

研究報告書

「モジュールの組み合わせによる光機能蛋白質の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 増田 真二

1. 研究のねらい

太陽光を適切に認識する生体システムは、地球上のほぼ全ての生物にとって必須と考えられる。生体内で光を検知する実体「光受容体タンパク質」は、固有の発色団を結合しており、その発色団が吸収する波長の光に応じて構造を変化させる。その構造変化は下流の因子によって認識され、情報が伝わり、最終的に具体的な機能をもったタンパク質の活性を調節する。近年の研究から、この光シグナル伝達機構は、タンパク質ドメイン(モジュール)の組み合わせで多様化していることがわかってきた。例えば、細菌に一般的に保存されている青色光受容体 BLUF タンパク質は、転写因子と相互作用するドメインや、加水分解酵素ドメインなど、様々なタンパク質モジュールと組合わさったかたちで天然から見つけられている(図1)。本研究では、この青色光受容体 BLUF を、様々なタンパク質機能モジュールと組み合わせることで、新規の光機能タンパク質を創出することを目指した。近年、光受容体タンパク質を改変し、様々な生体機能(例えば神経活動や細胞運動)を光で制御し解析する「光遺伝学」と呼ばれる研究が盛んであるが、ここでは、転写因子の活性を光で自在にコントロールし、生物個体の発生を時空間制御する世界初の系の構築に取り組んだ。

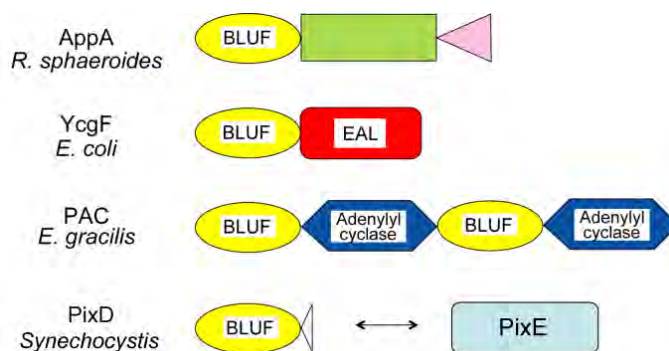


図1: 光受容 BLUF ドメイン含有タンパク質の様々な構造

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、シアノバクテリア *Synechocystis* 由来の BLUF タンパク質 PixD とその相互作用因子 PixE を用いて(図1)、真核多細胞生物内で任意の転写因子の活性を制御する系の構築に取り組んだ。まず、PixD-PixE 複合体形成の詳細を生化学的に解析した。その知見を基に、モデル生物ゼブラフィッシュの尻尾の形成に必要な転写因子 No tail の機能を光依存的に制御することに成功した。PICCORO (PixD complex-dependent control) と名付けたこの転写制御法は、個体発生の各ステップで働くホメオティック転写因子の解析に特に役立つと考えられる。

(2) 詳細

研究テーマ A 「PixD-PixE複合体形成に関する研究」

先の研究で、1) PixD は暗所において 10 量体を形成し PixE と相互作用すること、2) 光を照射すると PixD は 2 量体となり PixE と相互作用しなくなること、3) 10 量体 PixD の結晶構造、がわかっていた。しかしその相互作用の詳しい様態はよくわかっていなかった。PixD-PixE の分子間相互作用を利用した転写制御系を構築する上で、そのメカニズムを明らかにすることが必須と考え研究を行った。

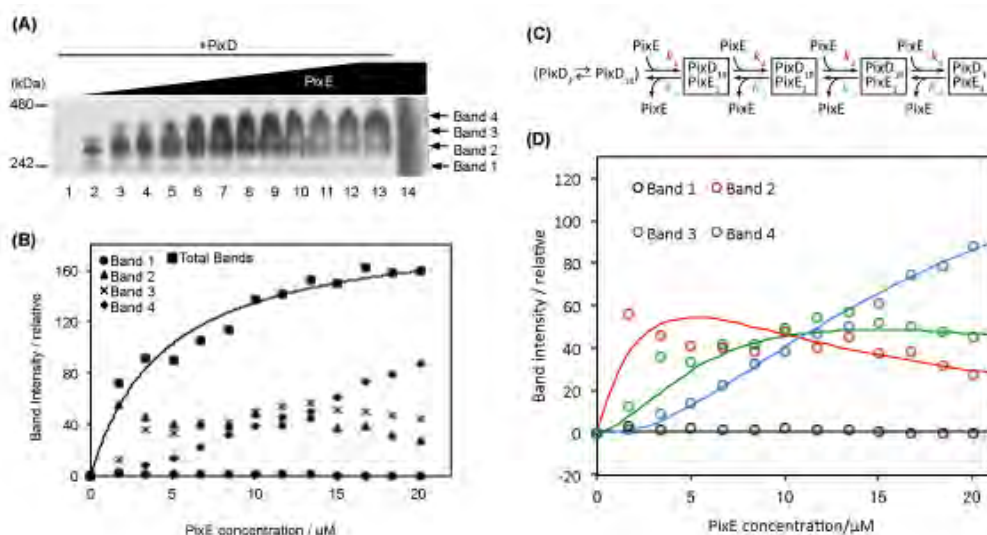


図2: PixD と PixE の複合体形成の生化学的解析

(A) 精製した PixD に PixE を加え、Blue-native PAGE 法により分離すると、PixE 濃度に依存して 4 つのバンド (Band 1, 2, 3, and 4) が観測される。分子量から 10 量体 PixD にそれぞれ PixE が 1, 2, 3, 4 分子結合した複合体とわかった。(B) バンドの濃さから、PixD-PixE 相互作用の乖離常数 (K_d) は約 5 μM と計算された。(C) PixD-PixE 複合体形成の反応スキーム。(D) 各バンドの濃さをコンピュータで解析し、速度常数 k_1, k_2, k_3, k_4 は 2000, 55555, 296, 1851 s^{-1} 、 $k_{-1}, k_{-2}, k_{-3}, k_{-4}$ は 0.002, 0.001, 0.002, 0.180 s^{-1} と計算された。

Blue-Native PAGE 電気泳動法を利用した解析により、10 量体の PixD は PixE 単量体 4 つと相互作用し、最終的に暗所で PixD:PixE=10:4 の超分子複合体を形成することがわかった (図 2)。またそれぞれの PixD-PixE 複合体の乖離常数と PixE が相互作用する速度常数を決定した (図 2)。

次に、コンピュータシミュレーションにより、PixE の予想構造を決定した。得られた PixE の構造と PixD の結晶構造を基に、ドッキングシミュレーションを行い、PixD-PixE 複合体の予想構造を決定した (図 3)。得られた複合体の予想構造は、上記生化学的解析から期待された通り PixD₁₀-PixE₄ の構造となった。また PixD-PixE の相互作用面に位置するアミノ酸に部位特異的変異を導入すると、相互作用が著しく抑制され、この構造の正しさが生化学的に支持された (論文 1)。

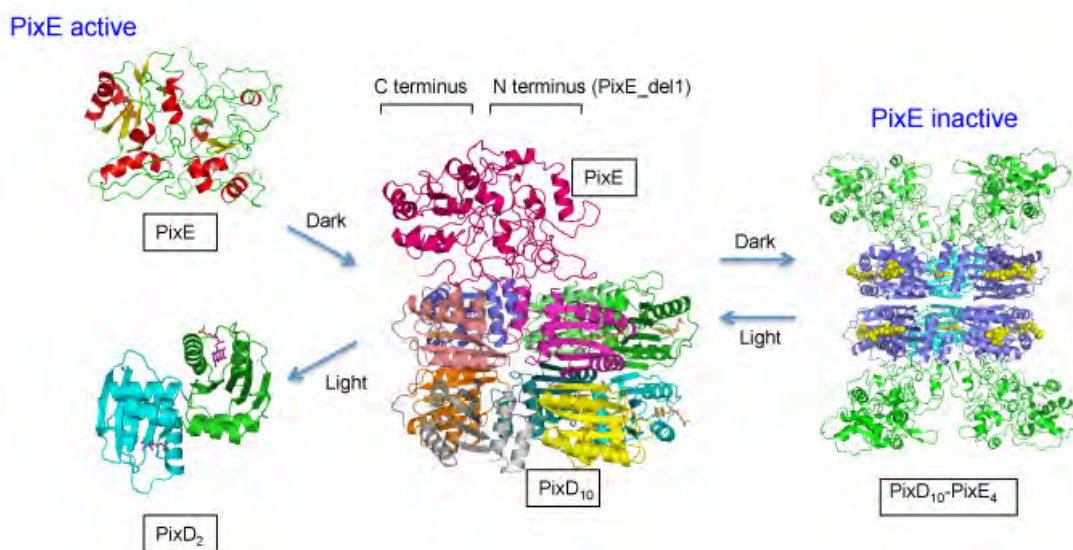


図3: PixD₁₀-PixE₄複合体形成の模式図

研究テーマB「光依存的転写因子制御系の構築」

PixDと相互作用するために必要なPixEの領域を、酵母ツーハイブリッド法を利用して調べたところ、PixEのN末端 1-276 アミノ酸がPixDとの相互作用に必要とわかった。この領域 (PixE_N) を任意の転写因子に融合させれば、光依存的にPixDと複合体を形成するようになり、その活性を調節できるのではないかと考えた (図4 A)。この方法をPICCORO (PixD complex-dependent control) と名付け、その系の構築を進めた。

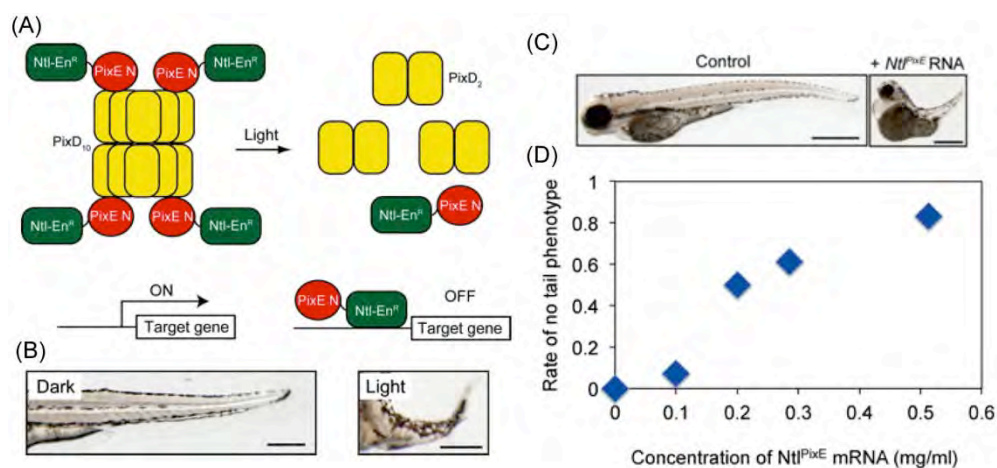


図4: 光依存的転写因子調節系 PICCORO

(A) PICCORO法の模式図。(B) PICCOROを用いて転写因子Ntl-En^Rの機能を光で制御するとゼブラフィッシュの尻尾の形成を光で制御できる。(C) Ntl^{PixE}のmRNAを胚発生期に打ち込んだゼブラフィッシュ。(D) 尻尾の形成不全率は、打ち込むNtl^{PixE}のmRNA濃度依存的である。

本研究ではゼブラフィッシュの尻尾の形成に必要な転写因子No Tail (Ntl)を利用した。ドミナントネガティブ型Ntl(Ntl-En^R)のN末端にPixE_Nを融合させたキメラ遺伝子 (*Ntl^{PixE}*) を作製し、そのmRNAをゼブラフィッシュ胚に導入したところ、尻尾の形成が阻害された(図4C)。現れた表

現型の出現率は、打ち込んだNtl^{PixE}のmRNA濃度依存的であったことから(図4D)、PixE_Nを融合してもNtl-En^Rの機能は影響を受けないことがわかった。

次にPixDを恒常的に発現する組換えゼブラフィッシュを作製し、上記組換えNtl転写因子(Ntl^{PixE})のmRNAをその胚に導入したところ、光照射下で成育させた時のみ、尻尾の形成不全が観察された(図4B)。

以上のことから、PICCORO 法を用いれば、ゼブラフィッシュの転写因子の活性を光で制御できることがわかった。

3. 今後の展開

遺伝子発現を制御する技術は、生物学の研究に必須である。現在用いられている方法の多くは、薬剤添加や熱ストレスに依存しており、誘導処理による二次的影響を排除することが困難であった。一方、光に依存した遺伝子発現系は、1)光の ON/OFF でスイッチングが可能、2)時空間分解能が高い、3)二次的影響が少ない、等の利点を有し、近年その開発が急速に進んでいる。しかし、これまでに開発された光誘導系は、ターゲットとなる遺伝子を特定のプロモータ下流に組込むため、誘導後遺伝子発現を伴う複雑な系である上、適用できる遺伝子の種類が限られる。本研究において、転写因子のDNA結合を光で直接制御する方法(PICCORO)を開発した。この方法は、遺伝子欠損で致死となる転写因子の解析を可能とし、これまで解析が困難であった個体発生の各ステップで働く転写因子の解析に、特に役立つと考えられる。

4. 自己評価

本研究は、(1)光受容体蛋白質の光シグナル伝達機構を解明する基礎的研究、(2)光依存的遺伝子発現制御系を構築する応用研究、からなる。(1)については、蛋白質分子間を移動する光シグナルの伝達経路を具体的に明らかにし、生物がどのように光のシグナルを認識、変換、伝達し、最終的に様々な細胞機能を制御しているのか、といった生物学的重要課題に対する理解を深めることができた。(2)に関しては、未だだれも達成し得なかった生物個体の発生を光で制御することに成功した。「さきがけ」というプラットフォームを利用し、ゼブラフィッシュの遺伝学等これまで経験の無い様々な研究手法を取り入れることができた。結果的に研究の幅が広がり、「発生生物学の光遺伝学」という新しい研究分野を世界に先駆け発信できる成果を得るに至った。

5. 研究総括の見解

いくつかの蛋白質の機能を組み合わせ、任意の酵素活性と遺伝子発現を自在に制御する技術の確立を目指した。これらの成果の集大成として、PICCORO と名付けた光依存的転写因子制御法を開発し、具体的応用例として、ゼブラフィッシュの尻尾を形成する転写因子に適用して光の照射により尻尾の形成不全が起こることを示すことに成功した。この手法は、個体発生のどの段階にも応用可能で、転写因子の活性を光で制御することが可能となった。この成果は、個体発

生においてどの段階で何がどう働いて発生が制御されているかという発生学における最も基本的な課題の解明に寄与できる手法を開発できたことを意味し、新しい研究フィールドを開拓したものと評価できる。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ren, S., Sato, R., Hasegawa, K., Ohta, H. and Masuda, S. (2013) A predicted structure for the PixD-PixE complex determined by homology modeling, docking simulations, and a mutagenesis study. *Biochemistry* 52: 1272–1279.
2. Ren, S., Sawada, M., Hasegawa, K., Hayakawa, Y., Ohta, H. and Masuda, S. (2012) A PixD-PapB chimeric protein reveals the function of the BLUF domain C-terminal α -helices for light signal transduction. *Plant Cell Physiol.* 53: 1638–1647.
3. Unno, M., Tsukiji, Y., Kubota, K. and Masuda, S. (2012) N-terminal truncation does not affect the location of a conserved tryptophan in the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Phys. Chem. B* 116: 8974–8980.
4. Kanazawa, T., Ren, S., Maekawa, M., Hasegawa, K., Arisaka, F., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Ohta, H., and Masuda, S. (2010) Biochemical and physiological characterization of a BLUF protein-EAL protein complex involved in blue light-dependent degradation of cyclic diguanylate in the purple bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Biochemistry* 49, 10647–10655.
5. Unno, M., Kikuchi, S. and Masuda, S. (2010) Structural refinement of a key tryptophan residue in the BLUF photoreceptor AppA by ultraviolet resonance Raman spectroscopy. *Biophys. J.* 98: 1949–1956.

(2) 特許出願

研究期間累積件数：1件

1.

発明者： 増田真二、田中幹子、中谷友紀、堀田淑坤
 発明の名称： 転写因子の機能制御方法
 出願人： 東京工業大学
 出願日： 2012/5/23
 出願番号： 特願 2012-117619

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

[国際会議の招待講演]

1. Masuda, S. “How do organisms sense light?” Asia Forum for Biological Science and Technology 2012. January 2012, Yokohama, Japan.
2. Masuda, S. “Molecular mechanisms of blue-light dependent cell signaling by BLUF proteins” The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 2010, Hawaii, USA

3. Masuda, S. “Blue light dependent cell signaling through protein-to-protein interaction by BLUF proteins” Memorial Symposium for the 25th International Prize for Biology. December 2009, Kyoto, Japan.

[国内会議の招待講演]

1. 増田真二、“光受容体を用いた転写制御法の開発”日本化学会第93春季年会、滋賀、2013年3月
2. 増田真二、“What we should we learn from BLUF proteins? Light perception and signal transduction”日本生物物理学会第49回年会、姫路、2011年9月
3. 増田真二、“Blue-light dependent cell signaling through protein-to-protein interaction”日本生物物理学会第47回年会、徳島、2009年10月

[受賞]

平成23年度東工大挑戦的研究奨励賞

[解説/総説]

1. Masuda, S. (2013) Light detection and signal transduction in the BLUF photoreceptors. *Plant Cell Physiol.* 54: 171–179.
2. 増田真二 (2011) 光合成細菌の光に依存したバイオフィルム形成機構 バイオサイエンスとインダストリー 69: 213–214.

[情報発信]

1. 平成22年11月
「細菌が光を感知する仕組みの一端が明らかに」
<http://www.hyoka.koho.titech.ac.jp/eprd/recently/research/research.php?id=75>
2. 平成23年3月
「Bacterial biofilms: Into the blue」
http://www.titech.ac.jp/bulletin/archives_category/topics/topics_211.html