

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23870015
 研究課題名（和文） 枯草菌の光ストレス応答に迫る～光センサー蛋白質 YtvA の反応分子機構の解明
 研究課題名（英文） Study on the photoreaction dynamics of blue light sensor protein YtvA from *Bacillus subtilis*
 研究代表者
 中曽根 祐介（NAKASONE YUSUKE）
 京都大学・大学院理学研究科・助教
 研究者番号：00613019

研究成果の概要（和文）：枯草菌由来の青色光センサー蛋白質 YtvA が機能するメカニズムを分子論的に解明することを目的に、その光反応を調べた。その結果、全長 YtvA は溶液中で 6 量体と 2 量体間の平衡状態にあり、蛋白質間相互作用が光励起によって変化する様子を時間分解検出した。さらに高塩濃度環境下では平衡が 2 量体に大きく偏ることも見出し、信号伝達過程に塩濃度の影響があることがわかった（塩ストレス効果）。以上観測された光反応を基に実際の生理活性を評価することも行い、暗回復の速度が生理活性と密接な関係を持つことも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We investigated the photoreaction dynamics of the blue light sensor protein YtvA to elucidate how the light signal is transferred from the LOV domain to the STAS domain using time-resolved transient grating (TG) method. The concentration dependence of the TG signals and cross-linking measurement showed that YtvA is in equilibrium between the hexamer and the dimer in the ground state. The hexamer underwent the global reaction which was manifested as a decrease in D. The D change of the hexamer might be caused by the change in inter-protein interaction between the dimers. Additionally, we have found significant effect of the salt concentration on the equilibrium in the ground state, which might be relevant for its salt stress response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：YtvA、LOV、光ストレス応答、枯草菌、光反応、過渡回折格子法

1. 研究開始当初の背景

生命活動の維持において環境ストレスに対する応答は重要であり、遺伝子発現のオンオフ調節がその基本的なメカニズムになっている。土壌細菌である枯草菌は、すでに全ゲノム解析がなされており、シグマ因子と呼ばれる転写因子群が環境応答に重要であることがわかっていたが、その制御機構は謎に包まれていた。そこで我々は、光ストレス応答を制御する青色光センサータンパク質 YtvA を取り上げ、光情報をどのように認識し下流へ伝達するのかを分子レベルで解明することを目指した。

YtvA は光受容を担う LOV ドメイン、活性部位である STAS ドメイン、そしてこれらをつなぐ linker ドメイン（ヘリックス構造を持つ）から構成される（図 1）。LOV ドメインは多くの青色光センサータンパク質に共通して存在する光受容ドメインであり、発色団としてフラビン（FMN）をドメイン内部に非共有結合的に含んでいる。この

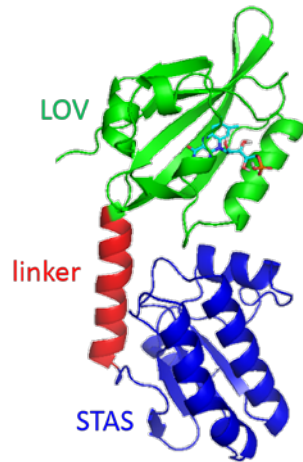


図1 YtvAの三次構造

LOV ドメインの光反応は主に吸収変化測定により研究され、発色団 FMN の光励起により LOV ドメイン内部のシステイン残基と FMN が共有結合を結ぶことが明らかにされている。この反応がさらなるタンパク質の構造変化を引き起こし、シグナル伝達を達成すると考えられるが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。これは吸収変化をモニターする限り、機能発現に重要な STAS ドメインや linker ドメインの構造変化、さらには信号伝達分子との相互作用を捉えきれないためである。

2. 研究の目的

YtvA の光応答によるシグナル伝達過程を分子論的に明らかにすることを目標とし、過渡回折格子 (TG) 法を用いてタンパク質全体の構造変化や分子間相互作用の変化を実時間で捉えることを試みた。この手法は吸収変化の他に、反応に伴う体積変化・拡散係数変化を高い時間分解能で検出可能にしている。特に拡散係数は拡散する分子と溶媒との相互作用を敏感に反映するため、その時間変化から 2 次構造や表面構造の変化、分子間の会合・解離過程を評価することができる。この

手法を用いることで、YtvA の光情報伝達に必要な構造変化の検出、さらには光情報伝達先分子の特定を目指した。

3. 研究の方法

機能発現において重要と考えられるドメインそれぞれの働きを明確にするため、LOV 試料(YLOV)、LOV-linker 試料(YLOV-linker)、全長 YtvA 試料(YtvA)を調整し、それぞれの光反応ダイナミクスを TG 法を用いて調べた。また二次構造変化の測定には CD 法を用い、会合状態の検出には静的光散乱や X 線小角散乱、cross-linking 法などを併用した。

4. 研究成果

TG 測定した結果、全ての試料で発色団とシステイン残基の共有結合形成が観測され、発色団周りの反応には外部ドメインの影響は見受けられなかった。しかし、分子拡散信号は試料によって大きく異なる挙動を示し、それぞれのドメインが異なる光反応を示すことが示唆された。また分子拡散信号に顕著な濃度依存性が見られたことから、多量体間での平衡が存在することがわかった。以下、各試料に関して得られた結果を報告する。

(1) YLOV

図 2 に YLOV 試料で得られた TG 信号を示す。共有結合形成や熱拡散信号が観測された後、立ち上がり減衰からなる分子拡散信号が観測された。これは拡散係数が光反応において大きく変化することを意味している。さらに、この分子拡散信号の形や強度が濃度に大きく依存する様子が観測された（図 3）。

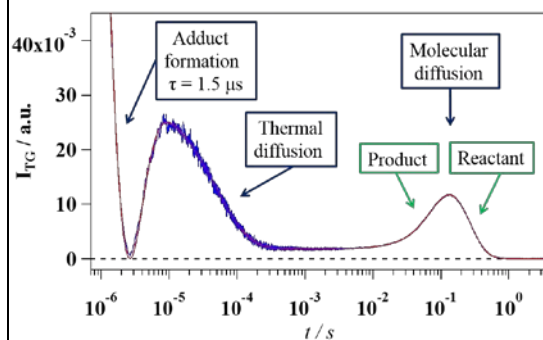


図2 YLOVのTG信号

詳しい解析の結果、基底状態にテトラマーとダイマーの平衡が存在することが分かり、光励起によってテトラマーはダイマーへの解離反応を、ダイマーはテトラマーへの会合反応を起こすことが分かった。YLOV の基底状態の平衡に関しては、cross-linking や X 線小角散乱の実験からも確認することができた。2 つの反応物、テトラマーとダイマーの光反応の詳細を調べるために、分子拡散信号

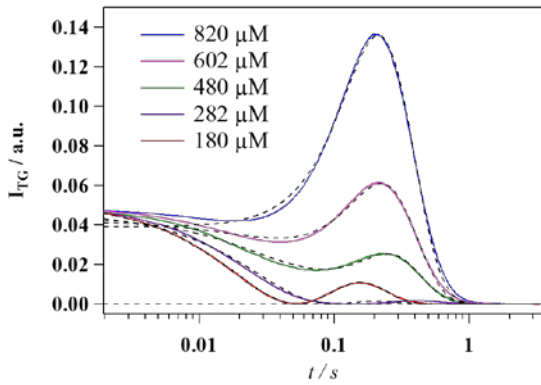


図3 YLOVの濃度依存性

の時間発展を解析したところ、テトラマーの解離反応は 20 μ s より早い時間に起こることが分かった。一方、ダイマーの会合反応速度は蛋白質濃度に依存するとともに、励起光強度にも依存することがわかった。この結果は励起分子同士が会合反応を起こすことを示唆している。以上のように、TG 法を用いることで、光励起による YLOV の分子間相互作用の変化を時間分解で捉えることに成功した (図 4)。

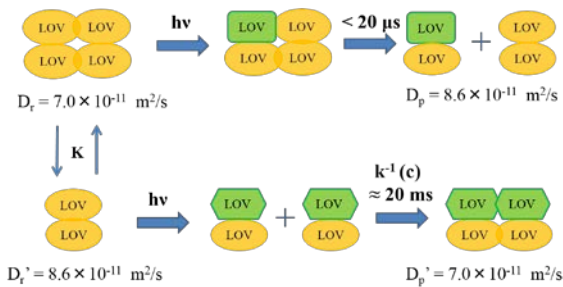


図4 YLOVの反応スキーム

(2) YLOV-linker

YLOV-linker 試料も YLOV 同様に基底状態に多量体間の平衡があることがわかった。ゲル濾過や静的光散乱測定により、この平衡はダイマーと多量体 (10 量体以上) の可逆的な平衡であることがわかった。X 線結晶構造解析を用いた先行研究によると、YLOV-linker はダイマーとして安定に存在し、そのダイマー同士が linker を介して相互作用している様子が観測されている。溶液中ではこの linker ドメイン間の相互作用が過剰に働き、多量体形成に至ったと考えられる。これらの光反応を TG 測定により調べたところ、ダイマーのみが拡散係数変化を示した。また光依存的な会合・解離反応は観測されなかったため、この拡散係数変化は蛋白質部分の構造変化に起因することがわかった。その反応は 30 μ s 以内で起こることがわかり、さらに 370 μ s の時定数を持つ体積膨張成分が観測された。ドメイン間の相互作用変化が顕著に検出さ

れた YLOV とは大きく異なり、YLOV-linker では蛋白質部分の構造変化が観測されたが、これらの反応は linker 領域で起こっていると考えられる。明条件・暗条件における YLOV-linker の結晶構造の比較や溶液中での全長 YtvA の X 線小角散乱パターンの比較から、linker ドメインが光照射により回転することが提唱されている。したがって本研究で観測された拡散係数変化はこの回転運動を時間分解で捉えたものと解釈している。つまり linker 部分の回転により表面構造が変わり、溶媒との相互作用が変化したことで拡散係数変化がもたらされたという解釈である。こうしたドメイン間の相対的な回転運動は光情報伝達において重要な役割を果たしているのかもしれない。我々は YtvA の光シグナル伝達過程に重要であると考えられる linker ドメインの回転を拡散係数の変化として捉え、更にその反応は光励起後 30 μ s 以内で起こる早い反応であることを実測した (図 5)。

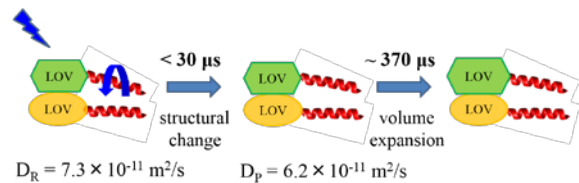


図5 YLOV-linkerの反応スキーム

(3) YtvA

全長 YtvA 試料は、濃度変化測定や cross-linking 測定から基底状態でダイマーとヘキサマーの平衡にあることがわかった。それぞれの光反応を測定したところ、ヘキサマーは拡散係数の変化を伴うグローバルな反応を示したが、ダイマーは拡散係数変化を示さなかった。YLOV-linker のダイマーの光反応との比較により、全長 YtvA のダイマーでは C 末端側に STAS ドメインが存在することで、linker ドメインの回転による構造変化が拡散係数の変化として観測されにくくなったと考えられる。一方、反応物がヘキサマーの場合は、光励起により 3 つのダイマー間の相互作用が変化したために拡散係数の変化が引き起こされたと考えている (図 6)。生体内での YtvA は、同じ STAS ドメインを持つ類似のタンパク質と複合体を形成しており、これら STAS ドメイン間の相互作用変化が転写因子の活性化に重要であると言われている。したがって本研究で捉えた蛋白質間相互作用の変化も STAS ドメイン間で主に起こっていると考えられる。つまり YtvA 間の相互作用変化は、生体内においては複合体中で YtvA が類似のタンパク質と光依存的に相互作用することに対応していると考えている。

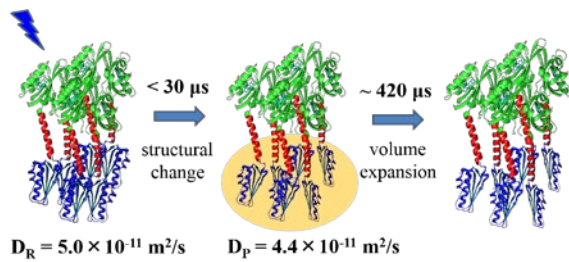


図6 YtvAの反応スキーム(ヘキサマー)

(4) 塩ストレス効果

枯草菌の光ストレス応答は高塩濃度下で増幅されるという報告がある。これは塩ストレスと呼ばれ、環境ストレスの一種であるが、そのメカニズムに関しては不明な点が多い。そこで我々は用意した3種類の試料に対してその会合状態や光反応に対する塩効果を調べた。低塩濃度(NaCl 10 mM)と高塩濃度(NaCl 150 mM以上)条件下でのTG測定の結果、全ての試料で高塩濃度条件下では基底状態の平衡がダイマーに偏ることが確認された。つまり、高塩濃度下でダイマーの光反応が選択的に起こることを意味している。この結果と塩ストレスが正の調節因子であることを考慮すると、YtvAの光ストレス応答にはダイマーの反応が重要であると考えられる。

(5) GTP結合能力

研究開始時点ではYtvAはその光反応だけでなく、シグナル伝達先に関しても未知な部分が多かった。蛍光標識したGTP(BODIPY-GTP)を用いた研究により、YtvAがGTP結合機能を有すると報告されていたが、この報告はBODIPY領域の高い疎水性による非特異的な結合であるという可能性を含んでいた。従ってYtvAのGTP結合機能を検証するには蛍光標識されていないGTPとの相互作用を検出する必要がある。そこで我々は全長YtvAとGTP分子を混合した系でのTG測定を行った。その結果、GTPを加えた効果はTG信号には観測されなかった。つまり蛋白質構造や会合状態がGTPによって変化しないことがわかった。一方、BODIPY-GTPを加えた系では、拡散信号が大きく変化することが観測され、光依存的にYtvAがBODIPY-GTPと結合・解離する様子が観測された。これらの結果は、先行研究で報告されたBODIPY-GTPとの結合がBODIPY領域との疎水性相互作用によるものであることを示している。したがってYtvAがGTP結合蛋白質では無いことを証明する結果となり、光依存的にBODIPY-GTPの結合・解離が観測されたことは、蛋白質の露出表面における疎水基の割合が光反応において変化した様子を表しているのだろう。この変化はlinker領域の回転運動によるものではないかと現在推察している。

(6) YtvAの光反応と生理活性の関係

YtvAの分子レベルでの光反応が生理的どのような意味を持つのかを検証するために、枯草菌内部でのストレス応答検出をアムステルダム大学との共同研究で行った。具体的には枯草菌の光ストレス応答をレポーター遺伝子(*lacZ*)の転写量で定量的に測定し、我々の研究により得られた反応機構(反応速度や量子収率)を基にした数学的モデルにより活性度合いを評価した。これにより生理機能と分子レベルでの反応との関係性を明らかにできる。その結果、明状態から基底状態に戻る速度が生理活性度合いと高い相関を持つことを明らかにした。実際の生体内での戻り速度は*in vitro*での値より大きい値であったが、これは生体内では下流分子と相互作用するために、YtvAの光反応速度が影響を受けているのだと考えている。

以上のように、我々はTG法を初めとする様々な手法を用いた実験により、YtvAのシグナル伝達に重要であると考えられるドメイン間の相互作用変化やlinkerドメインの回転運動を高い時間分解能で捉えることに成功した。更に、全ての試料が基底状態においてダイマーと多量体(YLOVの場合はテトラマー、全長のYtvAの場合はヘキサマー)の平衡が存在することを発見し、これらの存在比率が塩濃度に大きく依存することも見出した。下流分子の特定はまだ進行中であるが、GTP結合蛋白質では無いことを明確にし、さらに分子レベルでの反応が生理活性と密接な関係を持つことを示した。以上の結果は本研究独自の成果であり、今後のストレス応答機構解明に有用な知見である。以上の結果は数本の論文として科学雑誌に投稿する予定である。

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1件)

- ① 田中啓介、中曾根祐介、岡島公司、池内昌彦、徳富哲、寺嶋正秀、Time-Resolved Tracking of Interprotein Signal Transduction : Synechocystis PixD-PixE Complex as a Sensor of Light Intensity, J Am Chem Soc、査読有、Vol 134、2012、8336-8339
DOI 10.1021/ja301540r.

[学会発表] (計8件)

- ① 中曾根祐介、光センサー蛋白質フォトト

ロピンの反応中間体が持つ構造揺らぎの熱力学的評価、第93回日本化学会春季年会、2013年03月22日～2013年03月25日、立命館大学

- ② Seokwoo Choi、LOV タンパク質 YtvA の機能に重要な光化学反応の時間分解検出、第93回日本化学会春季年会、2013年03月22日～2013年03月25日、立命館大学
- ③ 中曽根祐介、過渡回折格子法による蛋白質反応の時間分解検出、先端的レーザー分光技術による分子科学の新展開（招待講演）、2013年02月12日～2013年02月13日、分子科学研究所
- ④ 中曽根祐介、Time-resolved study on photoreaction dynamics of full-length phototropin from *Chlamydomonas reinhardtii*、第50回生物物理学会年会、2012年09月22日～2012年09月24日、名古屋大学
- ⑤ Seokwoo Choi、Comparison of the photochemical reaction between the LOV domain and the LOV-linker domain of a blue light sensor protein YtvA、第50回日本生物物理学会年会、2012年09月22日～2012年09月24日、名古屋大学
- ⑥ 中曽根祐介、光センサー蛋白質フォトトロピンの活性状態における構造揺らぎの評価、第6回分子科学討論会、2012年09月18日～2012年09月21日、東京大学
- ⑦ Seokwoo Choi、全長の青色光センサータンパク質 YtvA の光化学反応ダイナミクス、第6回分子科学討論会、2012年09月18日～2012年09月21日、東京大学
- ⑧ 中曽根祐介、過渡回折格子法による蛋白質反応の時間分解検出、第2回光科学異分野横断萌芽研究会（招待講演）、2012年08月06日～2012年08月08日、分子科学研究所

〔その他〕

ホームページ等

<http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/hikari/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中曽根 祐介 (NAKASONE YUSUKE)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：00613019