

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24540435

研究課題名(和文) NMRによる光制御型転写因子オーレオクロームの光構造変化とDNA結合様式の追跡

研究課題名(英文) The study of light-induced structural change and DNA binding formation in Aureochrome with NMR

研究代表者

濱田 格雄 (Hamada, Norio)

大阪大学・産学連携本部・講師

研究者番号：80379148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：NMRによる光制御転写因子オーレオクロームの光構造変化とDNA結合様式の追跡を目指し、ラベルタンパク質の合成ならびにNMR測定さらにDNAとの結合の解析を進めた。NMR測定においては、タンパク質骨格部分の構造変化は確認されたが、構造決定には至らなかった。DNAとの結合様式に関しても同様で、シグナルのブロードニングによりアサインはできなかったが、光構造変化様式に違いがあることが分かった。一方、タンパク質変異体作製では、光による二量体化を野生型に比べ20倍程度安定化する変異体作製に成功した。これら変異体は二量体構造を安定に保持することも確認できた。

研究成果の概要(英文)：Aureochrome-1 is a blue light receptor that mediated the branching response in stramenopile alga and light-regulated transcription factor, although molecular mechanism is unknown. We have tried to measure light-induced structural change and DNA binding formation in Aureochrome with NMR spectroscopy. Light-induced structural change signals were observed in photo-steady state of Aureochrome with NMR. We confirmed the different peaks between dark state and photo-steady state in Aureochrome. However some peaks were not assigned in photo-steady state due to signal broadening. To obtain the structural information, we produced mutants according to similar LOV domain sequences. We found that some mutants were stabilized photo-steady conformation.

研究分野：生物物理

キーワード：NMR 構造変化 光受容タンパク質 DNA結合 転写因子

1. 研究開始当初の背景

オーレオクロームは、大きく分けて光で駆動する部分と DNA に結合する部分とからなるタンパク質である。タンパク質としての特徴をまとめると以下ようになる。

- ・ 黄色植物であるフシナシミドロ中で発見された
- ・ 転写因子であり、DNA 結合によりタンパク質生合成の制御をする
- ・ bZIP ドメイン構造を有しており、二量体化して DNA に結合する
- ・ 青色光感受性領域である LOV(light-oxygen-voltage)ドメインを持つ

これらのことをまとめ、光駆動型転写因子として東北大学・片岡博尚教授(当時)が報告した¹。さらに大腸菌の大量発現系を研究分担者である大阪大学・久富修准教授が確立したことから、分光的分析や構造解析へ至る道筋が整いつつあった。

LOV ドメインは、多数のタンパク質で見つかった構造ドメインであり、その作動原理解明も進みつつある状況で、新規 LOV ドメインタンパク質としてオーレオクロームは発見された。また日本で発見されたこともあり、オーレオクロームについては、日本国内で研究拠点が形成され始めた時期であり、日本を中心に論文の数も増えつつある状況にあった。

¹ “AUREOCHROME, a photoreceptor required for photomorphogenesis in stramenopiles,” F. Takahashi et al., *Pro.N.A.S.* 2007, vol.104, 19625-19630

2. 研究の目的

本申請では、LOV ドメインの光構造変化を包括的に理解することを目的としており、そのために NMR を用いるとした。最終的に立体構造に基づいた構造変化の議論に至ると考えているが、今回は、あくまでも NMR 上で変化した部分の抽出に力点を置き、その変化が何による変化であるのかを各種パルス

テクニックを用いて明らかにしたい。今回オーレオクロームを利用する理由は以下。

- ・ 光駆動での DNA 結合がユニークであること
- ・ 光励起後の構造が約 20 分程度の寿命を持ち、非常に安定であること
- ・ 変異体作製により寿命改変、結合様式変化が容易なこと
- ・ 大量培養が可能のため ¹⁵N や ¹³C のラベル化が比較的安価で行えること
- ・ 既に LOV ドメインと bZIP ドメインに分けて発現精製されており、詳細検討が可能なこと
- ・ 類似タンパク質情報が豊富にあるが、全くの新規タンパク質であること
- ・ 今のところ国内グループで展開されており、NMR での研究がないこと

などからオーレオクロームを用いた NMR 測定を目指すこととした。

3. 研究の方法

3ステップを考えた。

1. 繰り返し測定の可能性の検討と構造情報取得
2. データ取得およびデータ精度の検証
3. マップの作成

これらにより、光構造変化の実体をタンパク質全体に渡って評価する。

【ステップ 1.】 繰り返し測定の可能性の検討と構造情報取得

安定な NMR のデータ取得には繰り返し積算は避けて通ることができない。これまでに申請者らは、オーレオクロームの分光学的研究を通じてレーザー照射を行ってきており繰り返し積算が可能であることは確認している。しかし、それがどの程度まで可能なのか詳細検討はしておらず本申請ではこのことを検証する。このことにより、次のステップで使うことができる NMR のパルスシーケンス、すなわち取得できるデータの種類の決定される。

さらに、構造情報の取得を目指す。これは立体構造解析を行うためのものではなく、各残基の特定ならびに結合の有無の検証を行うために取得することを目的としている。

この検証は、測定と同時並行で行うものであるが、一年半程度の期間を考えている。

【ステップ2】 データ取得およびデータ精度の検証

ステップ1.で検証されたデータを基に実際のデータ取得を行う。この段階で、どの程度の構造情報までが取得可能か分かっている。一例を挙げると、NMR では双極子-双極子の相互作用を見るパルスシーケンスが存在し、このデータを解析することによって α ヘリックスの状態を推定することができる。これを照射後どのような変化を起こすのかを追跡したい。これらパルスシーケンスを可能な限り適用し、可能な限り多くのデータ取得を目指す。図1.に照射後のNMR スペクトルを示す。

ステップ2.は、一年程度を予定している。

【ステップ3.】 マップの作成

ステップ2.で得られたデータを残基情報と照らし合わせ、マッピングする。また、時系列に並べることができるものについて、時系列で並べて検証する。

申請者らのグループでは、実際、違う光受容タンパク質ではあるが、タンパク質の主鎖のNH 相関を見る ^{15}N -HSQC を用いて、時分割測定を試みたことがあり、主鎖骨格の動きのトラップには成功しており、今回これにさらに残基の情報を上乘せし、構造変化をより具体的に把握することを目指す。

水素結合の組換によって、低分子化合物では、大きな変化が得られる。ラベル化合物を使用さらにはパルステクニックを使用することによって、ある程度複雑な化合物まで、その位置と水素結合強度までを決めることができる。

タンパク質において、このような解析が可能

なわけではないが、安定に必要な情報を収集することができれば、議論は可能である。

このような作業を各残基レベルで次々とデータを取得し、解析を加え、全体像を作り上げていくのが今回の本申請である。

またサンプルは、ラベル体を用い残基ごとのアサインを二年目あたりに終了したいと考えている。これは、これまでのLOVの研究からもデータベース使用が可能なることから、比較的容易に済むと考えている。

最終的なマップがどのようなものなるかは、二年目のステップ2により明らかとなるが、タンパク質全体に渡る変化の様相をマッピングすることを目指す。我々の研究グループでは、図1.に示した通り、他の光受容タンパク質について光定常状態ならびにパルス光導入による変化追跡については、実績があり、オーレオクロームにおいてもここまでのデータ取得は可能と考えている。本申請では、さらに一歩進めて、可能な限り有用なデータを集め、解析するところまで駒を進めたい。ここでも若手B時代に高分子科学専攻に籍を置かせていただいた経験が活けると考えている。高分子科学専攻では、NMR 測定を担当したのだが、ほとんどがタンパク質から見ると低分子化合物であり、その原子位置の特定というこれまでに経験したことのない研究を行った、この経験を活かし、化学的側面からタンパク質を見ることを本申請では目指す。

4. 研究成果

NMR 測定においては、タンパク質骨格部分の構造変化は確認されたが、構造決定には至らなかった。これは想定されたことではあったのだが、類似タンパク質の構造データが使えるレベルまでの条件出しを行えるように実験を繰り返したが、構造として収束するレベルまでアサインを絞り込むことはできなかった。DNA との結合様式に関しても同様

で、シグナルのプロードニングによりアサインはできなかったが、光構造変化様式に違いがあることが分かった。これらのことから、さらに構造が安定化していると考えられる変異体作製を共同研究者のグループで精力的に進めていただいた。その結果、タンパク質変異体作製では、光による二量体化を野生型に比べ 20 倍程度安定化する変異体作製に成功した。これら変異体は二量体構造を安定に保持することも確認できた。

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)

(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 7 件)

R. Nakamura and N. Hamada, “Vibrational energy flow in photoactive yellow protein revealed by infrared pump-visible probe spectroscopy.” *J. Phys. Chem. B*, 119(19), 査読有, 2015, 5957-5961.

DOI: 10.1021/jp512994q.

Y. Nakatani and O. Hisatomi, “Molecular Mechanism of Photozipper, a Light-Regulated Dimerizing Module Consisting of the bZIP and LOV Domains of Aureochrome-1.” *Biochemistry*, 査読有, 54(21), 2015, 3302-3313.

DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00320.

O. Hisatomi, Y. Nakatani, K. Takeuchi, F. Takahashi, S. Tokutomi and H. Kataoka, “Blue Light-induced Dimerization of Monomeric Aureochrome-1 Enhances Its Affinity for the Target Sequence.” *J. Biol. Chem.* 査読有, 289, 2014, 17379-17391.

DOI: 10.1074/jbc.M114.554618

久富修「bZIP 型転写因子の光制御機構とその応用」*生物物理*、査読有、54(6)、2014、307-310.

DOI: 10.2142/biophys.54.307

K. Takeuchi, Y. Nakatani and O. Hisatomi, “Accuracy of Protein Size Estimates Based on Light Scattering Measurements.” *Open Journal of Biophysics*, 査読有, 4, 2014, 83-91.

DOI: 10.4236/ojbiphy.2014.

O. Hisatomi, K. Takeuchi, K. Zukihara, Y. Ookubo, Y. Nakatani, F. Takahashi, S. Tokutomi and H. Kataoka, “Blue light-induced conformational change in a light-regulated transcription factor, Aureochrome-1” *Plant & Cell Physiol.* 査読有, 54(1), 2013, 93-106.

DOI: 10.1093/pcp/pcp160

R. Nakamura, N. Hamada, K. Abe, and M. Yoshizawa, “Ultrafast hydrogen-bonding dynamics in the electronic excited state of photoactive yellow protein revealed by femtosecond stimulated Raman spectroscopy,” *J of Phys. Chem.* 査読有, 116(51), 2012, 14768-14775.

DOI: 10.1021/jp308433a

[学会発表](計 12 件)

R. Nakamura and N. Hamada, “Vibrational energy flow of chromophore in protein probed by IR pump and visible probe spectroscopy.” 2015 年 6 月 10 日 ~ 12 日, Zurich

H. Hata, R. Nakamura, N. Hamada, and T. Kamimura, “Transient IR pump-probe spectroscopy of photoactive molecules using chirped pulse upconversion.” 3rd International Conference on Ultrafast Structural Dynamics, 2015 年 6 月 10 日 ~ 12 日, Zurich

N. Hamada, N. Inazumi and R. Nakamura, “Influence of steric limitations around chromophore in protein cage of photoactive yellow protein.” 16th International Conference on Retinal Protein, 2014 年 10 月 5 日 ~ 10 日, Nagahama

O. Hisatomi, “A photo-activated basic-leucine zipper module, opZL.” 16th International Conference on Retinal Protein, 招待講演, 2014 年 10 月 5 日 ~ 10 日, Nagahama

O. Hisatomi, Y. Nakatani and Y. Kai, 「蛍光タンパク質との融合による光二量体化モジュール(Photodimerizer)の機能評価」第 52 回日本生物物理学会 2014 年 9 月 25 日 ~ 27 日、北海道

Y. Nakatani and O. Hisatomi, 「光制御型 bZip モジュール Photodimerizer の二量体化分子機構」第 52 回日本生物物理学会 2014 年 9 月 25 日 ~ 27 日、北海道

Y. Akiyama, Y. Nakasone, O. Hisatomi, Y. Nakatani, and M Terazima, 「光依存転写因子オーレオクローム I の反応ダイナミクス」第 52 回日本生物物理学会 2014 年 9 月 25 日 ~ 27 日、北海道

中村亮介、濱田格雄「中赤外光励起によるタンパク質内包色素分子の振動ダイナミクスの研究」2014 年秋季大会、日本物理学会、2014 年 9 月 7 日 ~ 10 日、中部大学

中村亮介、濱田格雄「光受容タンパク質の光励起構造変化と水素結合ダイナミクス」第 69 回日本物理学会、2014 年 3 月 27 日 ~ 30 日、東海大学

Y. Nakatani K. Takeuchi Y. Izawa F. Takahashi H. Kataoka and O. Hisatomi, 「Aureochrome-1 の各ドメインの機能解

析」第 51 回日本生物物理学会 2013 年 10 月 28 日～30 日、京都

K. Takeuchi, Y. Nakatani and O. Hisatomi, 「動的光散乱法による水溶性タンパク質の分子量の測定」第 51 回日本生物物理学会 2013 年 10 月 28 日～30 日、京都

O. Hisatomi, K. Takeuchi, Y. Nakatani, F. Takahashi and H. Kataoka, 「青色光により励起される転写因子 AUREO1 の構造変化」第 50 回日本生物物理学会 2012 年 9 月 22 日～24 日、名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 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 0 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 格雄 (HAMADA, Norio)
大阪大学 産学連携本部・特任講師
研究者番号：80379148

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：