

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14907

研究課題名(和文) 青色光受容体の改変による紅色光合成細菌の走光性の創出

研究課題名(英文) Construction of artificial blue light receptor for synthetic phototaxis of purple photosynthetic bacteria

研究代表者

浅井 智広 (Azai, Chihiro)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：70706564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、鞭毛モーターの回転方向を光で制御可能な走光性センサーを創出するべく、クラスIとIIのHKのキメラ化によるCheAの機能改変を試みた。LOV-HKであるYF1のLOVドメインにCheAのC末端キナーゼドメインを連結した、人工青色光受容体タンパク質「YC」を設計した。大腸菌の運動性の光依存的な変化をスクリーニングできる系を構築し、YCが光依存的にリン酸化活性を変化させることを見出した。YCの組換えタンパク質は、LOVドメインにフラビンを結合し、光励起によるCysアダクト形成とその崩壊による光変換能を有していた。これは、クラスIとIIのHKの機能的なキメラの作製の初めての成功例である。

研究成果の概要(英文)：Through the course of this project, we tried to construct a chimera of class I and II histidine kinases (HK) to construct a photoresponsive HK that enable us switch the rotation direction of bacterial flagellar motors by light irradiation. We designed an artificial blue-light receptor protein "YC", which is a chimera of LOV-HK and CheA, based on homology in their atomic structures. Swarming assay of the YC-expressed *E. coli* showed acquired phototactic response by the light-dependent autophosphorylation activity of YC. The recombinant YC protein had a photoconvertible flavin cofactor that adducts to the conserved Cys residue of the LOV domain. This is the first successful report for functional fusion of the class I and II HKs.

研究分野：光生物学

キーワード：走光性 鞭毛モーター LOV CheA ヒスチジンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

紅色光合成細菌は、酸素非発生型光合成を行うプロテオバクテリアである。その光合成系はコンパクトな環状の電子伝達系からなり、還元力が系外から流入したり、系外へ流出したりする経路が存在しない。仮に、光合成で生成したプロトン駆動力を恒常的に消費するプロセスが進行していれば、理論上、細胞が耐える限り、環状の光合成電子伝達系が駆動し続ける。この仮説の実証と応用を目的に、環状の光合成電子伝達系で生成するプロトン駆動力を全て鞭毛モーターの回転に利用させ、光エネルギーで紅色光合成細菌を恒常的に遊泳させることを考えた。

細菌の多くは鞭毛を持ち、根元のモーターの回転方向を変えることで最適な環境へ遊泳する。この鞭毛モーターは二成分制御系でコントロールされており、ヒスチジンキナーゼ(HK)である CheA の自己リン酸化状態に応じて、鞭毛の回転方向が切り替わる。(J.A. Gegner *et al.* *Cell* 1992)。一方、細菌の HK には光に応じてリン酸化活性が変化するものが知られており、光センサードメインとして LOV ドメインを持つため、LOV-HK と呼ばれている (T.E. Swartz *et al.*, *Science* 2007)。これら HK は 2 種類に大別され、それぞれはドメイン構造が異なる。クラス I HK には LOV-HK を含む多様な環境センサーが存在し、クラス II HK は CheA のみが知られている。

これまで、クラス I と II の HK は異なる活性制御機構をもつと考えられてきたため、両者の機能を融合させるような CheA の機能改変に前例はなかった。しかし最近になって、クラス I と II の HK の触媒活性の制御が、それぞれ $J\alpha$ -DHP ドメイン (クラス I) と P3 ドメイン (クラス II) という、立体構造が酷似したドメインの構造変化で制御されていることが指摘された (R.P. Diensthuber *et al.*, *Structure* 2013; X. Wang *et al.*, *Biochemistry* 2014)。そこで、ヒスチジンキナーゼ活性をもつ青色光受容体を改変し、鞭毛モーターの回転を光で制御できるようにすることで、光合成で生成するプロトン駆動力を細胞遊泳の運動エネルギーに持続的に変換する方法を着想した。

2. 研究の目的

本研究課題では、クラス I と II の HK の活性は類似した共通の作動機構で制御されていることを仮定し、クラス I と II の HK の間でドメインを組み換えた機能的なキメラ型タンパク質の作製を目的とした。クラス I HK の代表として LOV-HK を利用し、LOV-HK のセンサードメインである LOV ドメインと CheA を機能的に融合することで、CheA の青

色光受容体化、走光性センサー化を目指した。これにより、細菌の鞭毛の回転を光で制御できる光受容体タンパク質を創出できると考えた。この新奇な青色光受容体の異種発現により、紅色光合成細菌に人工的に走光性を付与することを本研究課題の最終目標とした。この改変によって、光源に向かう正の走光性をもち、光合成を行いながら恒常的に遊泳する紅色光合成細菌を作製できると考えた。

3. 研究の方法

本研究課題では当初、進捗状況に併せて研究計画を「CheA-CheY 系を制御可能な青色光受容体タンパク質の創出」(Project-1)、「LOV-CheA タンパク質による紅色光合成細菌の走光性の制御」(Project-2) という二段階に分けた。Project-1 は、鞭毛モーターの回転を制御するヒスチジンキナーゼ CheA と、ヒスチジンキナーゼ活性をもつ青色光受容体 LOV-HK のキメラ化により、新奇な光受容体タンパク質を作製するものである。Project-2 は、Project-1 で得られた新奇な青色光受容体を紅色光合成細菌に異種発現させて、光合成による持続的な遊泳が可能な紅色光合成細菌を作製するものである。Project-2 の可否は明らかに Project-1 の進捗に依存するため、今回の研究では Project-1 を集中的に進めることとした。

鞭毛モーターの回転方向を光で制御可能な走光性センサーを創出するべく、クラス I と II の HK のキメラ化による CheA の機能改変を試みた。具体的には、LOV-HK の LOV ドメインに CheA の C 末端キナーゼドメインを連結した、人工青色光受容体タンパク質「YC」を設計した。LOV ドメインには、分子量 41.8 kDa の人工 LOV-HK である YF1 を選んだ。YF1 は、根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* の酸素センサーHK である FixL の 2 つの PAS ドメイン含む N 末端センサードメインを、枯草菌 *Bacillus subtilis* の青色光受容体 YtvA の LOV ドメインで、互いの $J\alpha$ ヘリックスを重ねるように置き換えたキメラ型 HK である (A. Möglich *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2009)。YF1 の LOV ドメインは、元の YtvA の LOV ドメインと同様にフラビンモノヌクレオチド (FMN) を結合し、光サイクルでの活性化状態 (Cys アダクト) の寿命は約 60 分である (A. Losi *et al.*, *Biophys. J.* 2002)。YF1 と CheA の連結には、両者の立体構造を参考にして進めた。YF1 二量体中の $J\alpha$ -DHP ドメインと、好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来の CheA の C 末端ドメイン (Δ (P1-P2)) の二量体中の P3 ドメインの構造を比較すると、4 本の α ヘリックスの束の構造が酷似している (図 1)。

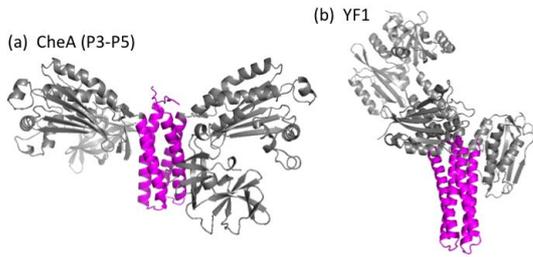


図1. *Thermotoga maritima* CheA (a;1B3Q)とYF1 (a;4GCZ)の構造比較
CheAのP3ドメインとYF1のDHpドメインをマゼンタ色で示した。

立体構造の類似性から、CheAのP3ドメインの α ヘリックスと、YF1の $J\alpha$ -DHpドメインの α ヘリックスが、同じ作動原理でHK内部のドメイン間シグナル伝達を担っていると考えた。そこで、YF1のLOVドメインとCheAのキナーゼドメインを $J\alpha$ -DHpドメインとP3ドメインを重ねるように連結することで、YF1とCheAのキメラ型HKであるYCタンパク質を設計した。設計したYCタンパク質の機能を*in vivo*と*in vitro*の両面から調べ、それを基にクラスIとIIのHKを機能的に融合させる方法を考察した。

4. 研究成果

(1) YCタンパク質の*in vivo*機能解析

CheAとYF1の構造比較によって設計したYCタンパク質において、クラスIとIIのキメラ型HKの機能が保持されているかを明らかにすることが、本研究の主要な目的である。そこでまず、YCタンパク質による光依存的な運動性の変化を大腸菌で観察する実験系を構築することにした。大腸菌の走化性による細胞遊泳はCheA-CheYの二成分制御系のみで制御されている(J.S. Parkinson *et al.*, *Trends Microbiol.* 2015)。これを利用し、*cheA*遺伝子と*cheW*遺伝子の二重破壊によって走化性を不活化した大腸菌変異株を用意し、そこに設計したYCを、CheAのリン酸基転移ドメインであるP1ドメインと共に強制発現させることで、YCの機能を光依存的な大腸菌の運動性として観測する*in vivo*スクリーニング系を構築した。ただし、現時点で*in vivo*でのYCの光応答性の閾値や応答速度は不明であり、YCの発現によって環境の光強度に追従した鞭毛モーターのスイッチングを観察することは難しいと考えられた。そのため、完全な明暗条件下でSwimming(CCWの鞭毛回転)かTumbling(CWの鞭毛回転)に固定された遊泳パターンを、軟寒天培地上でのコロニーの大きさとして可視化するSwarmingアッセイを行った(図2)。

Swarmingアッセイでは、CheAの自己リン酸化活性が抑制されると大腸菌はSwimmingして大きなコロニー、CheAの自己リン酸化活性が活性化されるとTumblingして小さなコロニーを与える(J.S. Parkinson, *J. Bacteriol.*

1976)。走化性を不活化した大腸菌変異株では、暗条件と明条件でコロニーの大きさに有意な差は現れなかったのに対し、DHpドメインあるいはP3ドメインでキメラ化したYCタンパク質(YS、YL)では明条件で暗条件よりも大きなコロニーとなった。これは、YCタンパク質が光依存的な自己リン酸化活性をもち、CheYのリン酸化状態を光依存的に変化させることを示している。おそらくYCタンパク質は、暗条件で自己リン酸化活性をもち、明条件でその活性が抑制されているものと推定される。

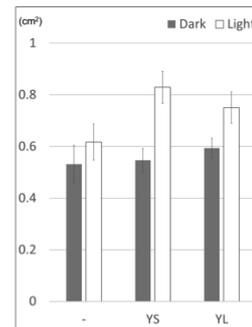


図2. YCタンパク質の発現による大腸菌の光依存的な運動性
暗条件(Dark)と明条件(Light)での大腸菌のコロニーの大きさを示した。

(2) YCタンパク質の*in vitro*機能解析

大腸菌の運動性による*in vivo*スクリーニングの結果、本研究で設計したYCタンパク質が光依存的なリン酸化活性をもつことが示唆された(図2)。設計したYCタンパク質の、LOVドメイン由来の光変換能、およびCheA由来のHK活性を詳細に解析するため、大腸菌で過剰発現させた組換えタンパク質を精製し、タンパク質自体の生化学的な機能を*in vitro*で調べた。

N末端Hisタグ付きのYCタンパク質を大腸菌C41(DE3)株で過剰発現させたところ、Ni²⁺固定化樹脂を使用したアフィニティクロマトグラフィによって、高純度のYCタンパク質を精製することができた。精製したYCタンパク質は、完全な暗所で黄色を呈していたが、環境光に曝されると徐々に無色透明となった。その吸収スペクトルは、暗条件で中性酸化型のフラビンに由来するスペクトルを示したが、飽和光照射下の明条件では、LOVドメインとのCysアダクト形成を示す、390 nmをピークとした線幅の広いスペクトルに変化した(図3)。明条件のCysアダクト形成後の状態から光照射を止め、暗状態へ緩和する過程を追跡した結果、Cysアダクトの寿命はYSで約60分、YLで約80分と推定された。これは、YCの設計にもちいたYtvAのLOVドメインのCysアダクトの寿命とよく一致している。従って、YCタンパク質のLOVドメインはYtvAと同等の光変換能を有すると推定された。

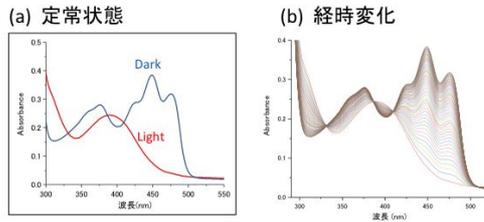


図3. 精製YCタンパク質の吸収スペクトルとその時間変化

精製したYCタンパク質(YL)の、暗条件(Dark)と明条件(Light)それぞれの定常状態での吸収スペクトル(a)と、明条件から暗条件へ移した際の経時的な吸収スペクトルの変化(b)を示した。

次に精製 YC タンパク質の HK 活性を、タンパク質のリン酸化を電気泳動法で検出できる Phos-tag SDS-PAGE (T. Minamino *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008) で調べた。CheA のリン酸化部位となる His 残基は、リン酸基転移ドメインである P1 ドメインに存在する。そこで P1 ドメインを N 末端 His タグ付きの組換えタンパク質、P1 タンパク質として別に精製し、YC タンパク質と ATP 存在下で混合したときのリン酸化状態を暗条件と明条件で調べた。しかし、YC タンパク質の添加や明暗条件の違いで、P1 タンパク質の Phos-tag PAGE は変化せず、YC タンパク質の HK 活性は検出できなかった。この結果は *in vivo* 解析のスクリーニング結果と矛盾しているが、現時点でその原因は解明できていない。これまで報告されている CheA の *in vitro* 実験では、精製から活性測定までを通して、塩として NaCl ではなく KCl が使用されている。他の ATP 加水分解酵素とのホモロジーから CheA は GHKL ATPase スーパーファミリーに分類されているが、GHKL ATPase では Na⁺や K⁺ が結合し得る一価陽イオン結合サイトがある (X. Hu *et al.*, *FEBS lett.* 2003)。CheA の HK 活性が一価陽イオンの影響を受け、Na⁺の結合で阻害、K⁺の結合で抑制される可能性が考えられる。本研究では YC タンパク質および P1 タンパク質の精製に 150 mM の NaCl を使用していたため、強い Na⁺の結合によって HK 活性が抑制されてしまっていた可能性が高い。

(3) 結論と今後

本研究の結果、クラス I HK である LOV-HK とクラス II HK である CheA のキメラ化に成功した。これは、これまで作動機構が異なるとされてきたクラス I HK とクラス II HK が、機能的に融合可能であることを示す初めての実験的証拠である。今後は、YC タンパク質の光依存的な CheA の HK 活性を最適化していくことで、クラス I HK とクラス II HK に共通した作動機構や両タンパク質の進化過程の実証研究が進むと期待される。その一步として、本研究で生化学的に検出できなかった YC タンパク質の HK 活性について、詳細なキャラクタリゼーションが必要である。

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1件)

C. Azai, M. Kobayashi, T. Mizoguchi, H. Tamiaki, K. Terauchi, Y. Tsukatani (2018) "Rapid C8-vinyl reduction of divinyl-chlorophyllide *a* by BciA from *Rhodobacter capsulatus*" *J. Photochem. Photobiol., A*, 353(15):661-666. (査読有) DOI: 10.1016/j.jphotochem.2017.09.010

[学会発表](計2件)

下地 真美子、福原 友輔、笠原 賢洋、寺内 一姫、浅井 智広
「異なるクラスのヒスチジンキナーゼを融合した人工青色光受容体タンパク質の作製」第 59 回 日本植物生理学会年会 (2018)
下地 真美子、福原 友輔、笠原 賢洋、寺内 一姫、浅井 智広
「光応答性 CheA タンパク質の設計：異なるクラスのヒスチジンキナーゼのキメラ化」第 12 回日本ゲノム微生物学会年会 (2018)

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅井 智広 (AZAI, Chihiro)
立命館大学・生命科学部・助教
研究者番号：70706564

(2)研究協力者

下地 真美子 (SHIMOJI, Mamiko)