

称号及び氏名 博士（理学） 嘉祥寺谷 幸子

学位授与の日付 平成 27 年 3 月 31 日

論 文 名 植物の青色光受容体 **phototropin** の光によるキナーゼ活性化機構

論文審査委員 主査 多田 俊治

副査 藤井 郁雄

副査 徳富 哲

副査 木下 誉富

論文要旨

光生体制御科学分野

嘉祥寺谷 幸子

序論

植物は光合成効率の最適化や光障害忌避のために、光環境を感知して様々な応答反応を行う。Phototropin (以下 phot) は光屈性や葉緑体光定位運動、気孔開口、葉の展開などの応答の制御に関わる青色光受容体で、光によって活性制御されるキナーゼである (図 1)。Phot は N 末端側に光受容ドメインとして LOV ドメイン (LOV1、LOV2) と C 末端側に Ser/Thr キナーゼをもっている。LOV ドメインに非共有的に結合した FMN は、青色光により励起されると、ドメインに保存された Cys 残基と FMN の間に一過的なアダクトを形成し、熱的にアダクトが解裂して基底状態に戻るサイクル的な光反応を示す。キナーゼは青色光によって活性化される制御を受けるが、この活性制御には LOV2 が直接関わっており、LOV1 の効果は間接的であることが知られている。LOV2 によるキナーゼ活性制御機構は、次のように考えられていた。光照射によって LOV2 でアダクトが形成される (①) と、LOV2 に生じる構造変化が LOV2 に接している J α helix の構造変化を引き起こし (②)、その結果、phot のキナーゼが活性される (③)。しかし、LOV2 からキナーゼ活性制御に至る (②から③) 光によるキナーゼ活性化分子機構の詳細は不明な点が多い。

Phot によるキナーゼ活性化の分子機構を解明するために、当研究室で既に確立されているシロイヌナズナ (*At*) phot1 の A' α からキナーゼまでを含み、LOV2 によるキナーゼ活性制御が可能な最小単位である L2-Linker-STK (449-996 aa) (図 1) を用いて以下の解析をおこなった。①アダクトの形成は、紫外可視吸収スペクトルを測定することによって確認した。②J α helix 近傍の構造変化は、Trypsin 処理ペプチドマップによって調べた。さらに、

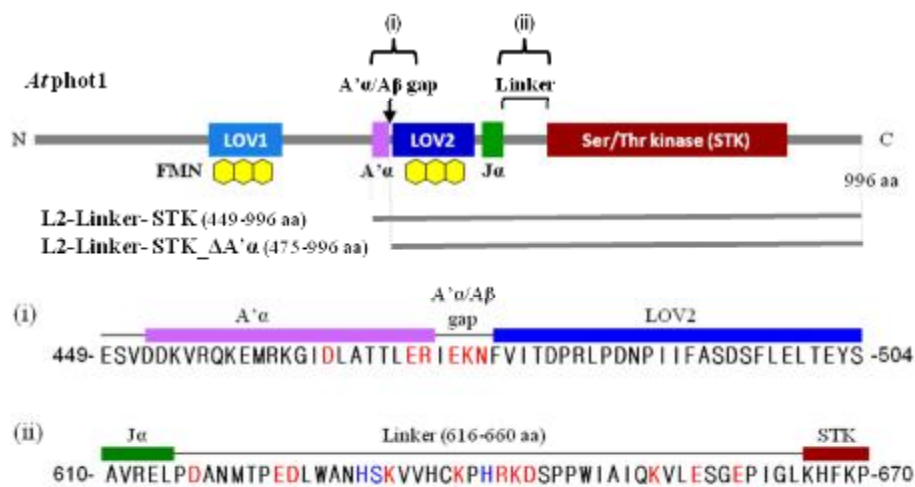


図 1 At phot1 のドメイン構造とアミノ酸置換導入部位
At phot1 のドメイン構造を示し、その下に実験に使用したコンストラクト L2-Linker-STK と A' α を切除した L2-Linker-STK_ΔA' α を示した。ドメイン構造における(i)および(ii)はそれぞれ一章と二章でアミノ酸置換した周辺領域を示し、下にそのアミノ酸配列とドメイン構造を示した。アミノ酸置換した部位は、(i)は赤、(ii)は赤 (1回目、全体への置換) と青 (2回目、中央領域への置換) で示した。

③光によるキナーゼ活性化を解析した。WT とアミノ酸置換した変異 L2-Linker-STK を比較することによって、光による phot キナーゼ活性化分子機構における A'α helix および Linker (616-660 aa) の役割を調べたので報告する。

第一章：光によるキナーゼ活性化分子機構における A'α/Aβ gap の機能

最近、単細胞性緑藻クラミドモナス (*Cr*) の phot で、LOV2 N 末端側 A'α helix 上の変異がキナーゼを恒常的に活性化し、A'α helix がキナーゼの活性制御に関わることが示唆された。*Cr* phot は分子系統的に陸上植物の phot と距離があり、またシグナル伝達経路に関しても違いが見られる。そこで、phot のシグナル伝達について知見が多くある *At* phot1 で A'α helix の解析を進めた。

L2-Linker-STK 内の A'α helix を除去した L2-Linker-STK_ΔA'α (475-996 aa) を作成した (図 1)。ΔA'α は WT と同様にアダクトを形成したが、光によるキナーゼの活性化は見られなかった。これらの結果から、シロイヌナズナの phot1 において、A'α helix は LOV2 のアダクト形成ではなく、LOV2 からキナーゼの活性化に至る分子内シグナル伝達に重要な領域であると考えられる。

次に、光によるキナーゼ活性化に関わる A'α helix 近傍のアミノ酸残基を調べるために、A'α helix および A'α と Aβ の間の領域 (A'α/Aβ gap) 上の赤字で示したアミノ酸残基を Ala に置換した (図 1)。これらの変異導入タンパク質はすべてアダクト形成を示したが、E474A と K475A は光による活性化がほぼなくなり、E471A と R472A は低いキナーゼ活性化を示した (図 2)。ペプチドマップ解析から、E474A と K475A は青色光による Jα helix 近傍の構造変化を起こすことが分かった。つまり、E474A と K475A はアダクト形成と Jα helix 近傍での構造変化には関与せず、A'α helix で得られた知見のように、LOV2 の光反応からキナーゼ活性化を導く分子内シグナル伝達において重要な役割を果たすと考えられる。さらに、E474 を Lys または Trp に置換してその影響を調べた。E474W は E474A と同様にアダクト形成を示したが、光によるキナーゼの活性化を示さなかった。これに対して、E474K はアダクト形成と光によるキナーゼの活性化の両方を示した (表 1)。これらの結果は、E474 が静電的相互作用を介してシグナルを下流に伝えていることを示唆している。

本研究では、A'α/Aβ gap 上の E474 と K475 は、光によって誘起される Jα ヘリックス近傍

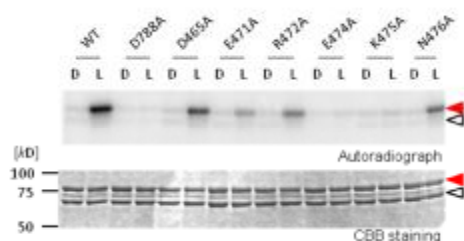


図 2 A'α helix 近傍へのアミノ酸置換が光によるキナーゼ活性化に与える影響

暗所 (D) および青色光下 (L) でのキナーゼ活性測定はキナーゼとして phot1 L2-Linker-STK (▲)、基質として phot1 の N 末端側領域 phot1 Gst-Nt-L1 (▲) を使用し、 $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ によるオートラジオグラフィによって検出した。

表 1 A'α helix 近傍への変異導入の影響

	アダクト形成①	Jαでの構造変化②	キナーゼ活性③
WT	+	-	+++
ΔA'α	+	-	-
D465A	+	-	+++
E471A	+	-	+
R472A	+	-	++
E474A	+	+	-
K475A	+	+	-
N476A	+	-	+++
E474K	+	-	+++
E474W	+	-	-
K475D/E/R	+	-	-

の構造変化に続くキナーゼ活性化に重要であることを見出した。昨年報告された *At phot1* の LOV2-J α 領域の結晶構造では、K475 の側鎖は分子内 J α helix 上の T604 と相互作用可能な位置にあり、E474 の側鎖はタンパク質表面に露出しており、phot 分子内の他の部分と相互作用できる可能性がある。A' α /A β gap 上の K475 および E474 が J α helix での構造変化を受けて、そのシグナルを別の領域に伝達すると考えられる。A' α helix 上の E471 と R472 は光によるキナーゼ活性化に影響を与えたことから、分子内で相互作用することで A' α /A β gap を間接的に適切な構造に配置

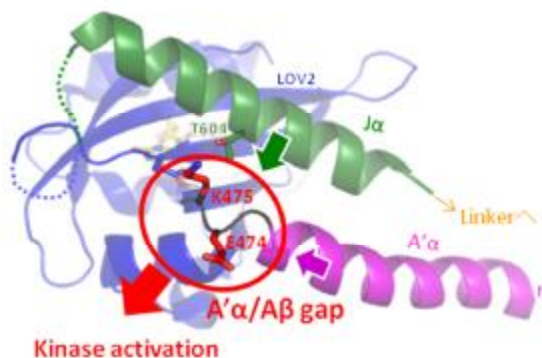


図3 A' α /A β gap を介した光によるキナーゼ活性化機構
青色光照射によるアダクト形成は LOV2 (青) で小さな構造変化を生じ、J α (緑) での構造変化を引き起こす。A' α /A β gap (赤) は J α での構造変化 (→) からシグナルを受け取り、下流に伝達して (→) キナーゼを活性化する。このシグナル伝達が適切に行えるように A' α (赤紫) が支えている (→)。

していると考えられる。FMN で受容した光シグナルは、アダクト形成に伴う LOV2 での構造変化、J α helix 近傍の構造変化を引き起こし、A' α /A β gap から下流に伝達されると考えられる。A' α /A β gap と A' α helix のアミノ酸配列は高等植物 phot において非常によく保存されており、キナーゼ活性制御のための phot での共通なモジュールであると考えられる。

第二章：光によるキナーゼの活性化におけるリンカー領域の機能

X線小角散乱による構造解析（共同研究）から、*At phot2* L2-Linker-STK は A' α -LOV2-J α とキナーゼが縦に連なった縦長の分子形状をしており、LOV2 と STK は長軸方向に連なったドメイン配置をとることが示唆された。また、青色光照射によって長軸方向への伸長を示すことが分かった（参考論文3）。*At phot1* L2-Linker-STK や *Cr phot* においても同様の構造、光依存構造変化が確認されており、分子の伸張は phot 分子共通の光依存的な構造変化であると考えられている。こうした知見は Linker 領域が LOV2-J α (A' α を含む) から STK へのシグナル伝達に関与することを強く示唆するものの、その他の知見はこれまでになかった。

Linker 領域 (616-660 aa) にある静電的相互作用できる図1中赤字で示した残基を Ala に置換した (図1)。K636A と R639A、D641A、E656A は WT と同様にアダクトを形成した。K636A は光によるキナーゼの活性化が大幅に低下し、R639A、D641A、E656A は WT と比べて低い活性化を示した。これらの光によるキナーゼの活性化に影響を与えたアミノ酸残基は、様々な植物種がもつ phot の間で保存されていないが、Linker の中央領域に集中していることから、キナーゼの活性化機構に Linker の中央領域が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

表2 Linker 領域への変異導入の影響

	アダクト形成①	キナーゼ活性③
WT	+	+++
D617A	+	+++
E623A	+	+++
D624A	+	+++
K631A	+	+++
K636A	+	-
R639A	+	++
K640A	+	+++
D641A	+	++
K650A	+	+++
E653A	+	+++
E656A	+	++
H629A	+	-
S630A	+	+
H638A	+	++

Linker 中心領域のアミノ酸残基の中で、様々な phot で保存されており、且つ水素結合に関わる H629 および S630、H638 について Ala 置換した (図 1、赤字)。全ての変異タンパク質は WT と同様にアダクト形成を示した。H629A は光によるキナーゼ活性化が大幅に低下し、S630A と H638A は WT よりもわずかに活性化が低下した (図 4)。光によるキナーゼ活性化には特に H629 が重要な役割を担っており、S630 や H638 がわずかに関与していると考えられる。

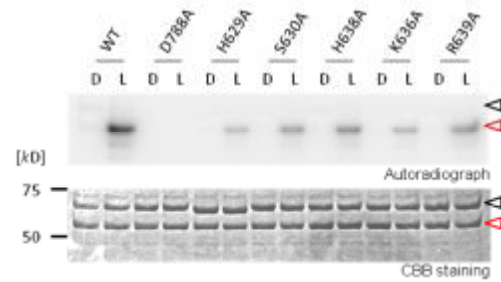


図 4 Linker 中央領域へのアミノ酸置換が光によるキナーゼ活性化に与える影響
暗所 (D) および青色光下 (L) でのキナーゼ活性測定はキナーゼとして L2-Linker-STK (Δ)、基質として phot1 His-Nt-L1 (Δ) を使用し、 $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ によるオートラジオグラフィによって検出した。

光によるキナーゼ活性化に影響したアミノ酸残基のうち、H629 から D641 までの 6 部位、残基が Linker の中央領域に集中していた。この中央領域がキナーゼの活性化に重要な役割を担っていると考えられる。二次構造予測から、Linker 領域は Helix-Loop-Helix (HLH) 構造をとると推測される。Linker の中央領域は Helix 間の Loop にあたり、自由度は高いが、N 末側および C 末側の α helix によって位置固定が可能な部位であると考えられるため、Helix-Loop-Helix はひとつのモジュール "Light-activation module (LAM)" として機能しているかもしれない。LAM は分子内シグナルを LOV2-J α (A' α を含む) から受け取りキナーゼに伝えることで、キナーゼを活性化している可能性がある (図 6)。

At phot1 で提唱した LAM を含む Linker 領域は様々な植物種の phot においてアミノ酸配列の保存性が非常に低い。しかし、*At phot1* だけでなく、ホモログ (*At phot2*) や他の植物種の phot (ソラマメ *phot1a* やオート麦 *phot1a*、ホウライシダ *phot* および *phot2*、ヒメツリガネゴケ *photA1*、ゼニゴケ *phot*) に対しても二次構造予測を行うと、Linker 領域はすべて HLH 構造をとると推測された。キナーゼ活性化における LAM を使った分子内シグナル伝達は様々な高等植物 phot の間で保存されたメカニズムであることが示唆される。

総括

phototropin は、藻類から陸上植物まで真核植物に広くみられる保存された光受容体である。植物の多様な光環境応答制御に関わることから、作用機構を理解することは大変重要である。Phot は、共通するドメイン構造として N 末端側の 2 つの光受容ドメイン (LOV1、LOV2)、C 末端側の Ser/Thr キナーゼをもつ。最近の Cr の phot の X 線小角散乱の解析から、LOV1、LOV2 と STK はタンデムに連なり、phot 全長の単量体では円筒形の分子形状をしていることが示唆された (参考論文 4)。ドメインの空間的配置から、LOV1 は間接的に STK の制御を行い、LOV2 が STK の活性調節を主に行うと考えられる。このことは、これまで報告された分子生物学的知見と一致する。その制御機構に関しては青色光照射によって LOV2 内の Cys と FMN との間でアダクトが形成されることによる LOV2 の構造変化が J α helix 近傍の構造変化を引き起こし、それが引き金となってキナーゼを活性化するというものであ

た。J α helix 近傍の構造変化からキナーゼの活性化に至る分子内シグナル伝達経路は明らかにされていなかった。本研究では、phot キナーゼの光による活性制御機構の詳細を明らかにするために、*At phot1* L2-Linker-STK を用いて LOV2 からキナーゼ活性化へ至る分子内シグナル伝達に関わる領域を調べた。その結果、A' α helix と LOV2 の A β sheet の間にある A' α /A β gap が光によるキナーゼの活性化に重要であることを示した（第一章）。さらに、Linker の LAM がキナーゼの光による活性化に重要であることを示した（第二章）。X 線小角散乱によるドメイン配置などを考慮すると、A' α /A β gap は LAM を含む Linker 領域と近接していると考えられる。LOV2 で受容した光シグナルは A' α /A β gap および LAM を介し STK に伝播され活性制御を行うと考えられる。こうした機構は phot 分子を通じて共通であると考えられる。phot の光によるキナーゼ活性化の分子内シグナル伝達は、青色光照射によって LOV2 でアダクトが形成されると、LOV2 で小さな構造変化が起こり、J α helix 近傍での構造変化を引き起こし、それが A' α /A β gap と Linker の LAM の相互作用を変化させ、LAM とキナーゼの相互作用を変化させることで、キナーゼが活性化されると考えられる。本研究の結果は、これまでに提唱された制御モデル（LOV2 が SKT の活性部位に直接相互作用し、その制御を行う）とは異なることを示唆する。

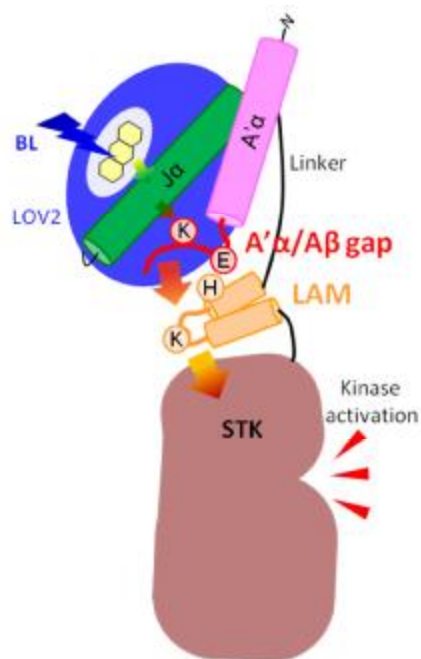


図5 光によるキナーゼ活性化の分子内伝達経路

Phot 分子では青色光照射によって FMN が励起されると、LOV2 (青) でアダクト形成と小さな構造変化が起こって J α (緑) での構造変化を引き起こし、それが A' α /A β gap (赤) と Linker の LAM (Light Activation Module) (橙) との相互作用を変化させ、LAM と STK (Ser/Thr Kinase) の相互作用を変化させて STK を活性化する。

主論文

"Essential Role of the A' α /A β Gap in the N-terminal Upstream of LOV2 for the Blue Light Signaling from LOV2 to Kinase in Arabidopsis Phototropin1, a Plant Blue Light Receptor", Sachiko Kashojiya, Koji Okajima, Takashi Shimada, Satoru Tokutomi, PLOS ONE, Acceptable after minor revision

参考論文

- 1) "Light-induced movement of the LOV2 domain in an Asp720Asn mutant LOV2-kinase fragment of Arabidopsis phototropin 2." Yuki Takayama, Masayoshi Nakasako, Koji Okajima, Aya Iwata, Sachiko Kashojiya, Yuka Matsui, Satoru Tokutomi, Biochemistry. 50(7):1174-83.(2011)
- 3) "Photosensitivity of kinase activation by blue light involves the lifetime of a cysteinyl-flavin adduct intermediate, S390, in the photoreaction cycle of the LOV2 domain in phototropin, a plant blue light receptor." Okajima K, Kashojiya S, Tokutomi S., J Biol Chem. 287(49):40972-81. (2012)
- 4) "Light-induced conformational changes of LOV1 (light oxygen voltage-sensing domain 1) and LOV2 relative to the kinase domain and regulation of kinase activity in Chlamydomonas phototropin." Okajima K, Aihara Y, Takayama Y, Nakajima M, Kashojiya S, Hikima T, Oroguchi T, Kobayashi A, Sekiguchi Y, Yamamoto M, Suzuki T, Nagatani A, Nakasako M, Tokutomi S., J Biol Chem., 289(1):413-22. (2013)

学位論文審査結果の要旨

植物にとって光環境を感知することは重要な機能である。光受容体タンパク質が物理的な光シグナルを生化学シグナルに変換することにより、植物の光応答が可能になっている。**Phototropin (phot)** は、藻類から陸上植物まで真核植物に広く保存された光受容体であり、光屈性や葉緑体光定位運動、気孔開口、葉の展開といった効率の良い光合成を行うための光応答を制御する重要な役割を担っている青色光受容体キナーゼである。

本学位論文は、部位特異的アミノ酸置換解析と生化学的解析を組み合わせることにより、**phot** の光シグナル変換機構を明らかにしようとするものである。これまでの **Phot** の構造的知見は、各ドメイン単位 (**LOV1**、**LOV2** と呼ばれる光受容ドメインやセリン・スレオニンキナーゼドメイン(**STK**)) にとどまっており、光によるキナーゼ活性化の分子機構の解明にはほど遠い状況である。

第一章では、**phot** の光応答性を有する機能部分である **LOV2-Linker-STK (449-996 aa)** を用い、**LOV2** での光反応サイクル (青色光照射でフラビンモノヌクレオチド (**FMN**) とシステイン残基の間で過渡的に共有結合が形成される) の速度とキナーゼ活性の関係を調べ、**phot** の光強度感受性が **LOV2** の光反応サイクルに影響されることを報告している。さらに、**LOV2** ドメインの **N** 末端側領域に注目し、部位特異的アミノ酸置換解析を行うことで、これまでに報告されていた構造変化 (**LOV2** での光反応によって引き起こされる **J α** ヘリックスの構造変化) の後に、シグナルが **A' α /A β GAP** に伝播されることを見出している。

第二章では、**X** 線小角散乱解析によるドメイン配置の結果に基づき、**LOV2** と **STK** の間にある **Linker** 領域に注目し、第一章と同様の解析を行った。その結果、**Linker** の中央部分に **STK** の活性制御に関わる複数のアミノ酸残基が存在することを見出している。この領域が **STK** の活性制御に関わることを示した初めての知見であり、アミノ酸配列の保存性を考慮した **Linker** 中央領域を **Light Activation Module (LAM)** と命名している。**AM** は **A' α /A β GAP** の近傍に配置されると考えられることから、**LOV2** での光反応がトリガーとなって、**J α** ヘリックス、**A' α /A β GAP**、**LAM**、**STK** と伝播することで **STK** の活性化を促すというモデルを提唱するに至っている。

上記のように、本論文は機能的な部分タンパク質を使った、生化学的アプローチによって、未解明であった植物光受容体 **phot** の各ドメインの空間配置や各部位の役割を明らかにし、分子内シグナル伝達に関する機構を提唱している。これは、特筆すべき優れた成果であり、植物のシグナル伝達機構や光受容体の研究に大きく貢献している。したがって、本学位論文審査委員会は、当該論文が博士 (理学) の学位を授与するに相当すると結論した。