

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2006 ～ 2010
 課題番号：18077003
 研究課題名（和文） 一人三役の光センサー蛋白、光活性化アデニル酸シクラーゼの分子内ドメイン相互作用
 研究課題名（英文） Interactions among intramolecular domains of Photoactivated Adenylyl Cyclase (PAC), the blue-light sensor with intrinsic effector function
 研究代表者
 渡辺 正勝 (WATANABE MASAKATSU)
 総合研究大学院大学・先導科学研究科・教授
 研究者番号：40124226

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学／生物科学・機能生物化学

キーワード：光センサー・フラビン・環状 AMP・ドメイン相互作用・細胞行動

1. 研究計画の概要

①最近申請者が単細胞藻ミドリムシの副鞭毛体より同定した、青色光にตอบสนองして鞭毛運動を変化させ細胞の強光からの逃避行動をもたらす、光 on のセンサーである一人三役（光センシング・信号伝達・セカンドメッセンジャーcAMP合成）のフラビン蛋白質「光活性化アデニル酸シクラーゼ」(Photoactivated Adenylyl Cyclase; PAC) (Iseki *et al.* 2002: *Nature* 415, 1047-1051) について、光による酵素活性のスイッチング機構を解明する。そのために、発色団-アポ蛋白質相互作用および光センサー機能モジュールとアデニル酸シクラーゼ機能モジュールの分光学的および構造生物学的解析を行う。

2. 研究の進捗状況

(ドメイン間相互作用の解析)：ミドリムシの光逃避行動の光センサーPACは、そのサブユニットである PAC α と PAC β のそれぞれに、光センサー機能モジュールとしてのフラビン結合ドメイン(F1, F2)と、アデニル酸シクラーゼ機能モジュールとしての酵素活性ドメイン(C1, C2)を持ち、それらの相互作用により青色光で活性化される。この相互作用を解析するために、大腸菌におけるアデニル酸シクラーゼの機能相補を行った。C1 と C2 が共存することと、最低1つのフラビン結合ドメインが存在することが、アデニル酸シクラーゼの活性に必須であった。しかし、大腸菌発現系では活性の光制御は実現しておらず、天然の PAC の機能を十分に再現しているとは言い難い。(光活性化アデニル酸シクラーゼの構造と機能に関する理論解

析)：PACを構成する機能ドメイン、すなわち、フラビン結合ドメイン (F1, F2) およびアデニル酸シクラーゼ触媒ドメイン (C1, C2) の他生物の類似タンパク質における結晶構造解析を元に、ホモロジーモデリングを行い、理論解析を行った結果、F1 と F2 のフラビン結合性の違いが、発色団遠方アミノ酸残基の寄与によることが示唆されたほか、C1 が ATP 結合に直接関与していることが示唆された。(単一分子レベルでの分光分析)：PACの大量取得が困難である現在、少量の試料で分析可能な測定系を利用することは、PACの機能解明に向けての有効なアプローチとなる。そこで、東工大の松下道雄博士らとの共同で、PACの単一分子分光解析を視野に入れた装置開発を進めた。その結果、蛍光色素 Alexa Fluor でラベルした BSA を試料として、低温下における二波長同時測定に成功した。現在、PACのフラビン結合領域を含んだ組換えタンパク質での検討を進めている。(光活性化アデニル酸シクラーゼの導入による神経活動の光制御)：PACを細胞工学的に任意の細胞に導入して光条件により細胞内 cAMP 濃度を人為的に変化させ、各種の生命活動をコントロールする「細胞機能光スイッチ」として応用する可能性については、PACの発見当初より考えられていた。東邦大の長濱辰文博士らとの共同で、cAMPによる神経応答現象が良く知られるアメフラシ感覚ニューロンに PAC を導入したところ、光照射によって活動電位が変化することが明らかとなった。また、ドイツグループとの 5 年の共同研究の成果として、アフリカツメガエル卵母細胞やヒト培養細胞において PAC の機能発現を実現し、さらにはショウジョウ

バエにおいて個体レベルでの行動の光制御に成功した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由) 当初計画においては、平成 20 年度までに光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC) の(1)モジュール毎の機能解析および(2)モジュール間相互作用の解析を行い、さらには(3)モジュールの組み合わせによる PAC の再構成にチャレンジする予定であった。これらはいずれも大腸菌に発現させた組換え蛋白質を用いた *in vitro* の実験と、大腸菌のアデニル酸シクラーゼ欠損株を用いた *in vitro* の実験を想定しており、後者については完全な活性の再現には至っていないものの、酵素活性に必要なモジュールの組み合わせに関して一定の成果が得られた。一方、前者については、大腸菌で大量発現・精製の系は構築されたものの、生化学的に検出可能なレベルの活性を示してくれないため、難航した。そこで酵母や哺乳類培養細胞での大量発現も試みたが、やはり *in vitro* で使えるレベルの試料を得ることはできなかった。その一方、大量発現による試料調製が困難であったが故に、ホモロジーモデリングと量子化学計算の手法を導入することにより、試料調製に依存することなく PAC の構造に関する新しい示唆が得られた。また、同時に、東工大グループとの共同研究により、PAC の単一分子分光分析が可能となったほか、阪大グループとの共同で、電子顕微鏡による単粒子解析も開始しており、ミドリムシから精製可能な少量の試料を用いての構造・機能解析が射程距離に入った。

4. 今後の研究の推進方策

上記のホモロジーモデリング、単分子分光、単粒子解析、による解析の他、異種発現によるサンプル大量調製および変異体蛋白調製による解析、更には、細胞内信号伝達経路の分子プローブによる解析を進める。

5. 代表的な研究成果

(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 4 件)

(1) Schröder-Lang, S., Schwarzel, M., Seifert, R., Strunker, T., Kateriya, S., Looser, J., Watanabe, M., Kaupp, U. B., Hegemann, P. and *Nagel, G. Fast manipulation of cellular cAMP level by light *in vivo*. Nat. Methods. 4, 39-42 (2007). 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) 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

(4) Maruyama, S., Misawa, K., Iseki, M., Watanabe, M. and Nozaki, H. Origins of a cyanobacterial 6-phosphogluconate dehydrogenase in plastid-lacking eukaryotes. Evol. Biol. 8:151(2008). 査読有

[学会発表] (計 1 件)

(1) 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, Burlingame, CA, 25 June 2008. (招待講演)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]