

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440072

研究課題名(和文) 硫黄細菌由来光活性化アデニル酸シクラーゼの構造機能関連の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the structure and function of a photoactivated adenylyl cyclase from a sulfur bacterium

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000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)の活性化メカニズムを明らかにすることを目的として企画されたものである。本研究において、シアノバクテリア*Oscillatoria acuminata*から新たに見出された光活性化アデニル酸シクラーゼ(OaPAC)が大腸菌において良好な可溶性タンパク質として精製可能であることが示された。これを用いて分光学的、酵素学的特性を明らかにするとともに、共同研究によりX線結晶構造の解明にも成功した。

研究成果の概要(英文)：This research is aimed at elucidating the activation mechanism of photoactivated adenylyl cyclase (PAC). We found a new homolog of PAC in the genome sequence of a cyanobacterium *Oscillatoria acuminata* and demonstrated that the homolog (OaPAC) can be easily expressed and purified from *E. coli* as soluble form. Using the purified protein, we successfully determined the photochemical and biochemical properties of the protein, and solved its crystal structure under collaboration with structure biologists.

研究分野：光生物学

キーワード：光センサー フラビン アデニル酸シクラーゼ cAMP

1. 研究開始当初の背景

単細胞鞭毛藻ミドリムシ (*Euglena gracilis*) の光忌避反応のセンサーとして同定された光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC, Photoactivated adenylyl cyclase) は、Gタンパク質等を介することなく自身が光で直接活性化されてcAMPを産生するという稀有な特性から、PACを任意の細胞に発現させることにより細胞内cAMPレベルを光で人為的にコントロールすることが可能であり、細胞機能を光で制御するオプトジェネティック・ツールとしての活用が期待されている。しかしながら、光活性化能を維持した試料の大量調製が困難であることから、X線回折や振動分光法による構造解析を行うことができず、PACの光活性化メカニズムに関しては殆ど解明が進んでいなかった。

一方、近年解読された硫黄細菌 *Beggiatoa* のゲノム上にPAC類似の配列 (BsPAC) が見出され、それが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て構造解析を行うのに好適な材料として注目されていたものの、結晶化に適する品質の試料は得られていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、当初目的として以下の2項を掲げた。(1) BsPACに積極的に変異導入を行い、得られた変異体についてアデニル酸シクラーゼ欠損大腸菌を用いた機能解析を行うことにより機能上重要なアミノ酸残基を特定する。(2) 大量精製に適した変異体の選抜を行い、発現系の再検討と併せて結晶化に適する試料の大量取得を目指す。しかしながら、研究開始後に解読されたシアノバクテリア (*Oscillatoria acuminata* PCC6304) ゲノム上に新たにPAC類似配列 (OaPAC) を見出し、これが大腸菌において非常に良好に大量発現可能であることが判ったため、上記(2)に代えてOaPACの機能解析と大量発現精製を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 人工合成したBsPAC遺伝子をpColdベクターに組み込んだ大腸菌用発現ベクター (pColdBsPAC4) にランダムに変異導入を行って得られた変異体の機能解析結果に基づき、新たに部位特異的変異導入によって変異体を作成した。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、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。このようにして明所でも活性を示さない変異体、暗所でも活性を示す変異体を識別し、ホモロジーモデリングにより得られた情報と併せて重要なアミノ酸残基の位置関係を検討する。

(2) OaPACの塩基配列 (accession number K9TLZ5) に基づいて大腸菌にコドン最適化した人工遺伝子を合成し、これをpCold I DNA (Takara bio.) にクローニングして大量発現用ベクター (pColdOaPAC) を構築した。pColdOaPACで発現用宿主大腸菌 (Arctic Express (DE3), Stratagene) を形質転換し、20、一晚の培養を行い、可溶性画分を回収、金属アフィニティークロマトグラフィーによりN末端にヒスチジンタグを持つOaPAC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を行い、生成したcAMPを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。一方、上記(1)と同様にアデニル酸シクラーゼ欠損大腸菌株の機能相補について調べるため、*lac* プロモーター領域を取り除いたpGEM5Zf(+)(Promega)にOaPAC遺伝子をクローニングして機能相補用ベクターを構築し、明暗条件下でのMacConkey agar 培養によるコロニー着色の有無を判定した。

4. 研究成果

(1) アデニル酸シクラーゼ欠損大腸菌の機能相補によるBsPACの機能解析

これまでに明らかになっていた機能上重要なアミノ酸残基 Q49, K94, L113 に加えて、BLUF ドメインと触媒ドメインの接続部分に位置する G138, P141 等についても調べたところ、これらの変異は明暗に関わらずアデニル酸シクラーゼ活性を失うことが判った。これをホモロジーモデリングによって得られた構造モデルに配置し、BLUF ドメインから第3ヘリックスを経て触媒ドメインに至る分子内信号伝達の経路が推測された (図1)。

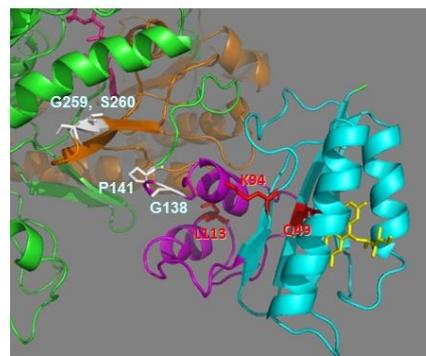


図1 機能上重要なアミノ酸残基の推定される位置関係 (注: OaPACの結晶構造が明らかになる前のモデリングに基づくものである)

(2) アデニル酸シクラーゼ欠損大腸菌の機能相補によるOaPACの機能解析

上記BsPACへの変異導入によって明らかになった機能上重要なアミノ酸残基およびPAC類のBLUFドメインと触媒ドメインをつなぐ領域で特に保存されているアミノ酸残基に注目し、OaPACに対する変異導入を行った。こ

れを MK1010 株に形質転換して機能相補を試みたところ、Q48, L112, L115, I121, G137 の変異において光活性化の異常がみとめられたほか、Y125 の変異は多くが光活性化能を失うが、セリンへの置換体は光活性化を示すことがわかった (図 2)。これらの結果は *in vitro* での酵素活性測定でも裏付けられ、水酸基を介した相互作用の重要性が示唆された。

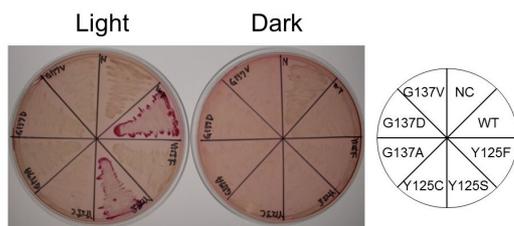


図 2 OaPAC およびその変異体によるアデニル酸シクラーゼ欠損株の機能相補

(3) OaPAC のフォトサイクル

発現用宿主大腸菌 (ArcticExpress(DE3)) で発現させて精製した OaPAC に青色光を照射すると、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が観察された (図 3)。そこで光照射下と暗黒下での差スペクトルのピークに相当する 492 nm での吸収変化をモニターし、速度論的解析を行ったところ、一次反応によって反応中間体が形成される単純なモデルに適合することがわかり、量子収率 0.43、半減期 1.85 s が得られた。前者は既知の BLUF ドメインタンパク質と比較して高く、後者は短い。このことから、敏感な光スイッチとしての応用が期待される。

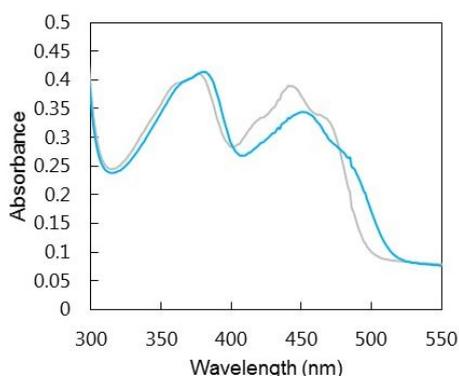


図 3 精製された OaPAC の吸収スペクトル 室温暗黒下 (灰色線) および 465 nm の青色光照射下 (青線) で測定した。

(4) OaPAC の光依存的アデニル酸シクラーゼ活性

OaPAC は暗黒下ではほとんどアデニル酸シクラーゼを示さないが、光照射下においては顕著な活性を示した。基質濃度を変えて測定を行い、ミカエリス・メンテンプロット (図 4) から V_{max} , $69.6 \text{ pmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$; K_m , $6.3 \mu\text{M}$ を得た。ミドリムシの PAC ではそれぞれ $3.5 \text{ pmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$, $0.5 \mu\text{M}$ なので、PAC に比

較すると ATP への親和性は低いものの、効率よく cAMP を産生することが示唆される。

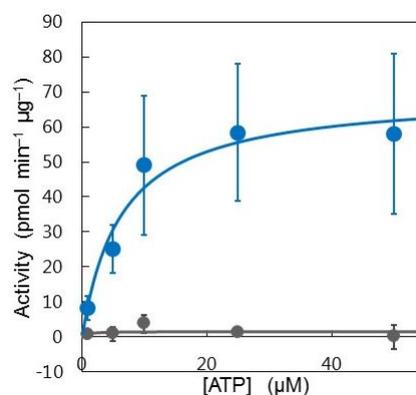


図 4 OaPAC のアデニル酸シクラーゼ活性の基質濃度依存性

暗黒下および青色光 (465 nm , $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 照射下において生成した cAMP を酵素免疫アッセイにより定量した。n=8 の平均値と標準誤差を示す。

(5) OaPAC の X 線結晶構造解析

上記により OaPAC が大腸菌において良好な発現を示し、かつ高純度な精製が可能であることが判明したため、横浜市立大学の朴三用教授らとの共同研究を開始し、OaPAC の結晶化および X 線結晶構造解析に成功した。得られた構造はこれまで BLUF ドメインタンパク質で知られていたものとは大きく異なり、C 末端側の第 3 ヘリックスが長く伸長してこれがコイルドコイルとしてダイマー形成を支えているものである (図 5)。この構造情報に基づいて、構造機能上重要と推測されるアミノ酸残基について変異導入を行い、アデニル酸シクラーゼ活性を調べたところ、いずれも光依存的な酵素活性が失われた (図 6)。これらは上述のアデニル酸シクラーゼ欠損大腸菌株を用いた機能相補実験によって予測されたアミノ酸残基とも多く的一致がみられた。

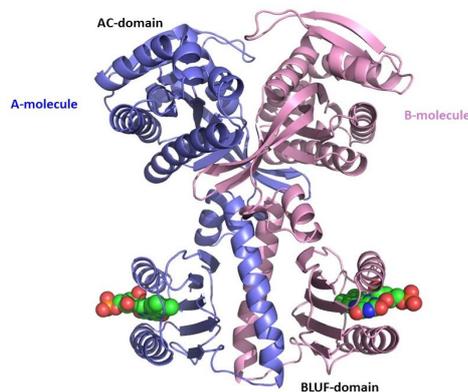


図 5 OaPAC の全体構造 青とピンクのリボンモデルでホモダイマー構造を示す。

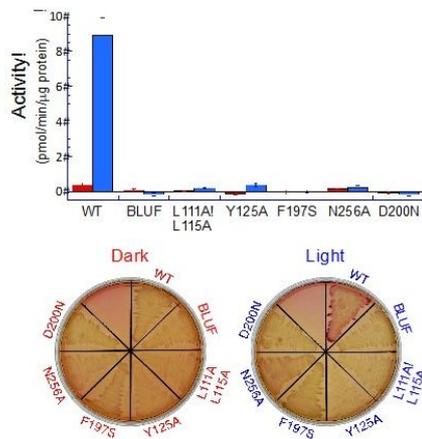


図 6 構造情報から推測された主要アミノ酸残基変異体のアデニル酸シクラーゼ活性 *in vitro* の酵素活性測定結果(上段)およびアデニル酸シクラーゼ欠損大腸菌株の機能相補による *in vivo* 活性評価(下段)を示す。

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 5 件)

Mio Ohki, Kanako Sugiyama, Fumihiro Kawai, Hitomi Tanaka, Yuuki Nihei, Satoru Unzai, Masumi Takebe, Shigeru Matsunaga, Shin-ichi Adachi, Naoya Shibayama, Zhiwen Zhou, Ryuta Koyama, Yuji Ikegaya, Tetsuo Takahashi, Jeremy R.H. Tame, Mineo Iseki, and Sam-Yong Park, Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium, PNAS, 2016, doi: 10.1073/pnas.1517520113, in press, 査読有

Zhou Z, Tanaka KF, Matsunaga S, Iseki M, Watanabe M, Matsuki N, Ikegaya Y, Koyama R. Photoactivated adenylate cyclase (PAC) reveals novel mechanisms underlying cAMP-dependent axonal morphogenesis. Sci Rep. 5, 2016, 19679, DOI: 10.1038/srep19679, 査読有

Takeda J, Nakata R, Ueno H, Murakami A, Iseki M, Watanabe M. (2014) Possible Involvement of a Tetrahydrobiopterin in Photoreception for UV-B-induced Anthocyanin Synthesis in Carrot. Photochem Photobiol. 90, 2014, 1043-1049, DOI: 10.1111/php.12302, 査読有

Yasukawa H, Sato A, Kita A, Kodaira K, Iseki M, Takahashi T, Shibusawa M,

Watanabe M, Yagita K. Identification of photoactivated adenylate cyclases in *Naegleria australiensis* and BLUF-containing protein in *Naegleria fowleri*. J Gen Appl Microbiol. 59, 2013, 361-369, DOI: 10.2323/jgam.59.361, 査読有

Tomoyuki Shikata, Shigeru Matsunaga, Mineo Iseki, Hiroyo Nishide, Sho-Ichi Higashi, Yasuhiro Kamei, Mineo Yamaguchi, Ian R. Jenkinson and Masakatsu Watanabe, Blue light regulates the rhythm of diurnal vertical migration in the raphidophyte red-tide alga *Chattonella antiqua*. J. Plankton Res. 35, 2013, 542-552, DOI:10.1093/plankt/fbt006, 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

田上真也, 石川孝博, 伊関峰生, *Euglena gracilis* のステップダウン光驚動反応に關与する光センサータンパク質の探索, ユーグレナ研究会第 31 回研究集会, 2015 年 11 月 7 日, Kiten ビル コンベンションホール (宮崎県宮崎市)

大木規央, 杉山佳奈子, 河合文啓, 松永茂, 柴山修哉, 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 PAC の活性化機構解明, 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015 年 9 月 15 日, 金沢大学角間キャンパス (石川県金沢市)

永井貴士, 岩田達也, 伊藤奨太, 伊関峰生, 渡辺正勝, 北川慎也, 神取秀樹, MALDI-TOF-MS を用いた BLUF ドメインの同位体標識の解析, 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015 年 9 月 14 日, 金沢大学角間キャンパス (石川県金沢市)

伊関峰生, 二瓶悠樹, 田中 瞳, 大木規央, 杉山佳奈子, 河合文啓, 松永茂, 高橋哲郎, 朴 三用, シアノバクテリア由来の新規光活性化アデニル酸シクラーゼ, 日本植物学会第 79 回大会, 2015 年 9 月 6 日, 朱鷺メッセ (新潟県新潟市)

伊関峰生, 光活性化アデニル酸シクラーゼの構造と機能, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「光運動反応・光センサー蛋白質・光遺伝学」, 2015 年 3 月 11 日, 蛋白質研究所 (大阪府吹田市)

伊関峰生, 光活性化アデニル酸シクラーゼの構造と機能 - 生体機能光操作への応用を目指して -, 第 57 回日本放線菌学会学術講演会, 2015 年 2 月 27 日, 微生物化学研究所 (東京都品川区)

岩崎憲治, 宮崎直幸, 伊関峰生, 長谷川

浩司, 成田哲博, 松永茂, 建部益美, 上村慎治, 渡辺正勝, ミドリムシにおける光運動マシナリーの解明, 日本生物物理学会第52回年会, 2014年9月25日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

周至文, 田中謙二, 松永茂, 伊関峰生, 渡辺正勝, 松木則夫, 池谷裕二, 小山隆太, cAMPによる軸索分枝と伸長の独立制御, 第37回日本神経科学大会, 2014年9月13日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Mineo Iseki, Shoko Uekusa, Asami Yamagata, Koji Hasegawa, Hiro Yasukawa, Tetsuo Takahashi, Masakatsu Watanabe, Analysis of intramolecular signal transduction in the photoactivated adenylyl cyclase of the sulfur bacterium *Beggiatoa* sp., 16th International Congress of Photobiology, September 9th, 2014, Universidad Nacional de Córdoba (アルゼンチン, コルドバ)

齊藤佑樹, 堀池裕一郎, 川上亮, 松永茂, 渡辺正勝, 高橋哲郎, 伊関峰生, ミドリムシ鞭毛由来青色蛍光タンパク質の機能解析, 第29回ユウグレナ研究会, 2013年11月9日, 筑波大学(茨城県つくば市)

伊関峰生, 松永茂, 渡辺正勝, 光センサーとしてのフラビントパク質: 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, 岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

〔図書〕(計 2件)

Mineo Iseki and Tetsuo Takahashi, Biology of light-sensing proteins in plants and microorganisms. In Optogenetics: Light-Sensing Proteins and Their Applications (Yawo, Hiromu, Kandori, Hideki, Koizumi, Amane, Eds.) Springer Japan, Tokyo, 2015, pp. 17-29

伊関峰生, 走光性 光化学協会編「光化学の事典」, 朝倉書店, 2014, pp.334-335

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