってきた。そこで目的 1) に関して、まずシロイヌナズナの phot のアイソフォームの一つである phot2 の LOV2+J α ヘリックスを用いたコンストラクト用いて、*in vitro* で MEK-ERK 系の光制御ができる初歩的な系の構築を目指した。

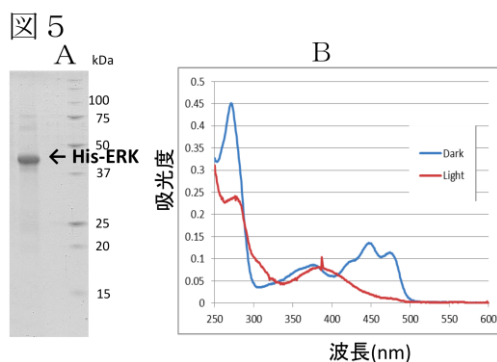
具体的には、図 4 で示すように、MEK の ERK 認識配列である KIM 配列を LOV2-J α ヘリックスモジュールに組み込み、LOV2 の光反応による J α ヘリックスの構造変化 (unfolding と LOV2 コアからの解離) を利用して、LOV2 の光反応により KIM フラグメントが露出し、ERK と相互作用することにより MEK による ERK のリン酸化を押さえて、シグナル伝達を阻害するという光スイッチの作成を目指した。



4. 研究成果

1) シロイヌナズナ phot2 の LOV2-ヒンジキナーゼの分子構造および光反応にともなう構造変化に関する研究を行うとともに、phot1 および phot2 の LOV2-ヒンジキナーゼと人工器質によるキナーゼ解析系を確立して、本研究遂行にとり有用な知見を数多く得た。

2) 鍵キナーゼである ERK を大腸菌遺伝子発現系により作成した。その際に His145 が大腸菌内でリン酸化を受けキナーゼ活性制御に悪影響を与えることが分かったので、これのAla置換体を使用することとし純度95%以上の標品を得た (図5 A)。



3) 光スイッチとして働く KIM フラグメントをもつ LOV2-J α ヘリックスとしては LOV2 と J α ヘリックスの間にサンドイッチしたコンストラクト (図4 A) およびC末端に付加したコンストラクト (図4 B) を作成し、いずれも純度95%以上でLOV特有の光反応 (図5 B) を示す標品を得た。

4) ERK と KIM フラグメントをもつ LOV2-J α ヘリックスとの相互作用をプルダウン解析により調べた (表1)。+および-は相互作用有り無しを表す。その結果KIMフラグメントをC末端にもつコンストラクトの方がERKとの相互作用が強いことがわかったが、残念ながら光照射による相互作用に変化が見られなかった。現在コンストラクトを変えて、この点の改良を図っている。

表1

pull down assay	H-ERK		H-ERK(H145A)	
	Dark	Light	Dark	Light
LOV-J α	-	-	no data	no data
LOV-KIM-J α	+	+	-	-
LOV-J α -KIM	+	+	+	+

5) 目的の1)の項のin vitroの系に関してはかなり有望な結果が得られたが、系の確率まで至らず、結果として目的に2)には進めなかった。

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5件)

① Okajima, K., Kashojiya S, and Tokutomi S. Photosensitivity of kinase activation by blue light involves the lifetime of a cysteinyl-flavin adduct intermediate, S390, in the photoreaction cycle of the LOV2 domain in phototropin, a plant blue light receptor. J. Biol. Chem. 査読有、Vol.287、2012、40972-40981.

② Aihara, Y., Yamamoto, T., Okajima, K., Yamamoto, K., Suzuki, T., Tokutomi, S., Tanaka, K. and Nagatani, A. Mutations in the N-terminal flanking region of the blue-light sensing domain LOV2 disrupt its repressive activity on the kinase domain in the *Chlamydomonas* phototropin. J. Biol. Chem. 査読有、Vol.287、2012、9901-9909.

③ Okajima, K., Matsuoka, D. and Tokutomi, S. LOV2-linker-kinase phosphorylate s LOV1-containing N-terminal polypeptide substrate via photoreaction of LOV2 in Arabidopsis phototropin1. FEBS Lett. 査読有、Vol.585、2011、3391-3395.

④ Takayama, Y., Nakasako, M., Okajima, K., Iwata, A., Kashojiya, S., Matsui, Y. and Tokutomi, S. Light-Induced movement of the LOV2 domain in an Asp720Asn mutant LOV2-Kinase fragment of Arabidopsis phototropin 2. Biochemistry. 査読有、Vol. 50, 1174-1183 (2011).

⑤ Iwata, T., Tokutomi, S. and Kandori, H. Light-induced structural changes of the LOV2 domains in various phototropins revealed by FTIR spectroscopy. BIOPHYSICS. 査読有、Vol. 7、2011、89-98.

[学会発表] (計15件)

① 嘉祥寺谷 幸子「シロイヌナズナ phototropin1 と RPT2 の in vitro での相互作用解析」第54回日本植物生理学会 2013年3月21日~23日 岡山

② 岡島 公司「クラミドモナスの全長 phototropin における光受容機構の分子基盤」第54回日本植物生理学会 2013年3月21日~23日 岡山

③ 徳富 哲「植物の環境感覚をささえる多様な蛋白質機能」第12回日本蛋白質科学会年会 2012年6月20日~22日 名古屋

④ 岡島 公司「植物の青色光受容体キナーゼ (フォトトロピン) のシグナリング機構」第12回日本蛋白質科学会年会 2012年6月20日~22日 名古屋

⑤ Okajima, K. 「Photocycle in LOV2 is involved in the light sensitivity of kinase activity in phototropin」The 1st Inte

International Symposium on Plant Environmental Sensing 2012年3月19日～21日 奈良

⑥ Kashojiya, S. 「Lys475 is critical for light-activation of kinase in Arabidopsis is phototropin1.」 The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing 2012年3月19日～21日 奈良

⑦ 相原 悠介「フォトリポピンの LOV2 領域・N 末端側近傍の変異によりキナーゼ活性の抑制機能が失われる」第 53 回日本植物生理学会 2012年3月16日～18日 京都

⑧ 嘉祥寺谷 幸子「シロイヌナズナ phot1 LOV2-キナーゼペプチドを用いた LOV2 の N 末端側領域へのアミノ酸変異導入解析」第 53 回日本植物生理学会 2012年3月16日～18日 京都

⑨ Okajima, K. 「Life time of a signaling state in the LOV2 is involved in light sensitivity of kinase activation in Arabidopsis phototropin」 Gordon Research Conference on Photosensory Receptors & Signal Transduction 2012年1月22日～27日 USA, Galveston TX

⑩ 岡島 公司「植物の青色光受容体（フォトリポピン）における分子内シグナル伝達機構」第 84 回日本生化学会大会 2011年9月21日～24日 京都

⑪ 徳富 哲「植物青色光受容体フォトリポピンのキナーゼ活性光制御機構」第 84 回日本生化学会大会 2011年9月21日～24日 京都

⑫ 岡島 公司「Signaling mechanisms of phototropin, plant blue light receptor」日本生物物理学会第 49 回年会 2011年9月16日～18日 姫路

⑬ Kashojiya, S. 「The lifetime of S390 in LOV2 domain regulates light sensitivity of kinase activation in Arabidopsis phototropin.」第 5 回アジア・オセアニア光生物学会議 2011年7月30日～8月1日 奈良

⑭ Okajima, k. 「Light regulation of phototropin kinase.」第 5 回アジア・オセアニア光生物学会議 2011年7月30日～8月1日 奈良

⑮ 武田 英之「分子動力学シミュレーションによるフォトリポピンの光活性化機構の研究」第 11 回日本蛋白質科学会年会 2011年6月7日～9日 大阪

[その他]

ホームページ等

[http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~toxa/](http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~toxa/home.html)
[home.html](http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~toxa/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) 連携研究者

居原 秀 (IHARA HIDESHI)

大阪府立大学大学院・理学系研究科・准教授

研究者番号：60254447

岡島 公司 (OKAJIMA KOJI)

大阪府立大学大学院・理学系研究科・特認助教

研究者番号：20438245