

Overexpression in Yeast, Photocycle, and *in vitro* Structural Change of an Avian Putative Magnetoreceptor Cryptochrome4

Hiromasa Mitsui, Toshinori Maeda, Chiaki Yamaguchi, Yusuke Tsuji, Ryuji Watari, Yoko Kubo, Keiko Okano, and Toshiyuki Okano

Biochemistry 54, 1908–1917 (2015)

doi:10.1021/bi501441u

鳥類磁気受容体候補分子であるクリプトクロム4の酵母を用いた発現と光反応サイクルおよび構造変化

三井広大、前田俊徳、山口千秋、辻悠佑、渡隆爾、久保葉子、岡野恵子、岡野俊行

【本論文のポイント】

先行研究の少ない脊椎動物のCRYの一つであるニワトリクリプトクロム4 (cCRY4) に関して、光依存的な立体構造変化と発色団の酸化還元サイクルの関連を見出すため、出芽酵母を用いた発現系を構築した^{*1}。精製^{*2}したcCRY4の分光学的・生化学的解析の結果、光反応サイクルおよび光による構造変化を明らかにした。本研究以前には、ニワトリ網膜においてクリプトクロム4が光依存的に構造変化することが示唆されていたが、試験管内で独立して光依存的に構造変化することが明らかとなった。

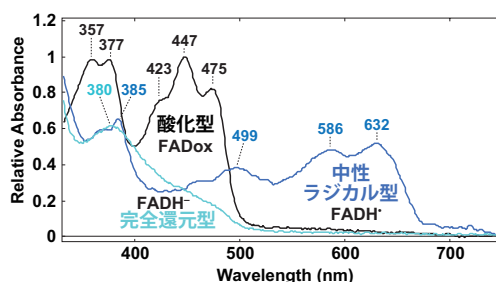
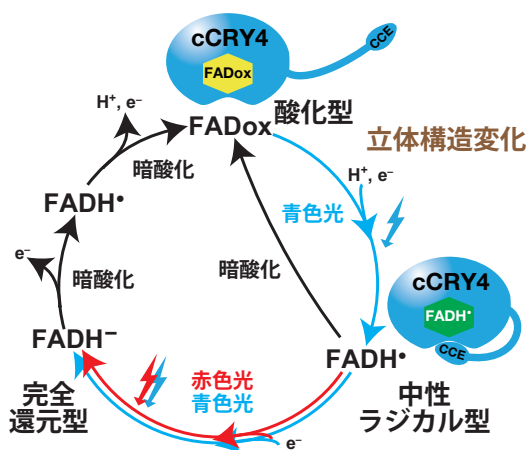
【概要】

ニワトリクリプトクロム4 (cCRY4)はニワトリ網膜や松果体に高発現する機能未知分子である。我々はこれまでに、網膜水溶性画分に含まれるcCRY4が青色光を照射に伴い構造変化することを見出した[Watari et al., 2012]。本研究では、cCRY4が直接光を受容するかどうかを検証するため、培養細胞中での発現を試みた。その結果、出芽酵母 MaV203 を用いて大量発現し、さらに生化学的に精製する系を確立することができた。精製タンパク質を用いた紫外可視分光解析の結果、暗条件下ではcCRY4には発色団として酸化型のフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD_{ox}) が結合していることが判明した。さらに青色光を照射すると、ニュートラルラジカル型 FAD (FADH[•]) に変化し、続けて青色光の照射を行うと FAD は二電子還元型 (FADH⁻) となった。その後、暗条件下に置くと、酸化されて FAD_{ox} に変化した。また、FADH[•] 結合型 cCRY4 に赤色光を照射した場合に、FADH[•] から FADH⁻ への遷移が確認された。これらの結果より、cCRY4 に結合した発色団 FAD は図のような光依存的な酸化還元サイクルを有すると考えられた。

我々が作製した C1 モノクローナル抗体は、cCRY4 の C 末端領域を認識するが、興味深いことに暗状態の cCRY4 と強く結合するが、明条件では光依存的に親和性が低下する(Watari et al., 2012)。この結果から、cCRY4 の C 末端領域は暗状態では抗体が反応しやすい状態にあるが、光依存的な構造変化に伴って抗体が反応しにくい状態となると考えられた。これを踏まえ、C1 抗体による cCRY4 の免疫沈降により、今回同定した光反応サイクル中のどの反応中間体において立体構造が変化しているのかを調べた。その結果、FAD_{ox} から FADH[•] に還元される過程で C 末端領域を含めた構造変化が生じていることが推測された。

CRY4 は、ニワトリでは網膜や松果体に高発現しているが、ネッタイツメガエルやゼブラフィッシュでは卵巣に高発現している。こ

ニワトリクリプトクロム4の光反応サイクルと光反応中間体



のように、局在が生物ごとに異なっていることから、CRY4 は細胞または生物単位で異なる機能を有する可能性がある。

本研究において、クリプトクロムの酵母発現が可能となったことから、変異体の解析などを通して、光や磁気を受容機構の分子レベルでの解析が可能となった。

[要約作成：田口和弥、岡野俊行]

【語句の説明】

※1 発現系の構築：目的のタンパク質を得るためには、まず目的のタンパク質情報がコードされた mRNA 分子の DNA コピーである cDNA をベクターに挿入し、そのベクターを大腸菌や酵母などの宿主に導入して目的のタンパク質を発現させる。

※2 精製：発現系により得られる成分には、非目的のタンパク質や不純物が大量に含まれている。これらの夾雑物を取り除き、目的タンパク質のみを分離するのが精製操作である。この操作では一般的に、タグと呼ばれる比較的分子量の小さなタンパク質を目的タンパク質に融合させて発現させ、タグと特異的に結合する分子を固定化したゲルを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより目的タンパク質を分離する。