

令和元年5月9日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15076

研究課題名(和文)光遺伝学による細胞内のセカンドメッセンジャー分子の制御

研究課題名(英文)Molecular mechanism of photoactivation of a light-regulated adenylylate cyclase in cell

研究代表者

大木 規央(Ohki, Mio)

横浜市立大学・生命医科学研究科・特任助教

研究者番号：10791361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：光活性化アデニル酸シクラーゼは、情報伝達物質(cAMP)の生産を光で制御できる生体タンパク質で、生体内での光スイッチとして医学的な応用が期待される分子である。また、ランソウ由来の光活性化アデニル酸シクラーゼ(OaPAC)における原子レベルでの構造・機能解明に成功した(PNAS, 2016)。本研究では解明されたOaPAC光活性化メカニズムの構造科学的解明を基に、細胞内セカンドメッセンジャーにおける光制御の応用展開、酵素ドメイン改変によるcGMP光産生酵素の創出や脳病変発生などによる発生の学的疾病の機構解明、さらに光遺伝学による神経回路形成疾患などの医療への基礎医学的研究を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光活性化アデニル酸シクラーゼ(PAC)は特性解明や生物機能光制御への展開も提唱・実行されており、また藍藻由来のPACである、OaPACの立体構造解明に成功し、光活性化機構に関する構造生物学的な研究は本研究グループが先駆的に積み上げてきた。

近年、「光遺伝学」が急速に普及し、OaPACによるcAMPを介する生体機能光制御は、光発生医学現象の制御・解明・治療・創薬スクリーニングという広大な新分野の開拓を先導かつ独創的な新領域の研究分野であると言える。本研究により今後、構造生命科学的解析を基盤として、優れた特性の改良型OaPACの創出とそれに基づく広範で多彩な応用展開につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Optogenetics is a rapidly growing field in which light is used to control biological systems. We show that *Oscillatoria acuminata* photoactivated adenylylate cyclase (OaPAC) protein produces the fundamental second messenger cyclic-AMP (cAMP) in response to blue light, is stable and functional in different mammalian cell types, and can be used to trigger events by raising cAMP level. OaPAC consists of a catalytic domain controlled by a photosensitive blue light using flavin (BLUF) domain. We have solved the crystal structure. Based on structural elucidation of the OaPAC activate mechanism, application development of light control second messenger in cells, development of cGMP production enzyme by adenylylate cyclase domain modification and aiming for basic medical research to medical treatment such as neural circuit formation disease by optogenetics.

研究分野：構造生物学

キーワード：光遺伝学 構造生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命現象を人為的に制御しつつ、機構解明や光によるメディカル的な治療にまで到達する方法には薬剤や放射線など種々あり、また多くの医学的現象について分子生物学手法により責任遺伝子や責任タンパク質が解明されているが、非侵襲的かつ時間的・空間的・さらには細胞や組織特異的な光による制御手段としては一長一短である。本研究の目指す、藍藻(ランソウ)由来の生物光センサー分子 OaPAC やその改変 OaPAC タンパク質の応用による細胞内セカンドメッセンジャー cAMP を中心に cGMP を光で制御する手法の確立は、これらによる特異的遺伝子発現制御などを介した血管新生・脳疾患・記憶・神経ネットワークの形成など、広範な発生・分化的メディカル現象の機構において切れ味のよい解明と、それを踏まえた革新的な治療法あるいは薬剤スクリーニング法の開拓につながる、極めて有望な方向である。また、欧米主導の光センサー分子チャンネルロドプシンによる、神経系イオン電流を介しておこなう活動電位のみを光制御手法とは相補的、あるいははるかに広範多様な現象の制御をつかさどる、広大な新規分野の光科学展開を先導する重要性があると考えている。

光活性化アデニル酸シクラーゼ(PAC)は、動物・植物で普遍的な情報伝達物質(cAMP)の生産を光で制御できる生体タンパク質であり、生体内での光スイッチとして医学的な応用が期待される分子である。光活性化アデニル酸シクラーゼは、最初にミドリムシから発見され以後、複数の原核生物からも相同遺伝子が見出されていたが、いずれも原子レベルでの構造・機能解明までには至っていない。本申請者はランソウ由来の *Oscillatoria* から見いだされた光活性化アデニル酸シクラーゼ(OaPAC)を大腸菌から単離精製、結晶化・構造解析に成功し、世界初の光活性化アデニル酸シクラーゼ機構を原子レベルにおいて解明に成功した(PNAS, 2016)。その結果、従来予測しえなかったタンパク質の光活性化メカニズムが明らかになった。また、光遺伝学(optogenetics)ツールを用いて、青色光によるヒト細胞内 cAMP 制御や、光操作によるマウス海馬の神経細胞軸索における分枝・伸長を試み、著しい軸索の伸長促進誘導に成功した。この研究成果は国内の新聞(日刊工業新聞 2016年5月31日)でも大きく取り上げられ、社会的にも大きな期待が持たれており、社会に貢献できる成果であることを示している。

2. 研究の目的

OaPAC タンパク質は分子量4万程度のコンパクトな酵素で、全体構造はN末端側の光感知領域(BLUFドメイン)とC末端側の酵素触媒領域(ACドメイン)が分子間の強い疎水性結合により、2量体を形成している。また、BLUFドメインでは、FMN分子から光エネルギーを吸収するとその光シグナルをACドメインへと伝える。分子内における酵素活性のOn/Offスイッチ機構はClosedからOpenへの構造変化(主鎖 rmsd=2.7Å)によって調整されている。OaPACの2量体を形成する中心的な部分は、BLUFドメインの長いヘリックス3が分子間の結合を支えており、酵素活性の構造変化の経路になっている。アミノ酸23残基から形成されているヘリックス3は、典型的な両親媒性ヘリックスからなっており、従来のBLUFドメインには形成されていない構造で、PACファミリーの特徴的な構造であると確認された。詳細なOaPACの構造変化はフラビン色素に光が吸収されると、プロトンはフラビン結合部位であるGln48に伝わり、そこから対分子の第3ヘリックスに位置するLeu111の側鎖に構造変化が伝わり、さらには近傍のLeu115へと伝達される。さらに第3ヘリックス同士の交差部分でシグナルが元の分子に移り、最終的に酵素触媒領域の

金属結合アミノ酸である Asp200 まで影響が伝わり、酵素触媒領域の構造変化が起こる。これらのアミノ酸の変異体を作製して酵素活性を測定すると、OaPAC の光活性化能が消失することが確認され、光によるアデニル酸シクラーゼの活性化機構を構造学的に解明する事ができた。

本研究では、解明された OaPAC 光活性化メカニズムの構造科学的解明を基盤として、さらに細胞内でのセカンドメッセンジャー光制御への応用展開として、①色素置換による OaPAC の励起波長の改変を行う。光活性化シクラーゼによる複合的な光制御の実現に向け、分別的な複数波長の励起（マルチカラー化）を目指す。天然の OaPAC は FMN (flavin-mono-nucleotide) 又は FAD (flavin-adenine-dinucleotide) を結合するため、青色光 (440nm) にて光活性化がおこなわれる。Roseo-Flavin は FAD・FMN などの典型的なフラビン色素に比べ、吸収波長が長波長へシフトしている（吸収極大 505nm）。OaPAC の補因子を FMN から Roseo-Flavin に置換することで、長波長型 PAC の創造を目指す。

また、② OaPAC の酵素ドメイン改変による cGMP の光産生酵素の創出を目指す。cGMP は、喘息、脳障害、心臓、視覚での主要な細胞内セカンドメッセンジャーとしての役割に加え、神経細胞の形態形成では cAMP と拮抗的な作用を示すなど、特徴的な重要性をもつセカンドメッセンジャーである。天然の OaPAC 構造の活性機能は cAMP 合成酵素であるが、OaPAC の改変により cGMP 合成酵素へと創出し、光によるコントロール技術を実現する。本申請者は、アミノ酸の配列情報に構造情報を加味することで、最適な分子改変を行い、医療分野への適用に耐える、高性能で実用的な改変・光活性化グアニル酸シクラーゼを設計・作製し、光遺伝学への応用展開を目指す。

3. 研究の方法

本申請者は、OaPAC の細胞内でのセカンドメッセンジャー光制御への応用展開として、色素置換による OaPAC の励起波長の改変や OaPAC の酵素ドメイン改変による cGMP の光産生酵素の創出、酵素活性、構造解析を担当し、研究を総括する。研究連携者（池口満徳：横浜市大生命医学；小山隆太：東京大学薬学部）は細胞内でのセカンドメッセンジャー光制御、OaPAC 酵素ドメイン改変へのバイオインフォマティクス計算、光遺伝学による神経回路形成実験を担当する。OaPAC の創出、高感度化、優れた特性の改良型 OaPAC の創出とそれに基づく広範で多彩な応用展開につながる事が期待でき、医療への基礎医学的研究を目指す。

4. 研究成果

結晶化スクリーニング Kit により、結晶化条件を探索し、0.1M クエン酸ナトリウム pH5.0、10% PEG20,000 の条件で結晶を得ることができ、分光光度計を用いて OaPAC 溶液中及び結晶中における、光の有無によるフラビン吸収スペクトルの測定をおこなった。OaPAC 溶液 (Light → Dark) において、明暗条件での時分割スペクトル測定結

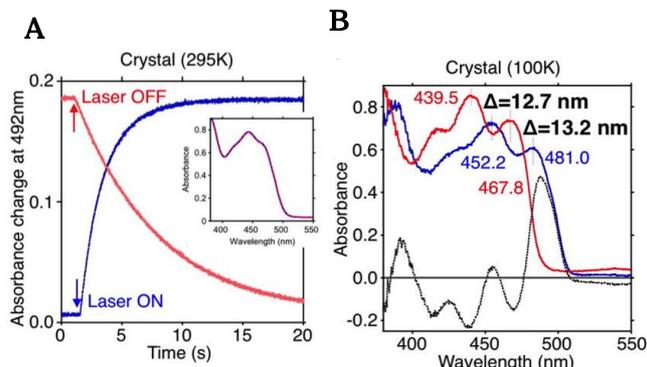


図1. 吸収スペクトル

(A) 結晶中における 492nm 吸収スペクトル

(B) 低温結晶における励起波長変化

果から、光の有無によりフラビンの吸収変化は 2 相性を示し、数秒間で中間体が現れるということがわかっている (PNAS, 2016)。

そこで今回は、405nm の青色光レーザーを 20 秒間結晶に照射した時の FMN 吸収スペクトル変化をみたところ、室温と-180 度においては、どちらもスペクトル変化を示しており、光照射後 10-15 秒ほどでフラビンが励起され、20 秒後は完全に飽和状態であることが明らかになった。また、同様に dark 状態へは 20 秒かけて落ち着く。その条件から、X 線による構造変化をとらえるために-180 度でのスペクトルを測定してみたところ、右下のような溶液とは異なった二相性を示すスペクトルを捉えた (図 1)。さらに、光活性化前後での BLUF ドメインとアデニル酸シクラーゼ (AC) ドメインの C α を重ね合わせたところ、それぞれのドメイン同士間の大きな構造変化は見られないが、BLUF ドメイン間ではわずかながら変化していることが明らかになった (図 2)。

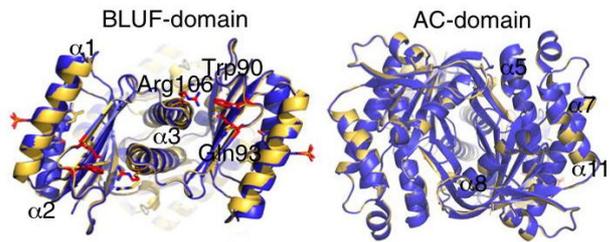


図 2. 活性の有無におけるドメイン間構造変化
黄色：明状態の構造 青色：暗状態の構造

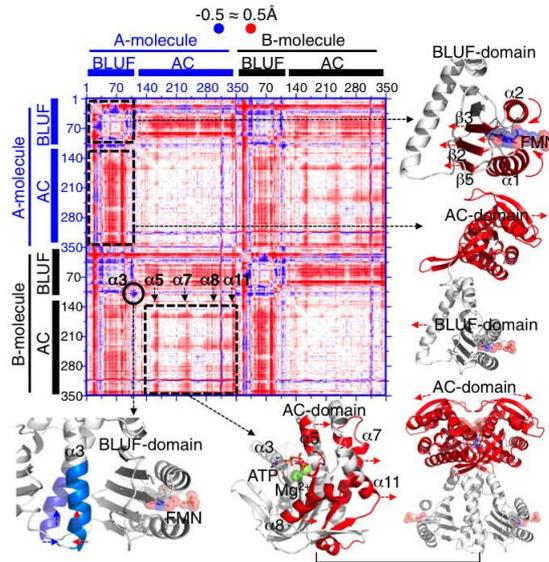


図 3. 光照射による構造変化 (DDmap 解析)
C α の動きを -0.5Å から +0.5Å の範囲で色分けし、赤色と青色は異なる方向の構造変化を示す。

さらなる詳細な構造変化を比較するために距離行列法 (distance matrix method) による解析の結果、BLUF ドメインにおいては $\alpha 1$ と $\alpha 2$ ヘリックスがフラビン分子を巻き込むようにして構造変化をしていることがわかり、 β シートは $\alpha 3$ ヘリックスに向かって押し出している変化が捉えられた。また、 $\alpha 3$ ヘリックスは上部のアデニル酸シクラーゼドメインへと押し上げている動きを示していることが明らかになった。さらに、一分子内においては、AC ドメインと BLUF ドメインが逆方向に動いていることが示された。そして AC ドメインにおいては $\alpha 5, 7, 8, 11$ ヘリックスにおいて外側に開く向きを示し、二分子間内で外側に開く向きをしていることがわかった (図 3)。

OaPAC 結晶が光により触媒的に活性化されていることを確認するため、暗条件下に調製した結晶を、5mM の ATP および 5mM の塩化マンガンを含む緩衝液に浸漬しながら光照射し、結晶中の cAMP 量を測定した。比較対照として、露光前に緩衝液から同様のサイズおよび形状の結晶を取り出し、その後の照射前後で緩衝液のみを試験した (図 4A)。その結果、光照射した結晶を含む緩衝液のみが有意な cAMP 活性を示した (図 4B)。また、ウェスタンブロットングを行うことで、結晶が実験中に溶解しないことを確認した (図 4C)。このことから、結晶状態においても青色光を照射することにより、cAMP 活性を保持しているということが明らかになった。

また、フラビン周辺の構造変化をみると、dark 状態と light 状態における Gln48 の動きがフラビンを中心としてシフトしており、水素結合ネットワークは下図のように変化してい

る(図 5)。つまり、Gln48 がシフトすることによって活性状態または不活性状態になると考え、この構造変化が非常に重要であるということが明らかとなった。このことから、FMN 周辺におけるアミノ酸との水素結合ネットワークに着目すると Gln48 の側鎖とフラビン N5 の水素結合ネットワーク形成の変化により、光エネルギーがアデニル酸シクラーゼ活性へと伝わっている機構を本研究により解明することができた。

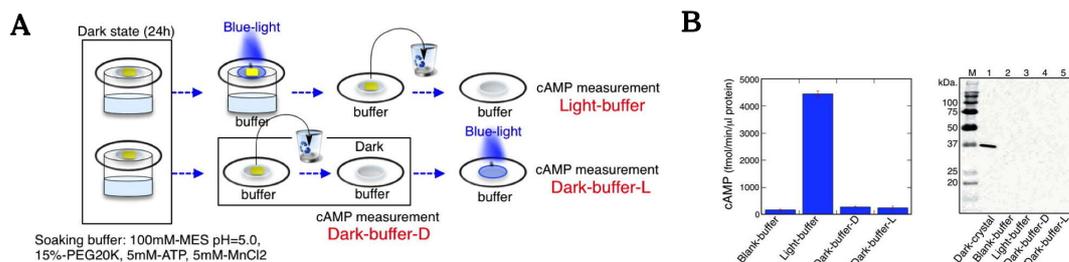


図 4. 結晶中における cAMP 活性測定
(A) 結晶中におけるアデニル酸シクラーゼ活性の検出方法 (B) 結晶中における cAMP 量測定
(C) ウェスタンブロットングにより、結晶が溶液に溶け出していないことを確認

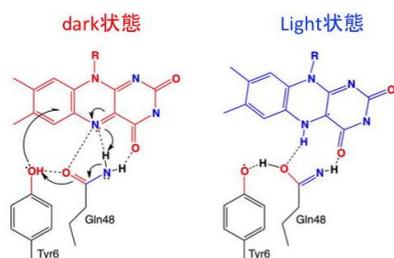


図 5. フラビン周辺の構造変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. **Ohki M**, Sato-Tomita A, Matsunaga S, Iseki M, Tame JRH, Shibayama N, Park SY. Molecular mechanism of photoactivation of a light-regulated adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017, 114(32):8562-8567.
2. Shibayama N, **Ohki M**, Tame JRH, Park SY. Direct observation of conformational population shifts in crystalline human hemoglobin. *J Biol Chem*. 2017, 292(44):18258-18269.
3. Terada D, Voet ARD, Noguchi H, Kamata K, **Ohki M**, Addy C, Fujii Y, Yamamoto D, Ozeki Y, Tame JRH, Zhang KYJ. Computational design of a symmetrical β -trefoil lectin with cancer cell binding activity. *Sci Rep*. 2017, 7(1):5943. doi: 10.1038/s41598-017-06332-7.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. **大木規央**、伊関峰生、朴三用「光活性化アデニル酸シクラーゼ合成酵素 OaPAC の活性化機構解明」*生化学*, 89(3), 458-462, 2017.
2. **大木規央**、朴三用「光活性化アデニル酸シクラーゼ合成酵素 OaPAC の活性化機構解明」*日本結晶学会*, 59, 102-107, 2017.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。