The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies on the complex formation of the blue-light regulated transcription factor
Author(s)	中谷, 陽一
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69382
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　中谷　陽　　）	
論文題名	Studies on the complex formation of the blue-light regulated transcription factor （青色光制御型転写因子の複合体形成に関する研究）

論文内容の要旨

多くの生物は、青色光受容体を利用して光環境を感知し、様々な生理的応答を行っている。Aureochrome-1（AUREO1）は、黄色植物であるフシナシミドロの光屈性に関与する青色光受容体として発見された。AUREO1は、basic/leucine zipper（bZIP）ドメインと呼ばれるDNA結合領域と、そのC末側に青色を感受するlight-oxygen-voltage sensing（LOV）ドメインをもち、青色光制御型DNA結合タンパク質（転写因子）として機能していると考えられる。これまでの研究から、AUREO1は青色光だけでなく酸化還元環境にも応答することが示唆されている。生体内のような還元的環境下では、AUREO1は単量体として主に存在し、青色光を受容することで二量体化して、DNAの標的塩基配列（TGACGT）に結合すると考えられる。しかしながら、こうしたAUREO1の光依存的な複合体形成は、定量的に理解されていない。また、光依存的な複合体形成を可能とするAUREO1の分子機構は明らかになっていない。そこで本研究では、青色光制御型転写因子の複合体形成の定量化と分子機構の解明を目的として、酸化還元環境に対する応答性をなくしたAUREO1の機能領域（Photozipper（PZ）と呼ぶ）を用いて以下の解析を行った。

まず、青色光に起因する二量体化の分子機構を解明するために、N末端側を徐々に短くした3種類の組換えタンパク質を新たに作製し、明暗状態における単量体-二量体平衡の定量化を行った。動的光散乱法（DLS）およびサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）測定により、暗状態ではロイシンジッパー（ZIP）領域が存在すると解離定数は約100 μM に増大し、単量体が安定化することを明らかにした。この結果から、暗状態においは分子内でのLOV/ZIP間相互作用が働いていることが示唆された。一方、明状態においては、分子間でLOV/LOVとZIP/ZIPが相互作用することにより、解離定数が約150nMにまで低下することを蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）測定より決定した。したがって、LOV領域とZIP領域の協働的な相互作用により、二つの安定状態を切り替える光スイッチとして機能できることが示唆された。

次に、DNAとの光依存的な複合体形成を理解するために、明・暗状態におけるPZとその部位特異的変異体のDNA結合をゲルシフトアッセイ（EMSA）により定量した。標的配列に対するPZの親和性は、青色光照射により10倍以上増加し、明状態の50%効果濃度（EC_{50}）は約40 nMであった。対照的に、分子間で架橋することで二量体化させた変異体PZ-S_2Cは、光条件に関わらず標的配列に対して高い親和性（EC_{50}～8 nM）を示した。また、ZIP領域の159番目のグルタミン酸（Glu159）と164番目のリジン（Lys164）の置換は、特異配列に対する親和性を減少させた。Glu159とLys164は、ZIP間において塩橋を形成し、二量体・DNA複合体を安定化させていることが示唆された。これら部位特異的変異体の解析をもとに明・暗状態におけるPZ-DNA平衡の４つの解離定数を決定した。この結果より、標的配列に対する親和性を増加させる主な要因が、青色光に起因するタンパク間相互作用の変化であることが示唆された。

最後に、PZのDNA結合ドメインを別の転写因子であるMaxに置換し、光依存的な複合体形成に与える影響を調べた。Maxは、basic/helix-loop-helix/leucine zipper（bHLH-ZIP）型の転写因子の一種であり、二量体を形成してE-box（CACGTG）と呼ばれる標的配列に結合することで細胞周期などに関与する遺伝子の発現を調節している。ここではPZとMaxの融合タンパク質MaxPZを作成し、機能評価を行った。融合位置を変えた６種類のMaxPZのうち、71番目の位置で融合したMaxPZ L1-3のみが暗状態で単量体化し、光依存的に二量体化してE-boxに結合した。変異体による解析から、71番目のイソロイシン（Ile71）は、helix-loop-helix（HLH）領域の二量体の安定性に貢献していると考えられた。特に、71番目のアミノ酸をメチオニンへと置換した変異体は、青色光によりE-box対する親和性を5.2倍増加させた。さらに、円偏光二色性（CD）測定により、作成したMaxPZの二次構造を比較した。CDによる解析の結果、DNA結合領域の二量体の親和性は、明状態のLOV領域よりも弱いことが示唆された。青色光制御型MaxPZ（およびPZ）のDNA結合ドメインは、LOV領域の二量体やDNAとの相互作用により、安定的な二量体コイルドコイル構造を形成すると考えられる。

本研究の結果から、青色光制御型転写因子とDNA間の平衡状態と、光依存的な複合体形成を実現するLOVドメインとDNA結合ドメインの協働的な相互作用が明らかになった。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　中谷　陽一　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	中嶋　悟
	副 査　教授	佐々木　晶
	副 査　教授	近藤　忠
	副 査　教授	高木　慎吾
	副 査　教授	梶原　康宏

論文審査の結果の要旨

Light-Oxygen-Voltage sensing (LOV)ドメインは，細菌から植物など様々な生物のタンパク質中に見られ，青色光センサーとして働く．Aureochrome-1（AUREO1）は，LOV ドメインと DNA 結合領域 bZIP ドメインの二つの機能領域を持ち，青色光応答性 DNA 結合タンパク質(転写因子)として機能すると考えられる．これまでの研究では，還元的環境下では AUREO1 は単量体として主に存在し，青色光を受容することで二量体化して，標的塩基配列（TGACGT）を含む DNA と複合体を形成することを定性的には示している．しかし，一般的に DNA 結合領域 bZIP ドメインのみでも二量体化して DNA に結合する能力を持つ．また，多くの LOV タンパク質は酵素などの活性部位を LOV の C 末側に持つが，AUREO1 は逆に LOV の N 末側に bZIP ドメインを持つ．そこで，LOV ドメインが，N 末側にある bZIP ドメインの活性，DNA 結合をどのように光制御しているかは明らかになっていない．

中谷陽一氏は，AUREO1 の光依存的な複合体形成を可能にする分子機構を明らかにするため，酸化還元環境に対する応答性をなくした AUREO1 の機能領域（Photozipper (PZ)と呼ぶ）を用いて以下の解析を行なった．

まず，青色光に起因する二量体化の分子機構を解明するために，N 末端側を徐々に短くした組換えタンパク質を新たに作製し，明・暗状態における単量体–二量体平衡の定量化を行った．この結果から，ロイシンジッパー(ZIP)領域が存在すると暗状態では単量体が，明状態では二量体が安定化した．PZ が二つの安定状態を切り替える光スイッチとして機能するには，LOV ドメインだけでなく ZIP 領域が必要であることが示唆された．

次に，DNA との光依存的な複合体形成を理解するために，PZ の DNA への結合性をゲルシフトアッセイ(EMSA)により定量した．PZ は，青色光照射により特異配列への結合性を約 10 倍増加させた．部位特異的変異体の解析より，ZIP 領域における塩橋（Glu159–Lys164）の形成が，二量体・DNA 複合体を安定化させていることが示唆された．さらに，明・暗状態の PZ–DNA 平衡の 4 つの解離定数を決定した．この結果より，標的配列に対する親和性を増加させる主な要因が，青色光に起因するタンパク質間相互作用の変化であることが示唆された．

以上のように，中谷陽一氏は，PZ–DNA 平衡を定量化することで，LOV と ZIP 領域の分子内・分子間相互作用の切り替えが，AUREO1 の光依存的な複合体形成を実現していることを明らかにした．これらは，青色光受容タンパク質の DNA への結合性を定量的に明らかにし，またその分子機構を解明したものである．

よって，本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める．