

称号及び氏名 博士（理学）桂ひとみ

学位授与の日付 平成21年 3月31日

論文名 「シロイヌナズナ青色光受容体フォトトロピンの
生理機能発現に関わる LOV ドメインの分子構造
および構造変化」

論文審査委員 主査 徳富 哲
副査 多田 俊治
副査 上田 純一

論文要旨

植物は光を、光合成のためのエネルギー源としてのみならず、自身の置かれている環境を知るためのシグナルとしても利用している。フォトトロピン (phot) は青色光受容体の一つで、光屈性、葉緑体光定位、気孔開口など、光合成効率の最適化に関わる生理機能調節を担う。モデル植物の一つシロイヌナズナは、phot1 と phot2 の二種類のホモログを持ち、phot1 は弱光から中高強光域、phot2 は強光域の光センサーとして働く。但し、葉緑体運動のうち集合反応には両者が関与するのに対して、強光逃避反応は phot2 のみが仲介する。phot 分子は N 末端側に、FMN (フラビンモノヌクレオチド) を 1 分子結合して光受容を行う LOV ドメインを二つ (LOV1、LOV2 ドメイン)、また C 末端側には Ser/Thr キナーゼドメインを持ち、光により活性制御されるタンパク質キナーゼの機能を持つと考えられている。光によるキナーゼ活性制御に際して、LOV2 ドメインが主要な役割を果たし、LOV1 ドメインはその光感度調節を行うことが報告されている。LOV1 はこの他に、二量体化サイトとしての機能をもつのでは無いかと考えられている。

1、シロイヌナズナ・フォトトロピン LOV ドメインのオリゴマー構造と機能。 LOV ドメインのオリゴマー構造は、phot の機能と深い関わりがあると考えられる。これまでに、phot LOV ドメインのオリゴマー構造について複数の報告があったが、一部結果に不一致があった。そこで、大腸菌遺伝子発現系を用いて調製したシロイヌナズナ phot の 4 種類の LOV ドメインのオリゴマー構造を、グルタルアルデヒド架橋試験により系統的に解析した。その結果、1) LOV1 は、phot1、phot2 とともに二量体として存在し、光依存的な顕著なオリゴマー構造変化は見られなかった。2) LOV2 では、phot1-LOV2 は単量体と二量体が解離平衡状態にあり、濃度依存的な二量体成分の増加がみられた。既報のゲル濾過による結果と X 線小角散乱による phot1-LOV2 オリゴマー構造結果の違いはこの濃度依存性によると考えられる。青色光照射による単量体の僅かな増加が観測され、これは既報の一過性の二量体の単量体への解離反応を反映している可能性がある。3) phot2-LOV2 の大部分は単量体として存在し、青色光照射によりオリゴマー構造変化は見られなかったが、単量体の低分子量側へのバンドシフトがみられた。CD スペクトルから α -ヘリックスのアンフォールディングと β -ストランドの生成がこの変化に関与すると考えられる。LOV2 の phot1 と phot2 間のオリゴマー構造の違いは、phot1 と phot2 の機能分担に何らかの関係を持つと考えられる。

最近、シロイヌナズナ phot1 および phot2 の LOV1 結晶構造が解かれ、ともに反平行二量体構造を持ち、phot1-LOV1 は二量体化に S-S (ジスルフィド) 結合が関与しているが、phot2-LOV1 ではその関与がないことが示された。溶液中でも S-S 結合を介した二量体化が起きるかどうかを、SH 還元剤の効果で検証した。4) その結果、溶液中でも結晶中と同様な S-S 結合の二量体化への関与が明らかになった。これらの LOV1 の二量体化様式の違いは、phot1 と phot2 の光感受性の差異に何らかの関わりを持つ可能性がある。5) さらにゲルろ過を用いた実験結果から、生体内の還元的雰囲気下でも LOV1 が S-S 結合で phot1 の二量体化サイトとなり、phot1 分子が二量体として存在する可能性が示された。

2、シロイヌナズナ・フォトトロピンLOVドメインの光受容に関わるアミノ酸置換の生理機能発現への影響。 LOVドメインでは、基底状態 (D450) に存在する発色団FMNが青色光励起後、励起三重項中間体L660 を経て、FMN近傍に保存されたシステイン残基との間にアダクトを形成し、S390^I中間体を生成する。その後、タンパク質部分に構造変化が生じ (S390^{II})、さらにアダクトが解裂して再びD450に戻る。photのシグナル伝達 (キナーゼ活性の光制御) には S390^{II}生成にともなうタンパク質の構造変化が重要な役割を果たすと考えられる。これまでの研究から、光反応および構造変化に重要な役割を果たすと考えられるアミノ酸が幾つか報告されている。これらの中から2種類のアミノ酸について、それらのアミノ酸置換変異phot2遺伝子をphot1/phot2 欠損シロイヌナズナに導入した変異植物体を作成し、光屈性と葉緑体逃避運動の解析を行った。

1) Q/L変異 既報の結晶構造解析から、FMN結合ポケットを形成するβスカーフォールド中のIβ-ストランドに存在するグルタミン (Q) が、S390^I形成後のタンパク質部分の構造変化に重要な役割を果たし、キナーゼ活性制御やシグナル伝達に深く関与することが示唆されている。このQをL (ロイシン) に変異させたLOV2タンパク質は野生型と同様に光励起によりS390を形成するが、それに続くβシートとαヘリックスの構造変化が起きないことが報告されている。このQ/L変異をphot2のLOV1のみ、LOV2のみ、LOV1とLOV2の両方に導入した3種類のシロイヌナズナQ/L変異体を作成し、光屈性および葉緑体逃避反応への効果を調べた。その結果両反応ともに、LOV1変異導入ではほとんど影響を与えないのに対して、LOV2変異導入では反応性が低下し、LOV2変異導入による反応性の低下はLOV1変異導入により増幅され、phot2欠損株と同程度の反応性低下を示すことがわかった。これらからLOV2中のQ489を介する光シグナル伝達経路がphot2生理機能発現に深く関与することが示され、この経路の光感度調節へのLOV1の関与が示された。Q/L変異導入LOVドメインの光反応測定結果から、変異導入によるLOV2タンパク質部分構造変化の減少が、これに関与すると考えられる。

2) R/K変異 FMNテールのリン酸基は、アダクト形成に関与するCysのC-末端側に隣接するアルギニン (R) と塩橋を形成している。このリン酸基はキナーゼドメインとの相互作用に関与すると考えられているヘリカルコネクタ(Fα)のアルギニンとも相互作用しており、光反応にともないリン酸基周辺の環境が変化することが報告されている。前者のRのリジン (K)への置換変異を導入したphot2-LOV2タンパク質を作製してその光反応を調べたところ、アダクト形成を起こさないこと、長時間照射によりFMNが2電子還元型になることがわかった。共同研究による分子動力学モデル計算の結果、RをKに変異させると、外部からCys周辺の空間に水分子が入り込み、CysのS-Hと水素結合を形成することでFMNとのアダクト形成を阻害する可能性があるという結果が得られた。このR/K変異をQ/Lと同様にphot2に導入した3種類のシロイヌナズナR/K変異体について、光屈性および葉緑体逃避反応を調べた。結果は、定性的にはQ/L変異体の場合と似ていたが、Q/L変異の場合と異なり、LOV2変異導入による光屈性、葉緑体逃避反応の減少へのLOV1変異導入による増幅効果は見られなかった。R/K変異の影響について、1) FMNが完全還元型になりLOV2ドメインから解離して、タンパク質部分の構造が変化してLOV2によるキナーゼ活性阻害が解除される、2) LOV2ドメイン中のR472近傍の構造変化を介したシグナル伝達経路の存在、の2つの可能性が示唆された。

以上の結果から、1) phot2を介した光屈性および葉緑体逃避反応に関わる光シグナル受

容において、二つの LOV ドメインのうち LOV2 が主要な役割を果たすことが示された。これらは、これまでにキナーゼ活性の光調節機構などで報告されている結果と一致する。2) phot2-LOV2 内での分子内光シグナル伝達には、FMN のイソアロキサジン環と Q489、およびリン酸基テールと R427 との相互作用を介した二つの経路の存在が考えられ、前者の方がシグナル伝達により深くかかわっていることがわかった。

審査結果の要旨

本学位論文は、植物の主要な青色光受容体であるフォトトロピンの分子構造およびシグナル伝達に関する研究を取り纏めたものである。フォトトロピンは光屈性の光受容体として発見された後に、葉緑体光定位運動、気孔開口の光制御など光合成効率の最適化を担っていることから重要視されているタンパク質である。

全体は二章から構成されている。フォトトロピンは N-末端側に LOV と呼ばれる光受容ドメインを 2 つもち、C-末端はセリン/スレオニンキナーゼとなっており、光により制御されるキナーゼであると考えられている。二つの LOV ドメイン、LOV1 と LOV2 はこの光制御において異なる役割を果たすと考えられている。さらに本研究で使用されたシロイヌナズナには二種類のホモログ、phot1 と phot2 が存在し、光条件に依存して役割分担を行っている。

第一章で申請者は、大腸菌遺伝子発現系を用いて調製した、これら 2 種類のフォトトロピンの 2 つの LOV ドメイン、計 4 種類の LOV ドメインのオリゴマー構造を明らかにし、この情報からフォトトロピンの作用機構に関する有用な新知見を得た。さらに LOV1 に関して初めて解かれた二量体結晶構造が溶液中でも同様に存在することも明らかにしている。これらの前半結果は筆頭著者として *FEBS Letter* に、後半は共著者として *Journal of Molecular Biology* に掲載されている。特に後者は発表巻号の表紙を飾っている。

第二章では LOV ドメインが光受容後、どの様なシグナル伝達経路を経て最終的に上記生理機能の制御を行うのかを解明するために行った実験結果を報告している。具体的には強光センサーである phot2 の 2 つの LOV ドメインに、シグナル伝達に関与すると考えられている複数のアミノ酸に変異を入れた変異 LOV ドメインを作製してその光反応に対する影響を調べるとともに、同変異を導入した遺伝子組換えシロイヌナズナを 1 年半かけて作製し、光屈性および葉緑体光定位運動に対する効果を調べている。その結果、光受容から生理反応に到るシグナル伝達機構に関する重要な知見が得られたと判断される。これらの結果は、近々 *Proceedings of National Academy of Science USA* に投稿を予定している。

各審査委員は以上の博士論文を精査し、口頭質問および学力確認を行い、2 月 23 日に公聴会を開催し、この論文申請が博士の学位を授与するに足る高い内容であり、申請者が学位相当の学力を有していると判断し、博士(理学)学位を授与するを適当と認めた。