

Light-dependent Structural Change of Chicken Retinal Cryptochrome4

Ryuji Watari, Chiaki Yamaguchi, Wataru Zemba, Yoko Kubo, Keiko Okano, and Toshiyuki Okano

J. Biol. Chem. **287**, 42634–42641 (2012)

doi:10.1074/jbc.M112.395731

ニワトリ網膜におけるクリプトクロム4の光依存的な構造変化

渡隆爾、山口千秋、前場航、久保葉子、岡野恵子、岡野俊行

【本論文のポイント】

クリプトクロム4は、青色光受容分子としての特徴をもつが、生理機能は不明である。これまでの研究で、ニワトリのクリプトクロム4が青色光を受容する発色団結合部位をもち、網膜や松果体といった光受容器官に発現していることを明らかにした。本研究では、網膜における詳細な局在を mRNA およびタンパク質レベルで調べた。その結果、網膜の多数の細胞群に発現していることがわかった。また、カルボキシル末端領域を認識するモノクローナル抗体との結合が光条件によって変化したことから、クリプトクロム4は光受容的に構造変化をすると推定され、青色光センサーもしくは光駆動型の磁気センサーとして機能している可能性が示唆された。

【概要】

動物には、多様な種類のクリプトクロム (CRY) があり、その一部は、概日時計、概日光受容体、および光依存的磁気受容体の核となる要素として機能する。哺乳類以外の脊椎動物には、概日時計遺伝子 *Cry1* および *Cry2* に加えて、*Cry4* 遺伝子が存在する。ニワトリのクリプトクロム4 (cCRY4) の分子機能は未知であるが、青色光を受容する発色団であるフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)の結合ドメインをもち、光受容組織である松果体や網膜に高発現しているため、光を受容する可能性がある。そこで本研究では、発現細胞の解析と光依存的な構造変化を解析した。

まず、cCRY4のタンパク質発現を調べるために、CRYカルボキシル末端伸長領域 (CCE 領域: Asp⁴⁷⁰-Thr⁵²⁹) に対するポリクローナル抗体を作製し、Western blotを行なったところ、ニワトリ網膜でのタンパク質発現が見られた。次に、mRNAの組織内局在を知るために、*in situ* ハイブリダイゼーションを行なった (図1)。その結果、c

Cry4 が視細胞層、内顆粒層 (INL) および網膜神経節細胞層 (RGC) で転写されていることがわかった。

そこで次に、cCRY4のCCE領域に対するモノクローナル抗体を多数作製し、免疫組織化学的解析によりタンパク質局在を調べた。その結果、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果と一致して、視細胞・内顆粒層・網膜神経節細胞層において、cCRY4免疫陽性細胞が見られた (図2)。

これらの結果は、cCRY4が網膜で光を受容している可能性を示している。特に、鳥類において、光駆動型の地磁気のセンサーが網膜に存在するのではないかというモデルが提唱されていることと、ニワトリにも地磁気受容能があるという報告を併せると、cCRY4が地磁気センサーである可能性を示唆する興味深い結果である。

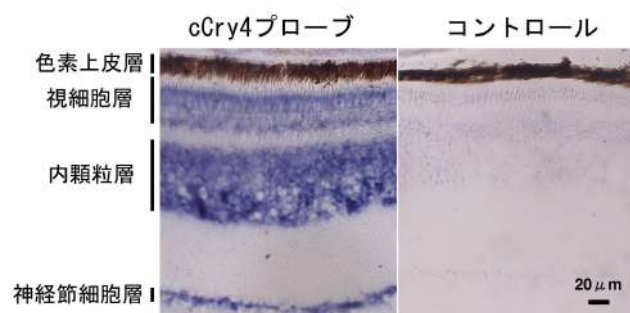


図1 ニワトリ網膜におけるCry4mRNAの発現 (in situ hybridization)

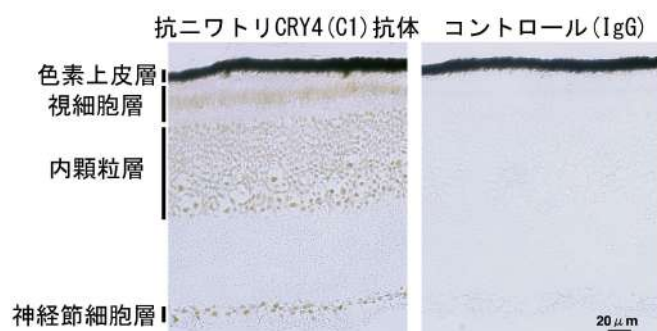


図2 ニワトリ網膜におけるCry4タンパク質の発現 (免疫組織化学)

抗体を用いた Western blot 解析において cCRY4 は網膜の水溶性画分に見出された。さらに興味深いことに、免疫沈降実験^{※1}において、C1mAb を用いた際の沈降効率が光条件に依存して変化した。この際、C1mAb は暗状態の cCRY4 と強く結合しており、免疫沈降後の沈殿に青色光を照射すると、cCRY4 が上清に遊離した。この反応は光の強度に依存して増加すること、さらに、近紫外光や青色光では遊離反応が見られるが、赤色光では見られないことがわかった (図 3)。この結果と、おそらく cCRY4 が FAD を結合して近紫外～青色光領域に吸収特性をもつことを考え併せると、光受容に伴って cCRY4 に構造変化が生じ、抗体の結合部位に抗体がアクセスできなくなったというモデルが考えられた (図 4)。

C1mAb は、CCE 領域の中の 14 アミノ酸配列 (QLTRDDADDPMEMK) に結合する。この結果から、この 14 アミノ酸に含まれる領域が、おそらく構造変化した N 末端側の発色団結合部位などと相互作用し、その結果、抗体から外れて上清中に放出されると考えられる。この実験では、精製した cCRY4 タンパク質を使っておらず、cCRY4 を含むタンパク質を網膜から取り出して沈降させているので cCRY4 以外のタンパク質が光を受容した可能性や、光刺激によって抗体と CCE の結合を変化させた可能性が否定できていない。(この点は、本論文の後に組換えタンパク質を用いた解析[Mitsui et al., 2015]で証明された。)

以上の結果は、cCRY4 が光依存的にカルボキシル末端領域を含めて可逆的に構造変化し、網膜において短波長感受性の光受容体または磁気受容体として作用することを示唆している。

[要約作成：塩川優人、岡野俊行]

【語句の説明】

※1 免疫沈降実験：抗体と反応するタンパク質およびそのタンパク質を含む複合体を分析する手法の一つ。抗体と反応するタンパク質を含む混合物と抗体を混合し、一定時間反応させた後、抗体と特異的に反応する Protein G 固定化ゲル等を混合して複合体を液相から沈降させて分離する。分離物中に含まれるタンパク質を、イムノブロット法や質量分析法などによってさらに分析し、目的タンパク質自身や相互作用タンパク質の性状解析を行う。

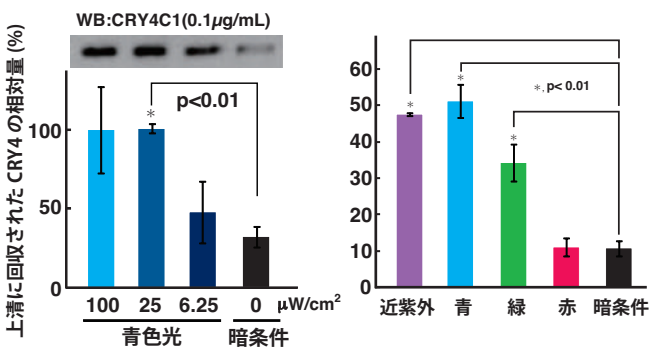


図 3 網膜より免疫沈降した CRY4 は短波長光依存的に C1 抗体から遊離する

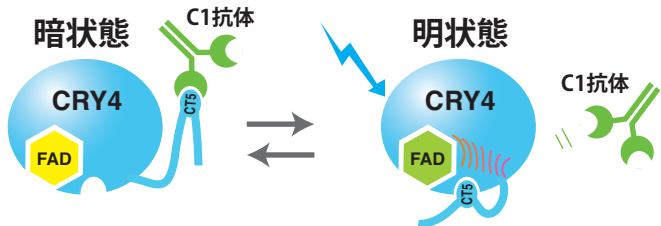


図 4 CRY4 と抗体の光依存的な解離から想定される分子構造変化のモデル