

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840047

研究課題名(和文) 光受容体フォトトロピンの光情報認識からキナーゼ活性化に至る分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of kinase activation of light sensor protein phototropin

研究代表者

中曽根 祐介 (Nakasone, Yusuke)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00613019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：青色光センサー蛋白質Phototropin (phot) は、光受容を担うLOVドメインと光依存的に活性化されるkinaseドメインからなる。その活性化機構を明らかにするため、緑藻クラミドモナス由来の全長photの精製を行い、過渡回折格子(TG)法により光反応の検出を行った。その結果、光依存的に二量体化する様子が観測され、同時に二次構造の変化も誘起されることがわかった。これらの反応は主にLOV1ドメインによって制御されることがわかり、LOV1とLOV2をつなぐhinge領域で顕著な動きがあることが示された。これらの結果は高等植物由来のphotと大きく異なり、photの多様性を示す結果となった。

研究成果の概要(英文)：Phototropins (phots) are blue-light dependent kinases in higher plants as well as in green algae. They contain two LOV domains (LOV1 and LOV2) as light sensing modules. In this study, we investigated the reaction dynamics of full-length phot and its shorter fragments from *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr-phot) to understand the mechanism of kinase activation by the transient grating (TG) method.

We have detected global reactions in milliseconds time scale as a decrease of diffusion coefficient (D). The rate constant of the D change depended on the protein concentration linearly, indicating that the reaction was bimolecular reaction (dimerization). This reaction was mediated by the LOV1 domain and the contribution of the LOV2 domain to the D change was very minor. These findings are different from those of phot from *Arabidopsis*, which represents the diversity of phot among organisms.

研究分野：生体分子科学

キーワード：phototropin LOVドメイン 過渡回折格子法 蛋白質反応 光センサータンパク質

1. 研究開始当初の背景

多くの生命は外界を認識し応答するために光情報のセンシング機構を持つ。Phototropin (phot) は、高等植物や藻類の様々な運動反応を制御する青色光センサー蛋白質であり、光受容を担う二つの LOV ドメイン(LOV1、LOV2)と、活性化を示す Ser/Thr kinase ドメイン、さらに LOV2 と kinase を結ぶ linker ドメインから構成される(図1)。



図1 青色光センサーphototropinの一次構造

その生理活性の評価は国内外で盛んに行われ、生理機能に関する情報は豊富である。例えば高等植物では光屈性や気孔の開閉を制御し、藻類においては有性生殖の促進を行うことが報告されている。しかし分子レベルでの信号伝達機構は未知な部分が多い。何故なら全長蛋白質の回収が困難であったため、生物物理学的研究が LOV ドメインのみを切り取った試料に限られていたためである。その結果、LOV ドメインの構造や反応機構の解明が進んだにも関わらず、生理機能に重要な kinase の活性化機構は依然不明なままであった。

2. 研究の目的

研究の進展が行き詰まりを見せる中、求められていたのは全長蛋白質の反応検出であり、これを達成すればこれまでの研究を発展させる大きな突破口となる。こうした背景の中、本研究では実際に全長蛋白質の回収および測定を行い、LOV ドメインの光情報認識から kinase 活性化に至る分子機構の解明を目指した。

具体的には緑藻クラミドモナスおよびオストレオコッカス由来の全長 phot を精製し、その光反応を TG 測定により検出した。特にこれまで不明だった kinase ドメインの構造変化に注目した測定を行い、LOV ドメインが kinase 活性を制御の様子を実時間で捉えることを試みた。また Phot には二つの LOV ドメインが含まれており、LOV2 が kinase の活性化に直接関与する一方、LOV1 は phot の光感度を調節すると考えられている。しかし、LOV1 と LOV2 の構造は相同性が非常に高く、役割の違いを生み出す分子機構は構造情報のみでは議論できなかった。そこで光反応という観点から相違点を見出し、機能の違いを生み出す原理を明らかにすることを目的とした。

さらにこれまで測定を行ってきた高等植物シロイヌナズナ由来の phot の結果とも比較・検討することで、異なる生物種が持つ phot の共通点・相違点を調べることを目指した。つまり機能の違いを生み出す仕組みを分子レベルで明らかにし、さらに生物が進化する過程を議論することも視野に入れた研究を

行った。

3. 研究の方法

蛋白質の信号伝達は短時間で段階的に進行するため、その解明には時間分解能に優れた手法が必要である。一般に用いられる吸収や発光の測定では時間分解能に優れているものの、発色団のように光を吸収・発光する分子周りの変化を捉えるにとどまり、蛋白質のような巨大分子ではその全貌を明らかにすることは出来ない。そこで本研究では過渡回折格子法(Transient Grating (TG)法)を用いて phot の反応検出を行った。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ため、高次構造変化や分子間の会合・解離過程を評価することができる。これは他の分光法では得難い情報であり、非常に独創的である。その他、CD 測定やゲル濾過測定を並行して行い、二次構造や会合状態の解析を行うことで分子レベルでの信号伝達機構解明を目指した。

測定試料にはクラミドモナス由来の phot (Crphot) とオストレオコッカス由来の phot (Ophot) を用いた。これらは高等植物由来の phot と異なり全長蛋白質の回収が可能であり、kinase の活性化機構や自己リン酸化過程を調べることが出来るためである。また反応部位の特定を行うために各ドメインを切り出した試料の調製も行い、測定結果を比較した。

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、発色団周りの初期過程には LOV1・LOV2 による違いや生物種間での差はほとんど見られなかった。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された。以下、各試料に関して得られた結果を報告する。

(1) Crphot

図2に全長 Crphot 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、立ち上がりと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。

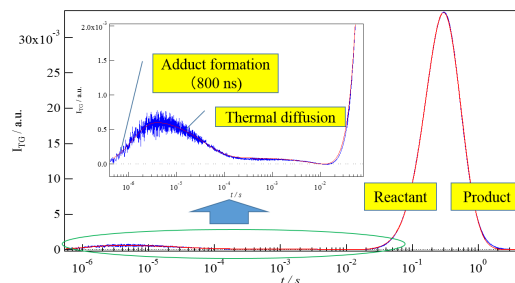


図2: 全長CrphotのTG信号

phot には光受容ドメインが二つ含まれているため、図2の信号にはこれら二つの光反応

の寄与が含まれており、解析が複雑になる恐れがある。そこで LOV1、LOV2 それぞれの反応をブロックした変異体 (C57A、C250A) を作製し、同様の測定を行った (図3)。

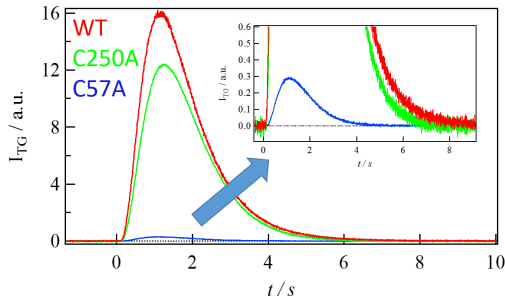


図3: 全長CrphotのTG信号

その結果、LOV1 の反応をブロックしたミュータント (C57A) では分子拡散信号の強度が大幅に減少の様子が観測された。これは拡散係数変化の度合いが小さくなったことを表しており、LOV1 ドメインが拡散係数変化に主に寄与していることがわかった。植物由来の phot では LOV2 の反応が大きな構造変化を引き起こすことが報告されているが、Crphot では逆の挙動が観測されたことは大変興味深い。さらに格子波数を変えた測定を行い、LOV1・LOV2 ドメインの反応速度を決定することにも成功し、それぞれ光励起後 140ms、100ms の時定数で拡散係数変化を伴うグローバルな反応を起こすことがわかった。これらの結果を踏まえ WT の信号を改めて解析しようとしたが、LOV1・LOV2 ドメインそれぞれの反応の単純な足し合わせでは信号を再現できなかった。この結果は LOV1 ドメインと LOV2 ドメインが光依存的に相互作用して機能することを示唆している。

次に観測された拡散係数変化の詳細を調べるために、濃度変化測定・ゲル濾過測定・CD 測定を行った。

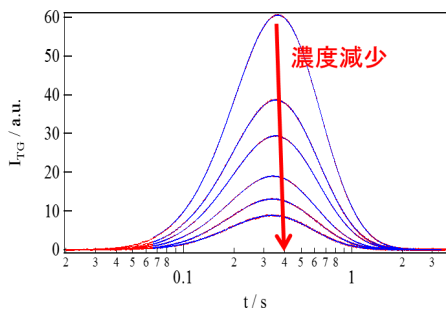


図4: WTの濃度変化測定

図4に Crphot-WT 試料の蛋白質濃度を変えて TG 測定した結果を示す。反応分子数で規格化しているが、その信号強度は濃度を下げると減少の様子が観測された。詳しい解析の結果、反応速度と蛋白質濃度に線形関係があることがわかり、擬似的な一次反応つまり二

分子反応であることがわかった。また暗状態と明状態でゲル濾過測定を行ったところ、暗状態ではモノマーの位置に溶出ピークが現れたが、明状態ではダイマーの位置に溶出する分子が確認された。以上から、Crphot は光依存的にダイマーを形成することがわかった。つまり会合反応によって分子サイズが大きくなったことが拡散係数減少の一つの要因であることがわかった。

次に CD 測定した結果を図5に示す。この実験では光を照射して明状態を蓄積した後、光をブロックすることで、暗回復過程における CD 強度の変化をモニターした。測定波長は 222nm であり、ヘリックスの含有量に敏感な波長を用いた。

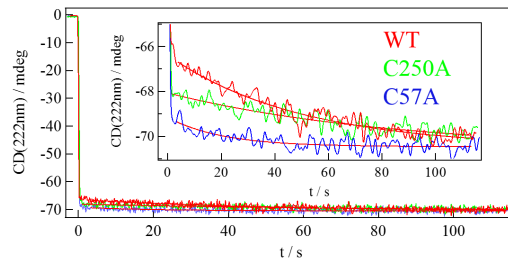


図5: CD強度の暗回復過程

全ての試料でヘリックス構造が回復の様子が観測された。これは光照射によってヘリックス構造が部分的に崩壊していることを表している。LOV1・LOV2 の反応をそれぞれブロックした試料でもヘリックスの回復が観測されたことから、両方の LOV ドメインがヘリックス構造を壊す働きがあることが示された。

最後に観測された構造変化がどの部位で起こっているのかを特定するために、各ドメインを切り取った試料を作製し、TG 測定や CD 測定を行った。その結果 LOV1 と LOV2 をつなく hinge 領域を含む試料でのみ非常に強い分子拡散信号が観測された。この結果は WT で観測された拡散係数変化には hinge 領域の構造変化が大きく寄与していることを示している。つまり会合反応やヘリックスの崩壊反応は hinge 領域で起こっていると予想される。これまでの高等植物由来の phot の研究では LOV2 と kinase をつなく linker 領域が信号伝達に重要と考えられてきたが、本研究により新しい信号伝達経路を提唱するに至った。

(2) Otpphot

図6に Otpphot の TG 信号を示す。Otpphot についても LOV1・LOV2 それぞれの反応を明らかにするために WT と共に LOV1 ドメインの反応をブロックしたミュータント (C51A) の測定を行った。

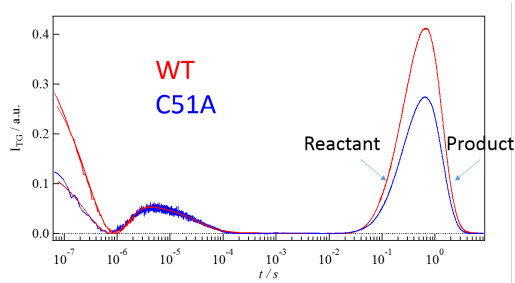


図6: OtpnotのTG信号

CrphotではLOV1の反応をブロックすると分子拡散信号は顕著に小さくなったが、Otpnotではその効果は小さかった。この結果はLOV2ドメインの反応が拡散係数変化に大きく寄与していることを表している。LOV2が関与する拡散係数変化の時定数は8msと求まり、この値もCrphotとは大きく異なることがわかった。さらに濃度を変えて測定を行ったところ、反応速度が濃度に依存せず一定であることが確認され、光依存的な会合反応は起こっていないことがわかった。つまり拡散係数変化は蛋白質分子の構造変化によるものであることがわかった。

そこでCD測定を行ったところ、図7に示すように暗状態と明状態で二次構造が大きく

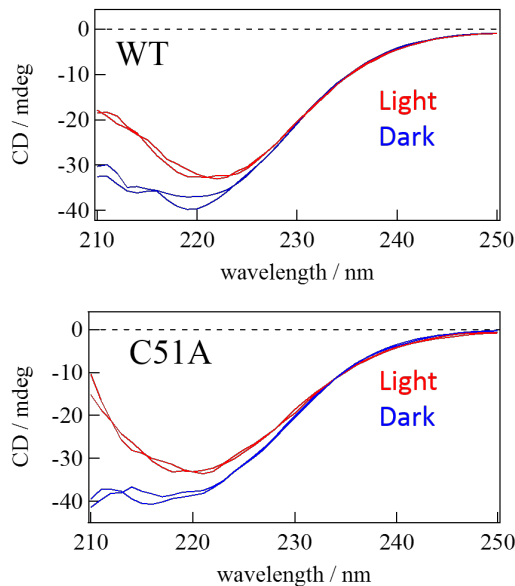


図7: WTとC51AのCDスペクトル

く変化する様子が観測された。この変化は主にヘリックス構造の含有量の差に帰属され、明状態でヘリックスが壊れることが示された。またLOV1の反応をブロックしたミュータント(C51A)でもWTと同程度の変化量が観測されたことから、ヘリックスの崩壊過程はLOV2ドメインが主に制御していることがわかった。以上から、LOV1、LOV2ドメインの役割がCrphotとOtpnotで大きく異なることが分子レベルでの反応検出から示唆された。

さらに構造変化部位の特定のために全長蛋白質からkinaseドメインおよびlinkerヘリックスを切り取った試料(LOV1-LOV2)の測定を行った結果を図8に示す。

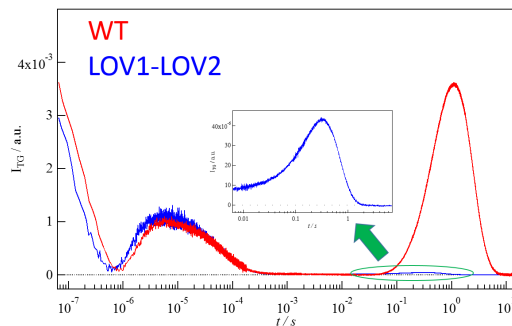


図8: WTとLOV1-LOV2試料のTG信号

LOV1-LOV2試料ではWTで観測された強い拡散信号が極めて小さくなることがわかった。この結果はWTで観測された構造変化(ヘリックス構造の崩壊反応)がlinkerやkinase部位で起こっていることを示している。高等植物でもlinker領域で大きな構造変化が起こることがわかっており、Otpnotの反応は植物由来のphotと似通っていることがわかった。

さらに自己リン酸化過程を捉えるためにATPを加えた系で測定を行った結果、分子拡散信号がATP非存在下よりも強くなることが観測され、構造変化がさらに促進されることを見出した。これはリン酸化によって負の電荷を帯びたことで構造変化が引き起こされる様子を捉えたものと考えている。

以上の結果は信号伝達過程を理解する上で有意義な知見である。また生物種間でその反応機構が大きく異なることを見出したことも重要な発見である。アミノ酸配列や構造の類似性は高いものの、反応ダイナミクス(信号伝達機構)においては大きく異なるという結果は非常に興味深く、今後も同様の測定を続け、生物種の進化の過程を分子レベルで明らかにすることを目指す。

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3件)

Yusuke Nakasone, Kazunori Zikihara, Satoru Tokutomi, Masahide Terazima.

Photochemistry of Arabidopsis phototropin 1 LOV1 : Transient tetramerization, Photochemistry & Photobiology Science, 査読有, Vol 12, 2013, 1171-79.

DOI 10.1039/c3pp50047k.

Kimitoshi Takeda, Yusuke Nakasone, Kazunori Zikihara, Satoru Tokutomi, Masahide Terazima.

Dynamics of the amino-terminal and carboxyl-terminal helices of Arabidopsis phototropin 1 LOV2 studied by the

transient grating. The Journal of Physical Chemistry B、査読有、Vol 117、2013、15606-15613.
DOI 10.1021/jp406109j.

Yusuke Nakasone, Yuki Kawaguchi, Sam-Geun Kong, Masamitsu Wada, Masahide Terazima.
Photoinduced oligomerization of Arabidopsis thaliana phototropin 2 LOV1、The Journal of Physical Chemistry B、査読有、Vol 118、2014、14314-14325.
DOI 10.1021/jp509448b.

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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

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

〔学会発表〕(計6件)

中曾根祐介、Thermodynamics of the structural fluctuation in the signaling state of phototropin、33rd International conference on solution chemistry、2013年7月7日～2013年7月12、京都

中曾根祐介、Photochemistry of full-length phototropin from green algae、第51回生物物理学会年会、2013年10月28日～2013年10月30、京都

中曾根祐介、Time-resolved study on photoreaction dynamics of full-length phototropin from green algae. The 6th Asia & Oceania conference on photobiology、2013年11月10日～2013年11月13日、シドニー

中曾根祐介、Time-resolved study on transient dimerization of full-length phototropin. 新学術領域研究「動的秩序と機能」第2回国際シンポジウム、2014年1月11日～2014年1月12日、京都

中曾根祐介、Time-resolved study on photoreaction dynamics of full-length phototropin from green algae. 16th International Conference on Retinal Proteins、2014年10月5日～2014年10月10日、滋賀

中曾根祐介、Time-resolved study on photoreaction dynamics of full-length phototropin from green algae. 新学術領域研究「動的秩序と機能」第3回国際シンポジウム、2015年1月10日～2015年1月11日、三重

〔その他〕
ホームページ等