

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570159

研究課題名（和文） 光活性化アデニル酸シクラーゼの活性化機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the activation mechanism of photoactivated adenylyl cyclase (PAC)

研究代表者

伊関 峰生 (ISEKI MINEO)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：60414009

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）の活性化メカニズムを明らかにするとともに、その細胞工学的応用を進展させるべく企画されたものである。本研究において、硫黄細菌 *Beggiatoa* が持つ類似タンパク質（BsPAC）が大腸菌において機能発現することが示され、アミノ酸置換変異体の解析により光シグナル伝達に重要なアミノ酸残基の幾つかが特定された。

研究成果の概要（英文）：This research is aimed at elucidating the activation mechanism of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), thereby promoting biotechnological application of the enzyme. We demonstrated that a bacterial homolog of PAC from *Beggiatoa* (BsPAC) showed light dependent activity of adenylyl cyclase in *E. coli*. By analyzing the functions of BsPAC mutants, we identified several amino acid residues that have important roles for intramolecular signal transduction of the photoactivated enzyme.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：光センサー、アデニル酸シクラーゼ、cAMP

1. 研究開始当初の背景

報告者らは、単細胞鞭毛藻ミドリムシ (*Euglena gracilis*) の光感受部位から分子量約40万のフラビントタンパク質を精製し、これが青色光で活性化されるアデニル酸シクラーゼであることを示すとともに、光回避反応のセンサーとして機能することを示した (Iseki, M. et al. (2002) *Nature* 415, 1047-1051)。光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC, Photoactivated adenylyl cyclase) と名付けられ

たこのタンパク質は、互いによく似た2種類のサブユニット (PAC α , PAC β) から成るヘテロ四量体で、それぞれのサブユニットにはフラビン結合ドメイン (F1, F2) とアデニル酸シクラーゼ触媒ドメイン (C1, C2) が交互に2箇所ずつ存在する。F1, F2に類似した配列は、紅色光合成細菌の光センサーAppAや藍藻の光センサーPixD等にも存在し、BLUF (a sensor of blue light using FAD)ドメインと称されて、多くのバクテリアに存在することが知ら

られている。バクテリアの BLUF ドメインは組換えタンパク質の発現・精製が比較的容易であったため、国内外において分光学的解析ならびに結晶構造解析が精力的に行われ、光受容の初期過程についての理解は大きく進んだ。しかしながら、これらの多くは構造が単純で、他のタンパク質との相互作用を想定せざるを得ないため、光センサーとしての出力の仕組みについては殆どわかっていなかった。PAC はそれ自身がアデニル酸シクラーゼ活性という普遍的かつ明瞭な出力機能を持っていることから、光受容から出力に至るまでを総合的に検討し得る光センサータンパク質として注目されていたものの、報告者らを含め複数のグループが努力を重ねてきたにも関わらず、PAC 本来の活性を保持した十分量の組換えタンパク質は得られておらず、この分野での研究は難航を極めていた。この状況を打破するためには、より単純な PAC 類似タンパク質を使うのが早道と考えてその探索を開始し、ミドリムシ近縁種から多くのホモログを得たものの、やはり本来の活性を保持した組換えタンパク質を得ることはできなかった。一方、最近公開された硫黄細菌 *Beggiatoa sp.* のゲノム上に BLUF ドメインとアデニル酸シクラーゼ触媒ドメインを一つずつ持つ遺伝子が見出され、この配列を精査したところ、以下の3項が明らかとなった。すなわち、(1)触媒ドメインの系統解析を行うと、PAC の C1, C2 と同じクレードに属する。(2)BLUF ドメインおよび触媒ドメインが PAC の F2 および C2 に類似するばかりでなく、それらを繋ぐリンカー領域も類似している。(3)PAC においては C1 と C2 に分かれて存在する触媒機能上重要なアミノ酸残基が *Beggiatoa* では触媒ドメイン内に全て保存されており、ホモダイマーとして機能すると推定される。以上の事柄は、*Beggiatoa* の遺伝子が PAC の祖先型としての性質を備えていることを示すものであり、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期待された。しかも、原核生物由来であるため大腸菌等の発現系に良く適合し、その構造の単純さから活性の発現も容易であると考えられた。そこで本研究ではこの遺伝子がコードするタンパク質 (BsPAC と仮称する。) の構造と機能を解明することを目指した。

2. 研究の目的

本研究は、光で活性化されて cAMP を産生するユニークな光センサータンパク質、光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC) の活性化メカニズムを明らかにするとともに、その細胞工学的応用を進展させるべく企画したものである。本研究においては、PAC の祖先型と考えられる、硫黄細菌 *Beggiatoa* が持つ類似タンパク質 (BsPAC) を用いて大腸菌にお

る大量発現・精製を行い、分光学的解析ならびに酵素学的解析を行う。さらに、異種細胞において BsPAC を発現させ、光による細胞機能の制御を試みる。これらにより、生物物理学上の重要課題である光センシングの機構解明に貢献する。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌における BsPAC の大量発現・精製

BsPAC の遺伝子が見出された硫黄細菌 *Beggiatoa sp.* PS 株は培養が困難とされているため、発現のための遺伝子は外部委託の全合成により取得する。この遺伝子には両端に *BamH I* 切断部位と *Sal I* 切断部位を導入しておき、大腸菌用の発現ベクター (pET, pCold, pGEX 等) にクローニングする。これらで BL21 株等の大腸菌を形質転換して、定法により発現を行う。pCold や pGEX 等の可溶性発現を意図したコンストラクトについては、発現させた大腸菌の可溶性画分からアフィニティクロマトグラフィーでタンパク質を精製し、紫外/可視吸光分析によりフラビン結合性を評価する。一方、pET ベクターを用いたコンストラクトでは、発現タンパク質の殆どが不溶性となるため、封入体を精製し、塩酸グアニジン等で変性溶解後にリフォーディングを行って、フラビン結合性の回復を図る。フラビンを結合したタンパク質標品が得られたら、エンザイムイムノアッセイにより酵素活性の評価を行う。

(2) 大腸菌における BsPAC の機能発現

BsPAC 遺伝子を挿入した発現ベクターを用いて大腸菌のアデニル酸シクラーゼ欠損変異株の機能相補を行う。アデニル酸シクラーゼ活性の評価は、ラクトース代謝による有機酸生成を MacConkey agar の pH 指示薬でモニターすることで行う。さらに、このシステムを利用して、ランダム変異導入した BsPAC のスクリーニングを行い、光シグナル伝達に異常を生じた変異体を選抜する。得られた変異体の配列情報に基づき、部位特異的変異導入による変異体を作出し、同様にアデニル酸シクラーゼ欠損株の機能相補を調べること、光シグナル伝達に重要な役割を果たすアミノ酸残基を特定する。

(3) BsPAC の紫外/可視分光分析と酵素活性の測定

BLUF タンパク質の光応答は、青色光照射による吸収スペクトルの僅かな長波長シフトで特徴づけられる。そこで、大腸菌での大量発現・精製により得られた BsPAC を試料として、青色光照射時の吸収スペクトル変化を定量的に評価する。すなわち、マルチフォトダイオードアレイ方式の分光光度計に青色 LED の刺激光を導入し、吸収変化のキネティ

クスを調べる。さらに、前項で得られた変異体についてもタンパク質試料を調製し、同様の測定を行って、光シグナル伝達における各アミノ酸残基の役割の評価を確実なものとする。

4. 研究成果

(1) 大腸菌における BsPAC の大量発現・精製人工合成した BsPAC の遺伝子を大腸菌の発現ベクターに組み込み、大量発現を試みた。pET ベクターに組み込んで 37°C で発現させた場合、殆どの BsPAC タンパク質は不溶性の封入体として回収された。封入体標品を調製し、グアニジン塩酸塩で可溶化させた後、FAD 存在下で希釈法により巻き戻しを行うと、FAD を結合した可溶性のタンパク質が得られた。この試料は光照射により BLUF ドメインタンパク質に特徴的な吸収スペクトルのレッドシフトを示したが、残念ながらアデニル酸シクラーゼ活性は検出されなかった。一方、BsPAC を pCold ベクターに組み込んで 15°C でトリガーファクターとの融合タンパク質として、あるいは共発現させた場合は、BsPAC は可溶性タンパク質として回収され、FAD の結合量は少ないものの、光で亢進されるアデニル酸シクラーゼ活性を示した (図 1)。

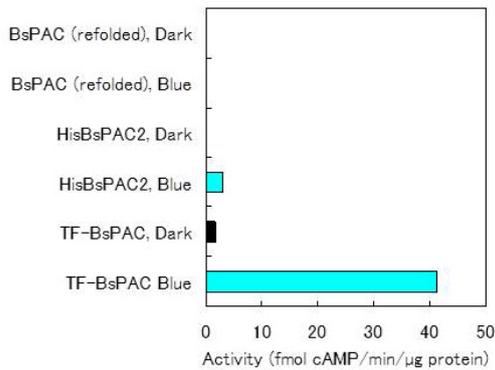


図 1 大腸菌で発現された BsPAC のアデニル酸シクラーゼ活性 BsPAC(refolded): 封入体を変性溶解、再生したもの。 HisBsPAC2: トリガーファクターと共発現させたもの。 TF-BsPAC: トリガーファクター融合タンパク質

(2) 大腸菌における BsPAC の機能発現

前項で作成した BsPAC の発現ベクター (pColdBsPAC4) をアデニル酸シクラーゼ欠損変異株 (*E. coli* MK1010) に導入し、MacConkey 寒天平板に接種したところ、培養時間 24 時間において、光照射した場合のみ cAMP 産生を示す赤いコロニーが形成された (図 2)。すなわち、BsPAC は大腸菌細胞内においてもその活性を発揮できることが示された。

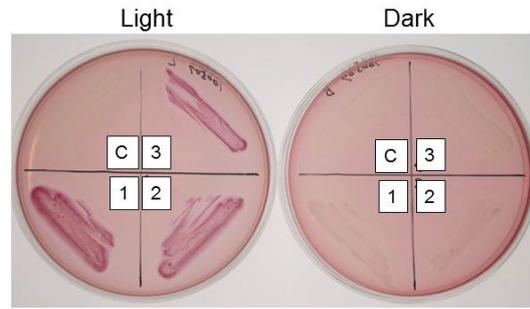


図 2 BsPAC によるアデニル酸シクラーゼ欠損大腸菌株の機能相補 MK1010 株に対し、1, pCold IV DNA (ネガティブコントロール); 2, pColdBsPAC (トリガーファクター融合 BsPAC); 3, pColdBsPAC3 (BsPAC); 4, pColdBsPAC4 (His タグ付加 BsPAC) で形質転換し、12 h の暗培養後、さらに白色光下 (25μmol/m²/s) および暗所で 15 h 培養した。

さらに、BsPAC の BLUF ドメインから触媒ドメイン直前までの間にランダム変異導入を行い、明所でも赤くならないコロニーや暗所でも赤くなるコロニーを選抜し、光依存的機能相補に異常を生じた変異体を得た。これらをシークエンスし、1 箇所あるいは 2 箇所のみに変異を生じたものをまとめたのが図 3 である。ここで注目すべきは暗所においても顕著に赤くなる変異で、部位特異的変異導入により検討を加えたところ、これらの原因となるアミノ酸残基は Q49, K94, L113 と同定された。

Mutation	Phenotype		Mutation	Phenotype	
	Dark	Light		Dark	Light
Wild type	W	R	L75Q	(R)	(W)
R4G	W	W	L77R	(W)	(W)
L5V	(R)	R	E80K	(R)	R
S9I	W	W	K94I	R	R
K10E	W	(W)	E100D	(R)	R
R22C	(W)	R	S102I	(W)	(R)
I23F	(R)	R	S102C	(W)	R
G24C	(W)	R	T115I	W	(W)
S27Y	W	W	M127T	W	(W)
L46P	(W)	(R)	P141Q	W	W
Q49L	(W)	(R)	L5M, I116N	(W)	(W)
Q49R	W	W	Q32P, M93L	(W)	R
E52G	W	W	G45D, N140D	(W)	R
K57N	(R)	R	Q49H, T84S	R	R
H71L	(W)	(R)	E103K, T115I	W	(R)
L75P	(R)	(R)	Q107E, L113Q	R	R

W: white (W): white, with several red colonies R: red, as wild type grown under light (R): red, but weaker than wild type

図 3 アデニル酸シクラーゼ欠損大腸菌の機能相補による変異体スクリーニング 暗所で顕著にコロニーの赤色化を引き起こす変異をマゼンタで、明所で全く赤色化を起こさない変異をシアンで示した。

(3) BsPAC の紫外/可視分光分析と酵素活性の測定

BLUF タンパク質の光応答は、青色光照射による吸収スペクトルの僅かな長波長シフトで特徴づけられる。そこで、前項で得られた BsPAC 変異体を試料として、青色光照射時の吸収スペクトル変化を調べるとともに、エ

ンザイムイムノアッセイにより酵素活性の測定を試みた。結果として Q49 変異のうち、Q49H は暗所での吸収スペクトルがわずかに短波長側にシフトしており、光照射を行ってもレッドシフトは見られないことがわかった。また、K94 では疎水性アミノ酸残基への置換体で暗所での赤色化が顕著であること、一方、L113 では疎水性アミノ酸残基への置換は比較的野生型に近い表現型を導くことが明らかとなった。L113 は第 3 ヘリックスに位置し、K94 もその近傍に位置していると予想されることから、第 3 ヘリックスと周辺アミノ酸残基との相互作用が光シグナルの伝達に重要な役割を果たしていると考えられた。

以上の結果は、未だ構造の明らかでない BsPAC の光活性化メカニズムに関して重要な示唆を与えるものであり、このタンパク質をミドリムシ由来の PAC に代わるオプトジェネティック・ツールとして活用するにあたっての有用な基盤情報を提供するものでもある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Yasukawa, H., Konno, N., Haneda, Y., Yamamori, B., Iseki, M., Shibusawa, M., Ono, Y., Kodaira, K., Funada, H. and Watanabe, M. Photomanipulation of antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Escherichia coli* heterologously expressing photoactivated adenylyl cyclase. *J Gen Appl Microbiol.* 58, 183-190 (2012) 査読有, DOI: 10.2323/jgam.58.183
- ② Fujiyoshi, S., Hirano, M., Matsushita, M., Iseki, M. and Watanabe, M.. Structural change of a cofactor binding site of flavoprotein detected by single-protein fluorescence spectroscopy at 1.5 k. *Phys Rev Lett.*106:078101 (2011) 査読有, DOI: 10.1103/PhysRevLett.106.078101
- ③ Shikata, T., Iseki, M., Matsunaga, S., Higashi, S., Kamei, Y. and Watanabe, M. Blue and red light-induced germination of resting spores in the red-tide diatom *Leptocylindrus danicus*. *Photochem Photobiol.* 87:590-597 (2011) 査読有, DOI: 10.1111/j.1751-1097.2011.00914.x
- ④ Iwata, T., Watanabe, A., Iseki, M., Watanabe, M. and Kandori, H. Strong Donation of the Hydrogen Bond of Tyrosine during Photoactivation of the BLUF Domain. *J. Phys. Chem. Lett.* 2, 1015-1019 (2011) 査読有, DOI: 10.1021/jz2003974
- ⑤ Ito, S., Murakami, A., Iseki, M., Takahashi, T.,

Higashi, S. and Watanabe, M. Differentiation of photocycle characteristics of flavin-binding BLUF domains of α - and β -subunits of photoactivated adenylyl cyclase of *Euglena gracilis*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9, 1327-1335 (2010) 査読有, DOI: 10.1039/c0pp00130a

⑥ Matsunaga, S., Uchida, H., Iseki, M., Watanabe, M. and Murakami, A. Flagellar motions in phototactic steering in a brown algal swarmer. *Photochem. Photobiol.* 86, 374-381 (2010) 査読有, DOI: 10.1111/j.1751-1097

⑦ Fujiyoshi, S., Furuya, Y., Iseki, M., Watanabe, M. and Matsushita, M. Vibrational microspectroscopy of single proteins. *J. Phys. Chem. Lett.*, 1, 2541-2545 (2010) 査読有, DOI: 10.1021/jz100858b

[学会発表] (計 13 件)

① 伊関峰生、松永 茂、渡辺正勝 光センサーとしてのフラビタンパク質：光活性化アデニル酸シクラーゼの構造と機能を中心に 第 54 回日本植物生理学会年会 2013 年 3 月 21 日 (岡山)

② 岩田達也、伊藤奨太、伊関峰生、渡辺正勝、神取秀樹 BLUF ドメインの光反応における水素結合環境の変化 日本生物物理学会第 50 回年会 2012 年 9 月 24 日 (名古屋)

③ 宮崎直幸、伊関峰生、長谷川浩司、成田哲博、足立伸一、渡辺正勝、岩崎憲治 精製タンパク質の構造から in situ の構造まで：電顕を使用して 日本生物物理学会第 50 回年会 2012 年 9 月 22 日 (名古屋)

④ 藤原正規、平野充遥、渡辺正勝、伊関峰生、藤芳 暁、松下道雄 温度 1.5 K の単一分子分光による可視蛍光タンパク質内のプロトン移動を伴った構造変化の観測 日本化学会第 92 春季年会 2012 年 3 月 27 日 (横浜)

⑤ 藤原正規、平野充遥、渡辺正勝、伊関峰生、藤芳 暁、松下道雄 数 K における単一分子分光を用いた可視蛍光タンパク質内のプロトン移動を伴った構造変化の観測 第 5 回分子科学討論会 2011 年 9 月 21 日 (札幌)

⑥ 岩田達也、伊関峰生、渡辺正勝、神取秀樹 BLUF ドメインの光反応におけるグルタミンとチロシン残基の水素結合構造 日本生物物理学会第 49 回年会 2011 年 9 月 18 日 (姫路)

⑦ 渡辺 正勝、伊関 峰生 微細藻由来の光 cAMP 産生酵素 PAC の導入による生物構造機能の光操作 第 34 回日本神経科学大会 2011 年 9 月 16 日 (横浜)

⑧ 伊関峰生 光活性化アデニル酸シクラーゼを用いた細胞機能操作の現状と展望 神経組織の成長・再生・移植研究会 第 26 回学術集会 2011 年 6 月 25 日 (東京)

⑨岩田達也、渡辺昭英、伊関峰生、渡辺正勝、
神取秀樹 赤外分光解析を用いた BLUF ドメ
インの光反応に必須のチロシン残基の構造
変化の検出 日本生物物理学会第 48 回年会
2010 年 9 月 22 日 (仙台)

⑩藤芳 暁・古屋 陽・伊関峰生・渡辺正勝・
松下道雄 タンパク質の赤外吸収の単一分
子観測：色素の光熱サイクルに対する考察
第 4 回分子科学討論会 2010 年 9 月 14 日 (大
阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊関 峰生 (ISEKI MINEO)
東邦大学・薬学部・准教授
研究者番号：60414009

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし