

平成21年 5月 25日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19614004  
 研究課題名(和文) 光活性化アデニル酸シクラーゼ大量発現系の開発ー活性化の分子機構解明をめざしてー  
 研究課題名(英文) Development of an overexpression system of photoactivated adenylyl cyclase: Toward elucidation of molecular mechanisms of photoactivation  
 研究代表者  
 伊関 峰生 (ISEKI MINEO)  
 総合研究大学院大学・葉山高等研究センター・上級研究員  
 研究者番号：60414009

## 研究成果の概要：

本研究は、単細胞生物ミドリムシ由来の光センサー、光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC) の活性化の分子機構解明を目指すものであり、その第一段階としてミドリムシにおける薬剤感受性を明らかにし、さらに PAC の遺伝子を単離してそれらの構造を明らかにした。これらは形質転換系確立の基本情報として重要であり、PAC の大量取得と構造・機能解析へ向けての基礎となるものである。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：光生命科学

キーワード：光受容、光センサー、ミドリムシ、形質転換、アデニル酸シクラーゼ

## 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 (副鞭毛体) から分子量約 40 万のフラビン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 $\alpha$ , PAC $\beta$ ) から成り、それぞれのサブユニットには発色団結合ドメイン (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に類似した配列は幾つかの細菌のゲノム上に見出され、それらがフラビンを結合することが知られていたが、その後紅色光合成細菌のフラビンタンパク質 AppA が光合成遺伝子発現抑制に関わる光センサーとして機能することが証明され、PAC と共に新しい青色光センサータンパク

質のファミリーとして認知されるようになった。これらに共通のフラビン結合ドメインは BLUF (a sensor of blue light using FAD) と名付けられ、現在多くのバクテリアに存在することが知られているが、真核生物では僅かにミドリムシ類と一部の菌類に見出されているのみである。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、国内外において光照射に伴う吸収変化に注目した分光学的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。一方、PAC の場合は、我々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、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、最近ようやく F2 ドメインのみについて初歩的なキネティクス解析を行えるようになったばかりである。このように、光受容初期過程についてはバクテリアに先行を許した形となったが、バクテリアの BLUF タンパク質は構造が単純であるが故にその機能発現には他タンパク質との相互作用を想定せざるを得ず、実は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いのが実状である。その点、PAC はそれ自身がアデニル酸シクラーゼ活性という極めて明瞭な出力機能を持っていることから、初期過程から出力に至るまでを総合的に検討し得る稀有な光センサーであり、光受容全過程の解明には最も近い位置にあると言ってよい。そのためには本来の活性を保持した十分量の PAC を手にすることが必須であり、革新的な手法開発が望まれているのである。

## 2. 研究の目的

報告者らは、PAC をミドリムシから精製し、それを用いて光活性化の基本的な特性を明らかにしてきた。しかしながら、ミドリムシから精製可能な量は 1 回につき僅か数  $\mu\text{g}$  であり、酵素活性を測定することはできるものではない。一方、大腸菌等の異種発現系から得た PAC は活性を保持しておらず、変性タンパク質からの再生も未だ成功していない。そこで、本研究では、ミドリムシ自身に PAC を過剰発現させ、そこから活性を保持した十分量の PAC を得ることを目指す。しかしながら、ミドリムシでは今まで形質転換の系が知られておらず、その開発から着手する必要があることから、実際の研究項目は、(1)ミドリムシ形質転換系の確立、(2)PAC 大量発現系の確立の 2 点となる。初年度において、薬剤感受性の検討および薬剤耐性をマーカーとした形質転換ベクターの開発を行い、形質転換系を確立する。次年度において、発現プロモーターの探索を行い、PAC の大量発現を実現す

ると共に、得られた試料を用いて分光学的解析とアデニル酸シクラーゼ活性の同時測定を行うことにより、光受容初期過程と出力過程をリンクさせた情報を取得する。

## 3. 研究の方法

### (1) ミドリムシ形質転換系の確立

#### (1)-① 薬剤感受性の検討

ミドリムシにおいては、G418 やハイグロマイシン等の真核生物用抗生物質を含めて系統的に薬剤感受性を調べた例は報告されていない。そこで、各種抗生物質を用意し、平板法および液体培養により、それぞれに対する生育阻害効果を検討する。

#### (1)-② PAC 遺伝子のクローニング

形質転換を実現するためには、適切なプロモーターを選ぶことが必要だが、現在までにミドリムシで機能するプロモーターは全く知られておらず、そもそもコーディング領域全長が解明された遺伝子自体が僅かしかない。そこで、PAC 遺伝子の構造を明らかにするために、ゲノムライブラリを構築し、PAC 遺伝子のスクリーニングを行う。得られた遺伝子はショットガンシーケンスにより全長の塩基配列を決定する。

#### (1)-③ 形質転換ベクターの開発

ミドリムシは rRNA をコードする約 11 kb の核外 DNA を 800~4,000 コピー有する。これに薬剤耐性遺伝子と適当な複製起点を加えることにより、大腸菌とのシャトルベクター化を図る。まずは大きな DNA 断片を適当な部位に挿入したものを多種類作製し、これらをエレクトロポレーションによってミドリムシに導入して選択培地に蒔き、生育可能となる組合せを検索する。さらに、PAC 遺伝子の上流域を切り出してプロモーターをスクリーニングする。

### (2) PAC 大量発現系の確立

ミドリムシにおける形質転換系が完成した後、PAC を大量発現させるため、活性の高いプロモーターの探索を行う。ミドリムシの遺伝子上流域の探索をさらに進めるとともに、哺乳類細胞等で普通に用いられる CMV, SV40, TEF1 等の発現プロモーターもテストする。こうして PAC $\alpha$ , PAC $\beta$ それぞれについて、できるだけ発現量の多くなるベクターを構築する。そのうえで、PAC $\alpha$  と PAC $\beta$  の発現量のバランスをとる必要があれば、両者に異なる薬剤耐性遺伝子を組み込んで共発現させる、あるいは両者を単独のベクターに組み込んでポリシストロニックな発現を試みる。

## 4. 研究成果

### (1) ミドリムシの薬剤感受性

各種抗生物質に対する感受性を平板法でコロニー計数により評価した。それぞれの最小生育阻害濃度を図1に示す。原核生物用の抗生物質の効果はいずれも弱く、アンピシリンやペニシリン等のβラクタム系抗生物質は0.8 mg/mlまでの濃度で生育・形状に全く影響は見られなかった。一方、ストレプトマイシンやスペクチノマイシン等のアミノグリコシド系の薬剤は、生育そのものには大きな影響はないものの、葉緑体に作用して細胞の白化を起こした。真核生物用として用いられる抗生物質はピューロマイシンを除いていずれも効果があり、特にG418, プラストジジンS, ゼオシンは効果が高く、スクリーニング用に好適と判断された。これはミドリムシの形質転換系を開発し、現代的な実験生物として扱ううえで重要な基礎データを提供するのである。

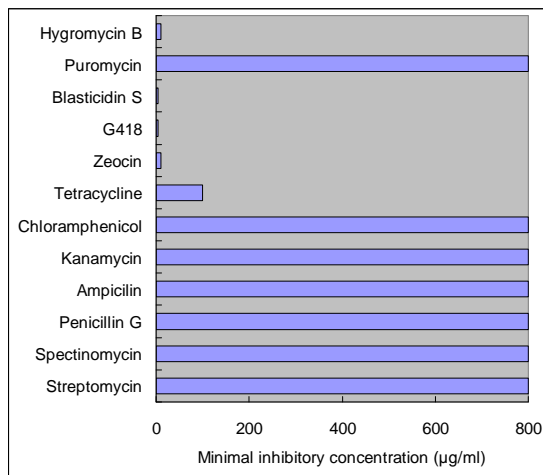


図1 ミドリムシの抗生物質感受性  
ミドリムシ細胞約500個を5段階の濃度で抗生物質を含む1.5%寒天平板(従属栄養培地)に接種し、8日後にコロニー数をカウントして生育の見られない最小濃度を決定した。

### (2) PAC遺伝子のクローニング

ミドリムシよりゲノムDNAを精製し、物理的に切断した40 kb程度の断片をフォスミドベクターに組み込んでゲノムライブラリ(3.0 x 10<sup>5</sup> cfu/500 µl)を作成した。これをマイクロプレートに1ウェル当たり約100クローンずつ分けてクローンプールとし、PACα, PACβそれぞれに特異的なプライマーを用いたPCRによってスクリーニングを行った。得られたポジティブクローンのうち、PACα, PACβそれぞれを最も長く含むものを選択し、ショットガンシーケンスならびにプライマーウォーキングによって、ほぼ全長に相当する塩基配列を決定した(一部にギャップを含む)。

図2に示すように、PACαクローン3A3はコーディング領域の全長を含み、コーディン

グ領域は16個のエクソンで構成されていた。PACβクローン4G10はコーディング領域のN末端からC2領域途中までを含んでおり、18個のエクソンを確認した。ミドリムシのイントロンには、通常の実核生物mRNA型のイントロン(conventional type)のほか、GT-AG則に従わず、境界領域に繰り返し配列を持って強固な二次構造を形成すると考えられるイントロン(non-conventional type)が存在することが知られている。PACα遺伝子のイントロンの多くはnon-conventional typeであり、conventional typeは3個しかなかった。一方、PACβ遺伝子では、殆どのイントロンがconventional typeであり、non-conventional typeは2個だけであった。さらに、PACαとPACβはアミノ酸配列においては75%という高い同一性を示すにも関わらず、それらの遺伝子のイントロン-エクソン構造は大きく異なっていた。これらのことは、PACαとPACβがパラログとして分化した後に頻りにイントロンの挿入・離脱が行われたことを示唆する。

この成果は、PACの大量発現を目指すうえで欠かせないPACの発現制御機構を知るための足がかりとなる。また、ミドリムシにおいて、今までに全長が明らかにされた遺伝子は数えるほどしかなく、この生物の進化を考えるうえでも有用なデータを提供するのである。

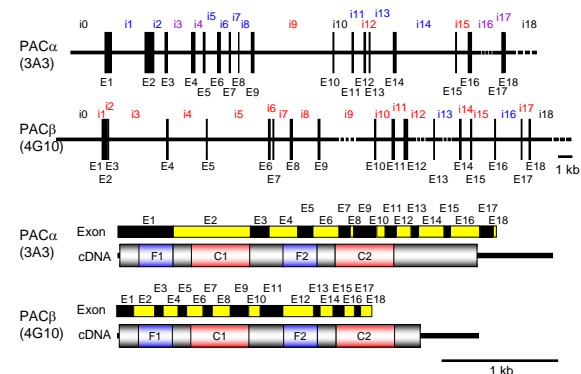


図2 PACα, PACβの遺伝子構造模式図

上段はPACαとPACβのイントロン-エクソン構造を示す。イントロン(i0-i19)のうち、赤字はconventional typeを示し、青字はnon-conventional typeを、紫字はそれらの中間型を示す。下段はPACα, PACβのcDNAに由来するアミノ酸配列模式図で、エクソン(E1-E18)の配置を黒・黄のブロックで示す。

### (3) 形質転換ベクターの開発

ミドリムシでは核コードの遺伝子のプロモーター配列が全く不明であるため、当初は他生物で発現用に使用されているプロモ-

ター、すなわち CMV, SV40, EF1a, lac, 等をゼオシン耐性遺伝子につないで導入を行ったが、耐性を付与することはできなかった。次に、ミドリムシの核外環状 DNA から得たりボソーム遺伝子の上流域を組み込み、蛍光タンパク質 ZsGreen をレポーターとして発現を試みたが、顕著な蛍光を検出することはできなかった。同様に前項で特定した PAC 遺伝子の上流域を組み込んだベクターも機能しなかった。さらに、プロモーター候補 DNA 断片の組み合わせをさまざまに変更し、Neo 遺伝子をマーカーとして G418 によるスクリーニングを行ったが、いずれも耐性付与には至らなかった。

#### (4) PAC の構造・機能解析に向けて

本研究は、PAC の大量取得を実現し、X 線結晶構造解析や分光学的解析を行うことを目指すものであるが、本研究の進行を背景として、大量の試料を必要としない PAC の構造・機能解析の手法開発にも取り組んできた。具体的には、東京工業大グループと共同で進めている単一分子分光法により、低温下における PAC の単一分子由来の蛍光測定に成功したほか、大阪大グループと共同で進めている電子顕微鏡を用いた単粒子解析により、PAC の四量体構造の可視化に成功した。これらは PAC の構造・機能解明に新しい一歩を踏み出すものであり、大量取得の困難な他の光センサータンパク質の解析にも新たな道を提示するものである。

#### 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 5 件)

- ① Maruyama, S., Misawa, K., Iseki, M., Watanabe, M., Nozaki, H. Origins of a cyanobacterial 6-phosphogluconate dehydrogenase in plastid-lacking eukaryotes. BMC Evol. Biol. 8:151 (2008). 査読有
- ② Nagahama, T., Suzuki, T., Yoshikawa, S., Iseki, M. Functional transplant of photoactivated adenylyl cyclase (PAC) into Aplysia sensory neurons. Neurosci. Res. 59, 81-88 (2007). 査読有
- ③ Honda, D., Shono, T., Kimura, K., Fujita, S., Iseki, M., Makino, Y., Murakami, A. Homologues of sexually induced gene 1 (sig1) product constitute the stramenopile mastigonemes. Protist 158, 77-88 (2007). 査読有
- ④ Nozaki, H., Iseki, M., Hasegawa, M., Misawa, K., Nakada, T., Sasaki, N., Watanabe, M. Phylogeny of primary photosynthetic

eukaryotes as deduced from slowly evolving nuclear genes. Mol Biol Evol. 24, 1592-1595 (2007). 査読有

- ⑤ 伊関峰生 ミドリムシにおける光センシングの分子機構 原生動物学雑誌 40, 93-100 (2007). 査読無

[学会発表] (計 8 件)

- ① 石床知佐江, 中村友美, 伊関峰生, 渡辺正勝, 新田陽子, 植野洋志, 竹田淳子 ミドリムシの step down 光驚愕反応に関与する光センサータンパク質の精製と同定 日本生物高分子学会 2008 年度大会 2008 年 11 月 14 日 (亀岡)
- ② Tatsumi Nagahama, Takeshi Suzuki, Shinya Yoshikawa, Mineo Iseki Functional transplant of photoactivated adenylyl cyclase (PAC) into sensory neurons in Aplysia pleural ganglia. The 8th Asia Pacific Marine Biotechnology Conference, 2008 年 11 月 13 日, (Busan, Korea)
- ③ 藤芳 暁, 平野充遥, 古屋 陽, 藤原正規, 松下道雄, 伊関峰生, 渡辺正勝 (東工大物理, 総研大) 低温のタンパク質分光の励起過程の検討 第 2 回分子科学討論会 2008 年 9 月 26 日 (福岡)
- ④ Nagahama, T., Suzuki, T., Yoshikawa, S. and Iseki, M. Functional transplant of photoactivated adenylyl cyclase (PAC) into Aplysia sensory neurons. The 34th Meeting of the American Society for Photobiology, 2008 年 6 月 25 日 (Burlingame, USA)
- ⑤ 長谷川浩司, 伊関峰生, 鈴木武士, 松永茂, 中野達也, 渡辺正勝 フラグメント分子軌道法によるミドリムシ光センサー-PAC とフラビン発色団との相互作用解析 日本農芸化学会 2008 年度大会 2008 年 3 月 29 日 (名古屋)
- ⑥ 伊関峰生, 鈴木武士, 松永茂, 渡辺正勝 ユーグレナの光センサー、光活性化アデニル酸シクラーゼの遺伝子構造 ユーグレナ研究会第 23 回研究会 2007 年 11 月 17 日 (大阪)
- ⑦ Koji Hasegawa, Mineo Iseki, Takeshi Suzuki, Shigeru Matsunaga, Tatsuya Nakano, Masakatsu Watanabe Flavin-Binding Properties of Eukaryotic BLUF Domains of Photoactivated Adenylyl Cyclase (PAC) in *Euglena gracilis* : Ab initio Fragment Molecular Orbital (FMO) Calculations. 情報計算化学生物学会 2007 年大会 2007 年 10 月 4 日 (広島)
- ⑧ 平野充遥, 藤原正規, 藤芳 暁, 松下道雄, 伊関峰生, 渡辺正勝 二波長の励起光を同時に利用できる低温の単一タンパク質分光装置の開発 第 1 回分子科学討論会 2007 年 9 月 19 日 (仙台)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊関 峰生

総合研究大学院大学・葉山高等研究センター

・上級研究員

研究者番号: 60414009

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。