

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：22701

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05779

研究課題名（和文）光感受性タンパク質の多様な光反応機構解明

研究課題名（英文）Structural analysis of various light-driven reaction mechanisms of light-sensitive proteins.

研究代表者

朴 三用（Park, SamYong）

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：20291932

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 79,500,000円

研究成果の概要（和文）：光感受性アデニル酸シクラーゼ（OaPAC）については単結晶から得られた静的な構造がすでに明らかであったので、結晶化条件を微小結晶調製用に改良することを試みた。その結果、暗状態でのタンパク質の発現や精製を行うことで、改善を行いことができました。Swiss Light Sourceで常温でのX線回折実験では、超音波領域内に浮揚したフィルム上の結晶に対してX線を照射し、2.2-2.4 Åの分解能で明らかにした。解析の結果、BLUFドメイン内のFlavinと近傍残基Gln48が近づく動きを観測し、その動きが3秒後にはGln48の動きが完了していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光によって感応、応答するタンパク質には、動物や植物などに広く分布する発色団を含み、生命維持に関与するなど重要な役割を果たすものが知られる。近年では、こうした光感受性タンパク質を利用して、細胞などの光操作する技術に応用され、これまでに多くの生理現象の解明に利用されてきた。中でも、光遺伝学は、細胞や組織の生理機能を明らかにするための非常に強力な研究手法であると同時に、疾病の治療への応用の観点からも注目されている。

研究成果の概要（英文）：Since the static structure of the light-sensitive adenylyl cyclase (OaPAC) was already known from single crystals, we sought to improve the crystallization conditions for the preparation of microcrystals. X-ray diffraction experiments at room temperature at the Swiss Light Source revealed crystals floating on a film in the ultrasonic range with a resolution of 2.2-2.4 Å. The results of the analysis showed that the BLUF domain was not affected by the crystallization conditions. The analysis showed that the movement of flavin and the neighboring residue Gln48 in the BLUF domain were observed to approach each other, and that the movement of Gln48 was completed after 3 seconds.

研究分野：構造生物学

キーワード：cGMP光産生酵素 光反応酵素 X線自由電子レーザー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

フラビン色素等の発色団を含む光感受性タンパク質は、光感知機能や集光機能、DNA 損傷修復機能など多彩な生命現象に関わっている。近年では、そのような光感受性タンパク質を光によって非侵襲的に制御する光遺伝学の試みが始まっており、新たな機能制御による生命現象の解明が進んでいる。しかし、光感受性タンパク質は新たな疾病治療法にもなりうると期待される一方で、その詳細な光応答機構は不明のままである。本研究班では、様々な発色団を含んだタンパク質をターゲットとし、XFEL (X線自由電子レーザー) を利用した高速分子動画法により、光感受性タンパク質の多様な光応答機構の解明を目指す。生物の光応答を原子レベルかつ時分割で理解することにより、生命科学・医学・薬学などの分野において広範で多彩な応用展開が期待される。

### 2. 研究の目的

光によって感応、応答するタンパク質には、動物や植物などに広く分布する発色団を含み、生命維持に関与するなど重要な役割を果たすものが知られる。近年では、こうした光感受性タンパク質を利用して、細胞などの光操作する技術に応用され、これまでに多くの生理現象の解明に利用されてきた。中でも、光遺伝学は、細胞や組織の生理機能を明らかにするための非常に強力な研究手法であると同時に、疾病の治療への応用の観点からも注目されている。光活性化アデニル酸シクラーゼ PAC は、動物、植物で普遍的な情報伝達物質 (cAMP、cGMP) の生産を光で制御できる生体タンパク質で、生体内での光スイッチとして医学的な応用が期待される分子である。PAC は、最初にミドリムシから発見され以後、複数の原核生物からも相同遺伝子が見出されていたが、いずれも原子レベルでの構造・機能解明までには至ってなかったが申請者によって、藍藻由来の光活性化アデニル酸シクラーゼ (OaPAC) における初めて原子レベルでの構造・機能解明に成功した。本研究では解明された OaPAC 光活性化メカニズムの構造科学的解明を基に、細胞内でのセカンドメッセンジャー光制御への光遺伝学の展開や、PAC の酵素ドメイン改変による cGMP 光産生酵素の創出、更には脳病変発生などにおける発生学的疾病の機構解明と治療を光制御医学ツールとして基礎医学的研究を目指す。本年度では OaPAC に対して微結晶調製を大量作製し、XFEL (X線自由電子レーザー) の測定と、OaPAC の反応時間を追うため、秒単位での測定が可能で、ヨーロッパ放射光施設 SLS での測定を行い、光感受性タンパク質の多様な光応答機構の解明を目指している。

### 3. 研究の方法

タンパク質の微結晶調製に適した結晶化条件を検討し、放射光X線を使った回折実験から結晶性能を確認する。更に、発色団を含んだ微結晶での吸収分光や赤外振動分光測定を実施し、得られた情報より結晶中における光反応の反応速度論的解析を行う。また、通常の微結晶調製共に、シード法による結晶化条件検討も行う予定である。昨年度では、不均一な微結晶のXFELのデータ解析から、分解能や、データの質の問題点の改善を行い、研究を進めて行く予定である。その他、XFELを照射し回折像を得る実験の際の連続的な微結晶導入方法の最適化などに取り組みと、SPRING8、SLSによる微結晶の結晶性を確認する。

### 4. 研究成果

光感受性アデニル酸シクラーゼ (OaPAC) については単結晶から得られた静的な構造がすでに明らかであったので、まずこの結晶化条件を微小結晶調製用に改良することを試み

た。その結果、暗状態でのタンパク質の発現や精製を行うことで、改善を行いことができた。また、回折能がある結晶化どうかは見た目では判断できないため、単結晶のX線結晶構造解析で用いる大きさの結晶の回折能チェックを実験室系X線回折装置で実施し、それを微小結晶調製にフィードバックすることで品質管理を随時行いながら微小結晶の大量調製方法の検討を行なった。さらに、XFELを使用して、微結晶から2.4 Åの高解像度構造データを取得した。Swiss Light SourceでのAcoustic Levitation Diffractometer (ALD) を用いた常温でのX線回折実験では、超音波領域内に浮揚したフィルム上の結晶に対してX線を照射し、様々な方位からの反射点を収集することで、励起光照射から14秒後まで2秒ごとの時分割でのデータ収集を行い、2.2-2.4 Åの分解能で明らかにした。また、PF (Photon Factory) でのクライオ条件下での構造解析では、室温にて青色LEDで照射後、瞬時にクライオ吹付装置で凍らせる方法を用いて照射後3~15秒の状態の結晶構造を1.7 -1.9 Åの分解能で明らかにし、BLUFドメイン内のFlavinと近傍残基Gln48が近づく動きを観測し、その動きが3秒後にはGln48の動きが完了していることを示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Park Jae-Hyun, Kawakami Kouki, Ishimoto Naito, Ikuta Tatsuya, Ohki Mio, Ekimoto Toru, Ikeguchi Mitsunori, Lee Dong-Sun, Lee Young-Ho, Tame Jeremy R. H., Inoue Asuka, Park Sam-Yong	4. 巻 14
2. 論文標題 Structural basis for ligand recognition and signaling of hydroxy-carboxylic acid receptor 2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-42764-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishimoto Naito, Park Jae-Hyun, Kawakami Kouki, Tajiri Michiko, Mizutani Kenji, Akashi Satoko, Tame Jeremy R. H., Inoue Asuka, Park Sam-Yong	4. 巻 14
2. 論文標題 Structural basis of CXC chemokine receptor 1 ligand binding and activation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-39799-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Heo Y, Ishimoto N, Jeon YE, Yun JH, Ohki M, Anraku Y, Sasaki M, Kita S, Fukuhara H, Ikuta T, Kawakami K, Inoue A, Maenaka K, Tame JRH, Lee W, Park SY.	4. 巻 20(8)
2. 論文標題 Structure of the human galanin receptor 2 bound to galanin and Gq reveals the basis of ligand specificity and how binding affects the G-protein interface.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS Biol.	6. 最初と最後の頁 e3001714.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3001714.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Park JH, Iwamoto M, Yun JH, Uchikubo-Kamo T, Son D, Jin Z, Yoshida H, Ohki M, Ishimoto N, Mizutani K, Oshima M, Muramatsu M, Wakita T, Shirouzu M, Liu K, Uemura T, Nomura N, Iwata S, Watashi K, Tame JRH, Nishizawa T, Lee W, Park SY.	4. 巻 606(7916)
2. 論文標題 Structural insights into the HBV receptor and bile acid transporter NTCP.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature.	6. 最初と最後の頁 1027-1031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-04857-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kim S, Yoon I, Son J, Park J, Kim K, Lee JH, Park SY, Kang BS, Han JM, Hwang KY, Kim S.	4. 巻 35(4)
2. 論文標題 Leucine-sensing mechanism of leucyl-tRNA synthetase 1 for mTORC1 activation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109031	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 MS, Liang M, Sierra RG, Lane TJ, Zhou L, Weierstall U, Zatsepin NA, Ohki M, Tame JRH, Park SY, Spence JCH, Zhang W, Schmidt M, Lee W, Liu H.	4. 巻 118(13)
2. 論文標題 Early-stage dynamics of chloride ion-pumping rhodopsin revealed by a femtosecond X-ray laser.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2020486118	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 Yun JH, Park JH, Jin Z, Ohki M, Wang Y, Lupala CS, Liu H, Park SY*, Lee W*	4. 巻 432
2. 論文標題 Structure- Based Functional Modification Study of a Cyanobacterial Chloride Pump for Transporting Multiple Anions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Mol Biol	6. 最初と最後の頁 5273-5286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2020.07.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shibayama N*, Sato-Tomita A, Ohki M, Ichianagi K, Park SY.	4. 巻 117
2. 論文標題 Direct observation of ligand migration within human hemoglobin at work.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 4741-4748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1913663117	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 Yun JH, Ohki M, Park JH, Ishimoto N, Sato-Tomita A, Lee W, Jin Z, Tame JRH, Shibayama N, Park SY*, Lee W*	4. 巻 6
2. 論文標題 Pumping mechanism of NM-R3, a light-driven bacterial chloride importer in the rhodopsin family.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Adv.	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aay2042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 un JH, Li X, Park JH, Wang Y, Ohki M, Jin Z, Lee W, Park SY, Hu H, Li C, Zatssep N, Hunter MS, Sierra RG, Koralek J, Yoon CH, Cho HS, Weierstall U, Tang L, Liu H, Lee W.	4. 巻 294
2. 論文標題 Non-cryogenic structure of a chloride pump provides crucial clues to temperature-dependent channel transport efficiency.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 794-804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.004038	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 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大木 規央、富田 文菜、松永 茂、伊関 峰生、ティム ジェレミー、柴山 修哉、朴 三用
2. 発表標題 光活性化アデニル酸シクラーゼの構造生物学的考察
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2020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
研究 分担者	梅名 泰史  (Umena Yasufumi)  (10468267)	名古屋大学・シンクロトロン光研究センター・准教授   (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	別所 義隆  (Bessho Yoshitaka)  (70242815)	国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター・客員研究員    (82401)	

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