

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06166

研究課題名(和文) 新規光操作ツールの創出をめざした光活性化アデニル酸シクラーゼの機能解析と機能改変

研究課題名(英文) Function analysis and modification of photoactivated adenylyl cyclases aimed at generating a novel optogenetic tool

研究代表者

伊関 峰生 (ISEKI, Mineo)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：60414009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、光活性化アデニル酸シクラーゼ(PAC)の機能改変および新規類似タンパク質の機能解析を進めることにより、光遺伝学ツールとしての有用性を高めることを目的としたものである。最近バクテリアゲノム上に見出された16のPAC類似遺伝子について機能解析を進め、うち7つは光で活性化されるアデニル酸シクラーゼとして機能することを明らかにした。これらの中には温度感受性や最大速度の異なるものがあり、光遺伝学ツールのレパートリーを増やす意味で重要である。

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、さまざまな生体機能を光で人為的にコントロールする光遺伝学ツールとして使用可能なタンパク質である。本研究により、バクテリアのゲノム塩基配列データ上に情報としてのみ存在するPAC類似配列について機能解析が行われ、その幾つかは光で亢進されるアデニル酸シクラーゼ活性を示し、興味深い特徴を持つことが明らかになった。これは光遺伝学ツールの多様性を高めるものであり、光遺伝学的手法の応用範囲拡大につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study is aimed at enhancing the usefulness of photoactivated adenylyl cyclase (PAC) as an optogenetic tool by modification of already known PACs and functional analysis of novel similar proteins. Functional analysis of 16 PAC-like genes recently found on the bacterial genome revealed that seven of them showed adenylyl cyclase activity activated by light. Some of these differed in temperature sensitivity and maximum velocity, which leads to an increase in variety of optogenetic tools

研究分野：光生物学

キーワード：光活性化アデニル酸シクラーゼ 光遺伝学 フラビン cAMP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光で活性化されて環状アデノシンリン酸 (cAMP) を産生する光活性化アデニル酸シクラーゼ (Photoactivated adenylyl cyclase, PAC) は、原生生物ミドリムシの光回避センサーとして発見され、任意の細胞の cAMP レベルを光で人為的に制御可能な光遺伝学ツールとして注目されていた。実際、アフリカツメガエル卵母細胞やアメフラシ神経細胞など、多くの系における機能的発現が報告されていたが、構造情報が得られていないこともあって、光遺伝学ツールとしての有用性を高める機能改変は行われていなかった。その後いくつかのバクテリアや遊泳性アメーバのゲノム上に類似配列が見出され、硫黄細菌由来の BsPAC (bPAC/blaC) やシアノバクテリア由来の OaPAC は異種細胞における機能的発現が報告され、組換えタンパク質の X 線結晶構造も解明された。原子レベルの構造情報が得られたことにより、これらバクテリア由来 PAC に対する戦略的な機能改変が待たれることとなった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、構造情報に基づいて OaPAC に対して積極的な変異導入やドメイン交換などの改変を加え、オプトジェネティック・ツールとしての有用性を高めるとともに、未知の PAC 類似遺伝子の特性を明らかにして新しいツールを創出することを目指す。cAMP が関与する生命現象は極めて多岐にわたることから、本研究によって細胞内 cAMP レベルの精細な光制御が実現されれば、広範な応用が可能となり、神経科学のみならず代謝生理学や発生学、ひいては生命科学全般の発展に大きく貢献するものと期待される。

(2) 本研究で掲げる構造情報に基づいたタンパク質の機能改変というアプローチは常道ではあるが、必ずしも劇的な改変につながるとは限らない。むしろ革新的な変化は自然の中に見出されることも多く、配列情報だけでは推測できない変化が潜んでいる可能性もある。特に PAC に関しては、生物界における分布に系統的な関連性が見出されず、多様な生物群に分散して存在することから、それぞれが独自の特性を進化させている可能性があり、本研究ではゲノム上に存在する PAC 類似遺伝子を網羅的に機能解析することで、有用な材料の発掘を図る。これはある意味 PAC の比較生化学であり、PAC の進化的起源に関しても重要な手掛かりが得られるものと期待する。

3. 研究の方法

(1) バクテリア由来 PAC に対する機能改変

本研究開始直後に海外の研究グループからスピロヘータ由来の TpPAC に対する変異導入によりグアニル酸シクラーゼ活性を付与できることが報告された。しかしながら、その活性は低く、ツールとしての実用性には乏しいものと判断されたため、これをさらに改変して活性の高い光活性化グアニル酸シクラーゼの創出を試みた。まず、OaPAC の構造を鋳型として TpPAC のホモロジーモデリングを行い、動物およびシアノバクテリアのグアニル酸シクラーゼとの構造比較に基づいて、効果的な変異が期待されるアミノ酸残基を 8 箇所選定し、pCold DNA に TpPAC の人工遺伝子をクローニングして作成した発現ベクターに対して部位特異的な変異導入を行った。シークエンスを確認した後、大腸菌 DH5 α に形質転換し、細胞粗抽出液を酵素として基質 GTP を加えたバッファ中で反応 (27°C, 30 min) を行い、反応液中の cGMP をエンザイムイムノアッセイにより定量した。反応は青色光 (465 nm, 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 照射の有無で比較した。

(2) PAC 類似遺伝子の機能解析

アデニル酸シクラーゼ欠損大腸菌株の機能相補

最近公開されたゲノム塩基配列上に見出された PAC 類似遺伝子 16 種類 (図 1) について大腸菌にコドン最適化した人工遺伝子を合成し、*lac* プロモーターを取り除いた pGEM-5Zf(+) にクローニングした。これらをアデニル酸シクラーゼ欠損大腸菌株 (MK1010) に形質転換し、1% ラクトースを含む MacConkey agar に塗布して明暗条件下で培養することにより、コロニーの着色の有無で活性を評価した。すなわち、cAMP が産生されたならばラクトース代謝に伴う培地の酸性化によりコロニーが赤くなる。

大腸菌で発現・精製したタンパク質の生化学的解析

7 種類の PAC 類似遺伝子について、人工遺伝子を pCold DNA あるいは pET28(+) にクローニングして発現ベクターを構築し、大腸菌 BL21(DE3) あるいは ArcticExpress(DE3) に形質転換した。これらのベクターはいずれも N 末端側にヒスチジン・タグを付加した組換えタンパク質を発現する。定法にしたがって発現誘導・培養した大腸菌を回収し、超音波破碎後の遠心上清から金属アフィニティークロマトグラフィーによって目的タンパク質を精製した。得られた試料を用いて紫外可視吸光度測定により青色光照射時の吸収スペクトル変化のキネティクスを調べるとともに、ATP を基質として酵素反応 (27 °C, 10 min または 30 min) を行い、生成した cAMP を HPLC あるいはエンザイムイムノアッセイで定量して酵素活性を測定した。

NaPAC 触媒ドメインの活性評価

硝酸菌由来の NaPAC が特徴的に持っている Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase (Pyr_redox_2)ドメインおよび環状ヌクレオチド結合ドメイン(cNBD)部分を数種類のタンパク質発現用プラスミドにクローニングし、大腸菌 BL21(DE3)に形質転換した。定法により発現誘導・培養して目的タンパク質を可溶性画分へ回収するのに最適な発現ベクターを選択すると共に、粗抽出液を酵素としてグルタチオンレダクターゼ活性 (OxiSelect Glutathione Reductase Assay Kit)、ジスルフィドレダクターゼ活性 (DTNB)を用いて細胞破碎液中の非タンパク質性SH基を定量)、NADH デヒドロゲナーゼ活性 (DCIP の還元による A_{600nm} の低下でモニター)の有無を検討した。最適と判断された pCold TF DNA にクローニングした発現ベクターを用いて目的タンパク質を発現させた大腸菌から金属アフィニティークロマトグラフィーで目的タンパク質を精製し、DCIP の還元により NADH デヒドロゲナーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

本研究で扱ったミドリムシ由来の PAC (α, β サブユニット) および PAC 類似タンパク質の一次構造を図 1 に示す。

これらのうち、TiPAC は鞭毛虫 *Thecamonas trahens* ATCC 50062 由来の PAC で、ミドリムシ PAC と同様にフラビン結合 (BLUF) ドメインとアデニル酸シクラーゼ触媒 (AC) ドメインのタンデム構造を有することから、PAC の構造解明に役立つものと期待された。しかしながら、機能相補実験によりアデニル酸シクラーゼ活性は確認できたものの、光依存性はみとめられず、また大腸菌での発現・精製も困難であった。他はすべてバクテリア由来の遺伝子産物であり、OaPAC, PbPAC, PsPAC, PfPAC, CbPAC はシアノバクテリア由来、TpPAC, LiPAC, LbPAC はスピロヘータ由来、IcPAC は放線菌由来、ThpPAC, NaPAC, MoPAC, MtPAC はいわゆる化学合成細菌由来、他は環境サンプルのメタゲノムに由来するものである。これらのほとんどが BLUF-AC の単純な構造だが、硝酸菌 *Nitrosomonas aestuarii* strain Nm69 由来の NaPAC は BLUF-AC の N 末端側に膜貫通領域、Pyr_redox_2、cNBD の各ドメインが配置された特徴的な構造を有している。このことから、光照射によって BLUF-AC で産生された cAMP が同一分子内の酸化還元酵素を活性化する可能性が示唆され、光依存的に酵素活性を制御する新しいシステムの構築につながると期待される。そこで NaPAC に関してはアデニル酸シクラーゼ活性について評価すると同時に、Pyr_redox_2 の酸化還元酵素活性についても検討した。

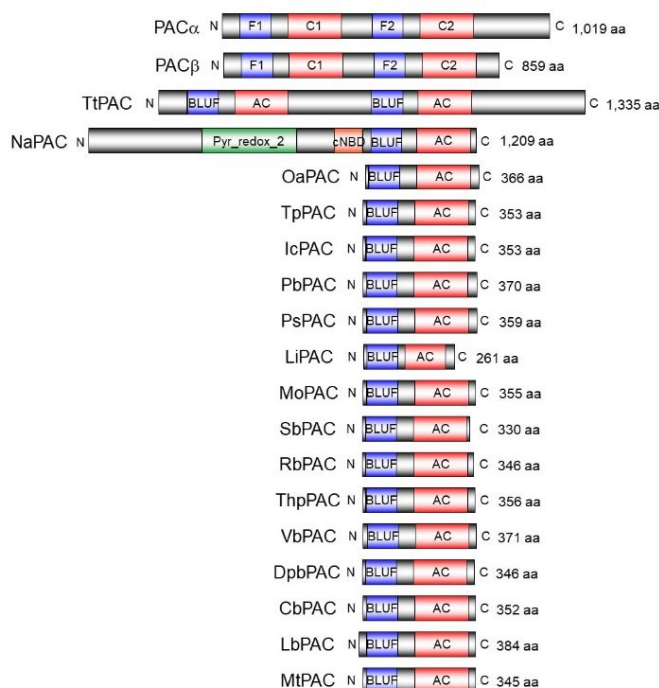


図 1 本研究で扱った PAC 類似タンパク質の一次構造模式図

(1) バクテリア由来 PAC に対する機能改変

Tanwar et al. (2018) によって報告された TpPAC (スピロヘータ *Turneriella parva* 由来) の 3 重変異体 (K196E/D264K/T266G) をベースとして、周辺アミノ酸残基を改変した計 92 種類の変異体を作成し、一次スクリーニングとして青色光照射下でのグアニル酸シクラーゼ活性を測定した。その結果、A276 に対する変異体が高い活性を示したことから、A276F, A276S, A276Y の 4 重変異体について精査したところ、この活性が光依存的であることは示されたが、残念ながら元の 3 重変異体の活性を上回るものではなかった (図 2)。

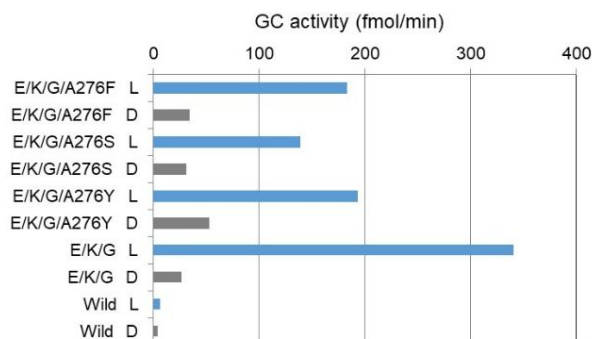
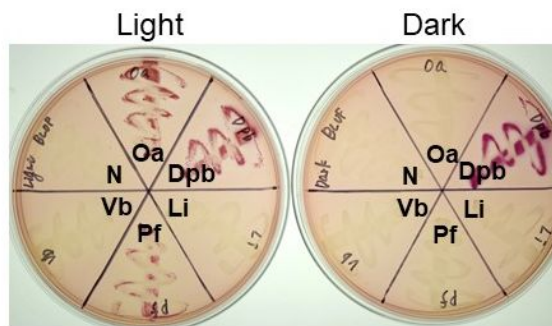


図 2 TpPAC 変異体を発現する大腸菌粗抽出液のグアニル酸シクラーゼ活性

(2) PAC 類似遺伝子の機能解析

アデニル酸シクラーゼ欠損大腸菌株の機能相補

各 PAC 類似遺伝子を挿入した pGEM ベクターで形質転換した MK1010 株を MacConkey agar に塗布し、暗黒下で 24 時間培養したもの (Dark) と 暗黒下で 7 時間培養した後、白色光照射下でさらに 17 時間培養したもの (Light) でコロニーの着色を比較した。図 3 上段に示した 25 °C の観察例のように、PfPAC (Pf) はポジティブコントロールである OaPAC (Oa) と同じく Dark では白いままで、Light では赤くなった。一方、LiPAC (Li) と VbPAC (Vb) はネガティブコントロールである OaPAC の BLUF ドメイン直後にストップコドンを入れたもの (N) と同様に、明暗に関わらず白いままであった。また、DpbPAC (Dpb) は明暗に関わらず赤くなった。25 °C の結果をこれら 3 つのパターンに分けると、明条件で赤くなり、暗条件では白いもの、すなわち光で活性化されるアデニル酸シクラーゼとして機能するものは、CbPAC, PbPAC, PfPAC, LbPAC, RbPAC, SbPAC, MtPAC の 7 種類、明暗に関わらず白いもの、すなわちアデニル酸シクラーゼ活性を全く示さないものは LiPAC, VbPAC, IcPAC, NaPAC, MoPAC の 5 種類、明暗に関わらず赤くなる、すなわちアデニル酸シクラーゼ活性を示すものの光制御が見られないものは TtPAC, DpbPAC, ThpPAC, PsPAC の 4 種類であった。これらの結果は温度条件によって変化することがわかっているため、これらのいくつかについて 23 から 30 °C の間で温度を変更して検討したところ、基本的には上述の結果と同様であったが、温度に対する感受性が異なるものもあり、たとえば MtPAC は OaPAC よりも高温で光依存的なアデニル酸シクラーゼ活性が検出された。



	23°C		25°C		27°C		30°C	
	Light	Dark	Light	Dark	Light	Dark	Light	Dark
BLUF	W	W	W	W	W	W	W	W
OaPAC	R	W	R	W	R	W	R	R
LbPAC	R	W	R	W	R	W	R	R
CbPAC	R	W	R	W	R	(R)	R	R
SbPAC	R	W	R	W	R	W	R	W
MtPAC	W	W	(R)	W	R	W	R	W
RbPAC	R	W	R	W	R	R	R	R
PfPAC	(R)	W	R	W	R	(R)	R	(R)
PsPAC	-	-	R	R	-	-	R	R
ThpPAC	R	R	R	R	R	R	R	R
DpbPAC	R	R	R	R	R	R	R	R
LiPAC	W	W	W	W	W	W	W	W
VbPAC	W	W	W	W	W	W	W	W

図 3 アデニル酸シクラーゼ欠損大腸菌株の機能相補

上段：明暗条件での観察例、下段：各温度条件での結果のまとめ。コロニーが赤ければ R、白ければ W、赤いものの不明瞭であれば (R) で表示。

大腸菌で発現・精製したタンパク質の生化学的解析 上述の PAC 類似遺伝子のうち幾つかについては大腸菌の発現系での大量発現・精製を試みた。その結果、IcPAC, PbPAC, PsPAC, ThpPAC, PfPAC, LbPAC についてはタンパク質を可溶性画分に回収して精製することができ、うち TpPAC, PsPAC, ThpPAC, LbPAC は光依存的アデニル酸シクラーゼ活性を持つことが示された。一方、TtPAC, MoPAC, NaPAC (BLUF-AC 領域) については、検討したいかなる条件でも目的タンパク質は不溶性となり、精製することはできなかった。LbPAC はクラス アデニル酸シクラーゼで良く保存されている C 末端近くのリシンを保持しておらず、活性を示さないことを予想していたが、機能相補実験において活性が検出され、精製したタンパク質でも顕著なアデニル酸シクラーゼ活性を示した。明条件での V_{max} は $800 \text{ pmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ を越えており、OaPAC ($7.4 \text{ pmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$) や ThpPAC ($77 \text{ pmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$) と比べると桁違いに活性が高い (図 4)。暗活性も高いのが注目されるが、変異導入によって改変を加えることにより、今後優れた光遺伝学ツールとして活用できる可能性がある。

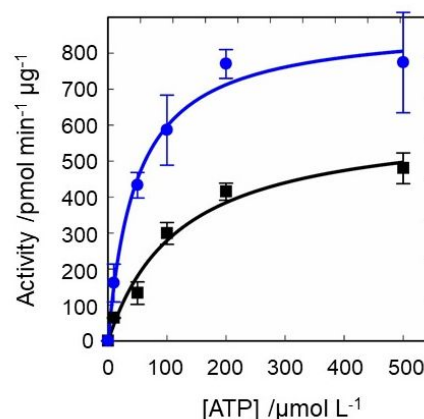


図 4 LbPAC のアデニル酸シクラーゼ活性に関するミカエリス・メンテン・プロット

青色光 (465 nm , $62 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 照射下 (青) または暗所 (黒) で 27°C , 30 min 反応させた。

NaPAC 触媒ドメインの活性評価

NaPAC の Pyr_redox_2 ドメインから cNBD ドメインまでを発現させるベクターで形質転換した大腸菌 DH5⁺ を用いて粗抽出液の酵素活性を評価した。Pyr_redox_2 は多くの酸化還元酵素に存在し、配列のみからはその基質を推定することはできないものの、ジスルフィドを還元する可能性が高いので、グルタチオンを還元するかどうかを調べたところ、活性は全く検出できなかった。

た。さらに基質を特定せず、細胞内の非タンパク質性SH基を定量することで活性評価を試みたものの、これも検出できなかった。そこで DCIP の還元を指標としてNADHデヒドロゲナーゼ活性を調べたところ、顕著な活性を検出することができた。これがcAMPによって活性調節を受けることを期待したものの、cAMP存在下での K_m は $212 \mu\text{mol L}^{-1}$ 、非存在下での K_m は $145 \mu\text{mol L}^{-1}$ であり、 V_{max} もほとんど変わらなかった(図5)。BLUF-AC部分の機能相補実験よりアデニル酸シクラーゼ活性も持たないことが示されており、NaPACの機能には謎が残されたままであるが、大腸菌での発現系にうまく適合していない可能性もあるため、今後さらなる検討を要する。

以上より、本研究によりバクテリアゲノム上に存在するPAC類似遺伝子のうち、いくつかについては光で活性化されるアデニル酸シクラーゼとして機能することが確認され、顕著に活性の高いLbPACの存在も明らかとなった。このことは生体内cAMPレベルを人為的にコントロールする光遺伝学ツールのレパートリーを増やしたことになる。また、NaPACの機能未知触媒ドメインの酵素活性検出に成功したことで、この特殊な一次構造を持つタンパク質の機能解明と新規光遺伝学ツール創出に向けての基盤が得られた。

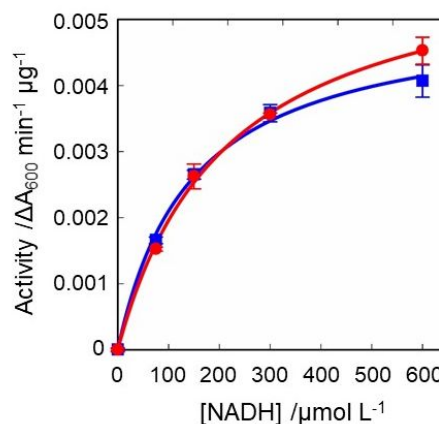


図5 NaPACのPyr_redox_2-cNBD部分組換えタンパク質のNADHデヒドロゲナーゼ活性 cAMP ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) 添加(赤)と非添加(青)で測定を行い、ミカエリス・メンテン・プロットとして示し

た。この特殊な一次構造を持つタンパク質の機能解明と新規光遺伝学ツール創出に向けての基盤が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwata T, Nagai T, Ito S, Osoegawa S, Iseki M, Watanabe M, Unno M, Kitagawa S, Kandori H.	4. 巻 140
2. 論文標題 Hydrogen Bonding Environments in the Photocycle Process around the Flavin Chromophore of the AppA-BLUF domain.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Am. Chem. Soc.	6. 最初と最後の頁 11982-11991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.8b05123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iseki M, Park SY.	4. 巻 1293
2. 論文標題 Photoactivated Adenylyl Cyclases: Fundamental Properties and Applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Adv. Exp. Med. Biol.	6. 最初と最後の頁 129-139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-15-8763-4_7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鶴岡真緒、佐藤 匠、岩田達也、伊関峰生
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Oscillatoria acuminata</i> の光運動反応
3. 学会等名 ユークレナ研究会第35回研究集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------