

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870015

研究課題名(和文)光応答膜タンパク質ASRの遺伝子発現調節機構の構造基盤

研究課題名(英文)Structural basis of regulation of gene expression by photoresponsive membrane protein, ASR

研究代表者

神谷 昌克(Kamiya, Masakatsu)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30399810

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)：本研究はシアノバクテリアから発見された微生物型ロドプシンファミリーに属する光応答膜タンパク質ASRによる遺伝子発現の制御機構を明らかにするためにASRとASR transducer (ASRT)の試料調製法の検討及びそれらの間の相互作用解析を行った。遺伝子発現コンストラクトのデザイン及びナノディスクによる膜タンパク質の試料調製法を検討し、ASRと関連分子の個々の試料調製法を確立した。次にそれらの試料を用いて等温滴定カロリーメトリー、閃光光分解測定、NMR法を用いて相互作用解析を行い、ナノディスクの系として初めてASRとASRTの間の相互作用を捉えることに成功した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the regulation mechanism of gene expression of light-harvesting proteins by a microbial rhodopsin ASR derived from cyanobacteria, we studied the sample preparation method and performed interaction between ASR and ASR transducer (ASRT). We optimized the sample preparation method of ASR and ASRT, respectively. By isothermal titration calorimetry, flash photolysis and NMR using those samples, we investigated interaction between ASR and ASRT and succeeded in observing the interaction between ASR and ASRT in nanodisc system.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：光応答膜タンパク質 ロドプシン 遺伝子発現制御 相互作用解析

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ロドプシンは色素レチナルを内包する7回膜貫通型の膜タンパク質の総称であり、高等動物の目の網膜において光受容体として機能する視物質ロドプシンがよく知られている。この視物質ロドプシンと同様に、レチナルを内包する7回膜貫通型の膜タンパク質が微生物にも存在し、最初に発見されたバクテリオロドプシンを筆頭に微生物型ロドプシンと呼ばれる。水素イオンポンプであるバクテリオロドプシンは最初に立体構造が決定された膜タンパク質であることなど、微生物型ロドプシンの研究は膜タンパク質研究のさきがけとなってきた。そのため、微生物型ロドプシンは最も分子機構が解明された膜タンパク質ファミリーである。これまで、微生物型ロドプシンは限られた生物種のみで見つかったが、近年のメタゲノム解析の進展により、様々な微生物において存在することが明らかとなってきた。これまでに知られている微生物型ロドプシンの機能は、光センサー、光駆動型イオンポンプ、光ゲートイオンチャネルなどで光エネルギーを利用し、ATP産生や光情報伝達に寄与する。研究代表者の研究室ではこれまでに分光学的な手法を用いて、微生物型ロドプシンの機能や構造に関する研究を行ってきた

ASR(Anabaena Sensory Rhodopsin)は真正細菌であるシアノバクテリアから発見された光センサーとして機能する微生物型ロドプシンである。これまでに、レーザーフラッシュフォトリシス法やフーリエ変換型赤外分光法などの分光学的な手法によりASRの光反応スキームについて調べられてきた。また、ASR遺伝子が乗っているオペロンにはASRT(ASR Transducer)と呼ばれる可溶性タンパク質の遺伝子があり、ASRTはASRと相互作用し、ASRの活性を抑制することが明らかになっている。しかしながら、他の光センサー型ロドプシンと異なりASRの生理的な役割については長らくの間不明なままであった。最近、名古屋大の須藤らはASRが光合成色素タンパク質遺伝子の一つであるcpcBのプロモーター配列に結合し、cpcBの遺伝子発現を光によって制御する機能を持つことを明らかにした。光合成色素タンパク質は、フィコビリソーム(phycobilisomes)と呼ばれる超複合体を構成し、シアノバクテリア中のチラコイド膜の表面に結合し、光合成の光化学系複合体IIに光エネルギーを伝達することが知られている。ASRは光合成色素タンパク質の遺伝子発現調節に関与し、シアノバクテリアの光合成に関わると考えられる。

これまで膜タンパク質の一部がプロセッシングを受けペプチド断片が生じ、そのペプチドが核内に移行し、転写調節因子として機能する例はすでに知られているが、膜タンパク質の状態、プロモーター領域

に結合し転写調節因子として機能する例は知られていない。ASRは微生物型ロドプシンが転写調節因子としてのロドプシンの新たな機能の可能性を示唆しており、その機構の解明が期待されている。現在までに、X線結晶構造解析により、ASRおよびASRTのそれぞれの立体構造は明らかになっているが、ASR、ASRTおよびプロモーター配列の3者の間の複合体および相互作用様式の詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究ではASRによる新規遺伝子発現制御機構の構造基盤の一端を明らかにすべく、これら複合体の構造および形成機構をNMRにより明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ASRおよびASRTの試料調製法の確立

ASRとASRTの相互作用解析に適した試料調製法を確立する。ASRおよびASRTはすでにそれぞれ単独の結晶構造が報告されており、基本的な試料調製法が確立しているが、本研究の相互作用解析にそのまま用いるには以下の問題がある。

ASRがプロモーター配列に結合するには、細胞内側のC末端ドメインが必須である。しかしながら、これまで多くの研究で用いられているASRの遺伝子コンストラクトはC末端ドメインが削除されており、結晶構造もC末端ドメインを欠いたものである。

これまでの研究からASRTがASRに結合する際には、ASRTのフレキシブルなC末端ドメインが結合に重要でないかと予想されている。また、NMRによるASRTとDNAの相互作用解析の結果は、DNAとの結合にもC末端ドメインが重要であることを示した。しかしながら、ASRTの末端部分にはHisタグ配列など余分な配列が付加された試料で解析されており、複合体の相互作用に影響を与える懸念がある。

代表者もASRおよびASRTの上記の遺伝子コンストラクトをそれぞれ大腸菌発現系により、問題なく組み換え体が得られることを確認しているが、今後、ASRとASRTそれぞれにおいて複合体の解析に適したコンストラクトの作製が必要である。ASRにおいて、C末端ドメインを持った完全長のASR遺伝子のコンストラクトはすでに作成済みであり、一方のASRTにおいては、Hisタグを切断するためのプロテアーゼ認識配列を入れた種々のASRTコンストラクトの作製の準備を始めたところである。NMRでの解析を念頭において、ASRおよびASRTの大腸菌発現系による安定な試料調製法を確立する。

(2) ASR、ASRTおよびプロモーター配列の分子間相互作用の解析

上記(1)で調製した種々の ASR と ASRT 試料およびプロモーター配列の 3 者の間の相互作用の解析を行い、NMR 解析に適した試料を検討する。ロドプシンは内包する発色団レチナル由来の吸収スペクトルから試料の状態を調べることができる。上記で作製した試料の吸収スペクトル測定および光応答能を調べるフラッシュフォトリシス測定を実施し、作製した ASR 試料の機能が正常であるかどうかを調べる。ASRT については、CD スペクトルや動的光散乱による測定を文献のデータと比較することが試料の状態をチェックする。ASR、ASRT およびプロモーター配列のそれぞれの試料について問題ないことを確認した後、3 者の間の相互作用解析を ITC を用いて行う。上記で述べたように、これまで用いられてきた遺伝子コンストラクトは相互作用解析に対して問題があったことから、解離定数など相互作用に関する過去の文献値は信用できない可能性がある。そのため、本研究で作製された試料の相互作用様式を ITC 測定により明らかにし、NMR による相互作用解析に用いる ASR および ASRT のコンストラクトを決定する。

(3) ASR および ASRT の NMR 解析用試料調製の確立と測定および信号帰属

NMR 解析可能 ASR および ASRT の試料調製法を検討する。ASR についてはすでに別なロドプシン試料で確立した NMR で解析可能な試料調製法(右図)を適用する。ASRT については、¹⁵N ラベル化 ASRT の ¹⁵N-HSQC を測定し、スペクトルのピーク同士の分離の程度をモニターしながら、解析可能なスペクトルを得るための試料および測定条件を検討する。¹⁵N, ¹³C, ²H の同位体ラベル化試料を調製し、ASR および ASRT の主鎖および側鎖帰属のための一連の測定を行う。ASRT の NMR 信号の部分的な帰属データの報告があり、そのデータも参考にしながら、ASRT の主鎖および側鎖に由来する原子の化学シフト情報を収集する。

(4) ASR、ASRT およびプロモーター配列の NMR による相互作用解析

まずは ASR と ASRT の間の相互作用解析を行う。¹⁵N 標識 ASRT 試料に対して非標識 ASR を滴定することで、化学シフト摂動法および転移交差緩和法により ASRT 上の ASR との相互作用部位を特定する。また、その逆に ¹⁵N 標識 ASR 試料に対して非標識 ASRT を滴定することで、同様に ASR 上の ASRT との相互作用部位を特定する。ASR と ASRT 分子間の原子間距離情報を得るために ASR に常磁性スピンラベルを入れる。スピンラベル試薬はすでに ASR の NMR 解析で実績のある MTSL を用いる。MTSL は SH 基特異的な試薬であるので ASR の膜外ループに Cys 残基を変異導入することで ASR をスピンラベル

化する。スピンラベルが導入された ASR と ASRT の複合体の NMR 測定により、常磁性緩和効果による距離情報を取得する。Cys 残基の導入部位が異なる数種類のスピンラベル化 ASR を用いた NMR 測定から構造計算に必要な距離情報を収集し、複合体の構造を決定する。ASR-プロモーター配列、ASRT-プロモーター配列および 3 者複合体の解析も上記と同様な方法で行う。また、光照射による相互作用の変化を観察するために本申請の備品として計上したレーザーを光ファイバーにより NMR マグネットの中にまで引き込むことでレーザーによる光照射下での各複合体の相互作用解析を行う。

上記の相互作用解析から得られた知見をもとに ASR および ASRT の変異体をデザインし、野生型と同様な解析を行うことで複合体の形成に重要なアミノ酸残基を特定する。以上の解析から ASR の遺伝子発現制御の分子機構の詳細を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ASR および ASRT の試料調製法の確立

ASR と ASRT それぞれにおいて複合体の解析に適したコンストラクトの検討を行った(図 1)。

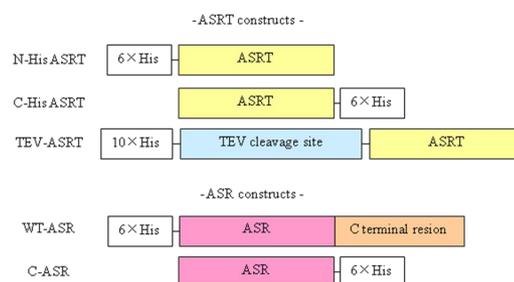


図 1 各種コンストラクト

これらのコンストラクトの末端領域の状態に依存して ASRT 多量体の安定性に違いが生じるのかを検証するため、SDS-PAGE を行った(図 2)。今回の実験では、プロテアーゼ処理前(図中 A_TEV)後(図中 B_TEV)の TEV-ASRT についても同様の操作を行い、より天然に近い構造を持った ASRT との多量体構造の安定性比較を行うことにした。加熱処理を施して完全に変性させたサンプルはすべて 14 kDa 付近の単一バンドが確認された。しかし、加熱処理を施していない N-His ASRT (図中 N-His) は分子量 40 kDa 程度の位置にバンドが確認されるのに対し、C-His ASRT (図中 C-His) は分子量 14 kDa の位置にバンドが確認され、TEV-ASRT については、His-tag を除去した場合と His-tag が残された場合では泳動バンドが示す分子量に違いが確認され、His-tag を除去した場合には分子量 30 kDa 程度の位置にバンドが、His-tag が残された場合については 45 kDa と 14 kDa 付近の位置に 2 本のバンドが確認された。

これらの SDS-PAGE の結果から、His-tag を除去した天然状態の ASRT は SDS による変性を受けにくく、構造を取った四量体状態を維持していると推測される。

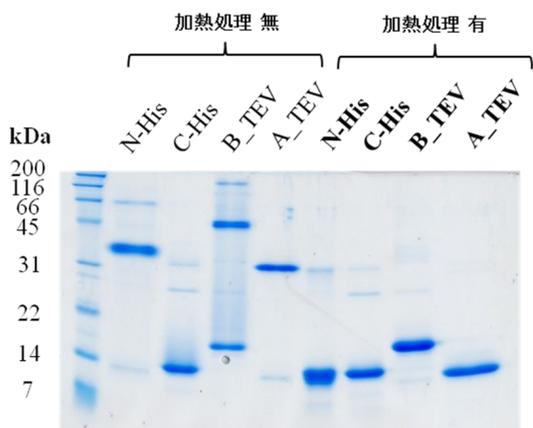


図 2 SDS-PAGE

(2) ASR、ASRT およびプロモーター配列の分子間相互作用の解析

そこで、(1)で検討したコンストラクトを用いてフラッシュフォトリシス法により ASR と ASRT の相互作用解析を行った。しかしながら、ASR のみと ASRT との共存下においてスペクトルの有意な差が観測されず、フラッシュフォトリシス法によって相互作用を検出することができなかった。相互作用の解析のそれぞれにおいて ASR の試料調製は界面活性剤によって可溶化する方法を用いている。しかしながら、界面活性剤を用いた試料調製法では界面活性剤の持つ特性により、それらの解析に不適合なことが考えられた。そこで、界面活性剤を用いない新たな膜タンパク質の調製法として近年注目されているナノディスクを用いることとした。ナノディスク法による ASR の試料調製の検討の結果、ナノディスクによる ASR の試料調製に成功し、また、界面活性剤に比べ非常に安定であることが明らかになった。

次にナノディスク法により調製した ASR に対して ASRT を滴定することで ASR と ASRT の比率を ASR:ASRT=1:0, 1:1, 1:10, 1:20 と変化させ、それぞれの比率でのフラッシュフォトリシスを測定した(図 3)。

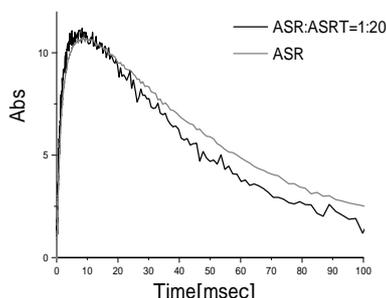


図 3 フラッシュフォトリシス

フラッシュフォトリシス測定の結果は、フォトサイクル中の 400 nm の波長における M 中間体の崩壊速度が、ASRT の濃度に依存的に大きくなることを示した。その他の波長ではフォトサイクルの速度にほとんど変化が見られなかった。このことにより ASRT は ASR と相互作用し、M 中間体の寿命に影響を与えることが明らかになった。

(3) ASR および ASRT の NMR 解析用試料調製の確立と測定および信号帰属

さらに末端構造の違いが NMR スペクトルに与える影響について検証するため、N-His ASRT、C-His ASRT、精製後に His-tag を切除した TEV-ASRT、それぞれの ^{15}N ラベル体を作製し、TROSY 測定を行った。まず、先行研究の測定条件 (Wang S et al., 2011) に沿って N-His ASRT の ^1H - ^{15}N TROSY 測定を行った。得られたスペクトルを先行研究の結果と比較すると、極めて再現のとれた高感度なスペクトルが得られた(図 4)。残りの ASR についても同様の測定を行い、得られた N-His ASRT のスペクトルと比較検証を行った。はじめに、C-His ASRT の ^1H - ^{15}N TROSY スペクトルと N-His ASRT のスペクトルの比較を行った結果、大部分のピークに大きなシフトが確認され、C-His ASRT のスペクトルには N-His ASRT のスペクトルには見られないマイナーピークがいくつも見られた。次に、より天然の ASRT 近い構造を持つと考えられる TEV-ASRT の ^1H - ^{15}N TROSY スペクトルを N-His ASRT のスペクトルと比較すると、ほぼ完全にピークの位置が一致し(図 4-8)、先行研究 (Wang S et al., 2011) による N-His ASRT の帰属を元に、プロリンを除く 60%の残基の帰属を行うことに成功した。

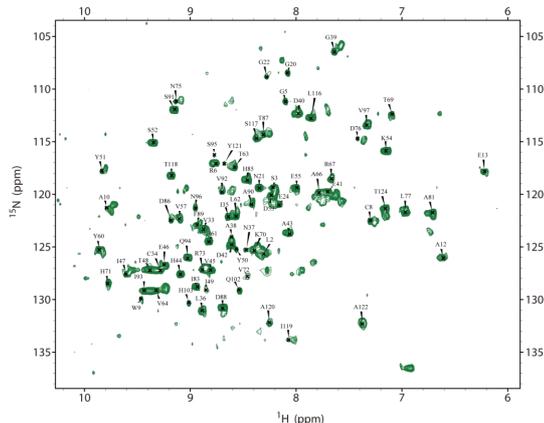


図 4 ASRT の NMR スペクトル

(4) ASR、ASRT およびプロモーター配列の NMR による相互作用解析

ASR と ASRT の NMR による相互作用解析を行った。 ^{15}N 同位体標識 ASRT に対して(2)で確立したナノディスク法による試料調製法を用いて調製した ASR を滴定することにより、相互作用部位の同定を試みた。ASR を添加

することにより、 ^{15}N -ASRT の ^{15}N -TROSY スペクトルのピークの化学シフト変化及び広幅化が観測され、ASR と ASRT の相互作用を NMR で観測することに成功した。しかしながら、ピークの広幅化の程度が大きく、相互作用部位の同定までには至っていない。今後、実験最適化やナノディスクの骨格タンパク質の違うコンストラクトを用いることで、NMR により相互作用の詳細が明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Baek MH, Kamiya M, Kushibiki T, Nakazumi T, Tomisawa S, Abe C, Kumaki Y, Kikukawa T, Demura M, Kawano K, Aizawa T, Lipopolysaccharide-bound structure of the antimicrobial peptide cecropin P1 determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J Pept Sci*, 査読有 Vol. 22, No. 4, 2016, pp.214-221, DOI: 10.1002/psc.2865.

Kuddus MR, Rumi F, Tsutsumi M, Takahashi R, Yamano M, Kamiya M, Kikukawa T, Demura M, Aizawa T, Expression, purification and characterization of the recombinant cysteine-rich antimicrobial peptide snakin-1 in *Pichia pastoris*, *Protein Expr Purif*, 査読有, Vol. 122, 2016, pp.15-22, DOI:10.1016/j.pep.2016.02.002.

Tamaki H, Egawa A, Kido K, Kameda T, Kamiya M, Kikukawa T, Aizawa T, Fujiwara T, Demura M, Structure determination of uniformly ^{13}C , ^{15}N labeled protein using qualitative distance restraints from MAS solid-state ^{13}C -NMR observed paramagnetic relaxation enhancement, *J Biomol NMR*, 査読有, Vol. 64, No. 1, 2016, pp.87-101, doi:10.1007/s10858-015-0010-0.

Ose T, Oikawa A, Nakamura Y, Maenaka K, Higuchi Y, Satoh Y, Fujiwara S, Demura M, Sone T, Kamiya M, Solution structure of an avirulence protein, AVR-Pia, from *Magnaporthe oryzae*. *J Biomol NMR*, 査読有, Vol. 63, No. 2, 2015, pp.229-235, DOI:10.1007/s10858-015-9979-7.

Kikukawa T, Kusakabe C, Kokubo A, Tsukamoto T, Kamiya M, Aizawa T, Ihara K, Kamo N, Demura M. Probing the Cl^- -pumping photocycle of

pharaonis halorhodopsin: Examinations with bacterioruberin, an intrinsic dye, and membrane potential-induced modulation of the photocycle, *Biochim Biophys Acta*, 査読有, Vol. 1847, No. 8, 2015, pp.748-758, DOI:10.1016/j.bbabi.2015.05.002.

〔学会発表〕(計 2 件)

比嘉一葉、神谷昌克、菊川峰志、熊木康裕、出村誠、相沢智康、膜タンパク質 ASR との相互作用解析に向けた ASRT の NMR 解析、第 53 回 NMR 討論会、2014.11.4-6、大阪大学コンベンションセンター(大阪府・吹田市)

比嘉一葉、神谷昌克、菊川峰志、熊木康裕、出村誠、相沢智康、膜タンパク質 ASR との相互作用解析に向けた ASRT の NMR 解析、第 5 回日台シンポジウム、2014.9.29-30、北海道大学百年記念館(北海道・札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 昌克 (KAMIYA, Masakatsu)

北海道大学・大学院先端生命科学研究
院・助教

研究者番号 : 30399810