

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02413

研究課題名(和文) 光遺伝学による光活性化アデニル酸シクラーゼ合成酵素(PAC)の創成

研究課題名(英文) Molecular mechanism of photoactivation of a light-regulated adenylate cyclase

研究代表者

朴 三用(Park, Sam-Yong)

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：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いない。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光産生酵素の創出による光制御医学ツールとして基礎医学的研究で、反応機構解明を向けて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)を利用し、光感受性タンパク質の多様な光応答機構の解明に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

青光により活性化アデニル酸シクラーゼcAMP分子を量産する酵素として、特性解明や生物機能光制御への展開も提唱・実行してきた。本申請者は、PACの相同遺伝子であるOaPACの立体構造解明に世界初めて成功し、光活性化機構に関する構造科学的な研究は本研究グループが先駆的に積み上げてきた。神経興奮の光制御、いわゆる光遺伝学、が急速に普及し、OaPACによるcAMPを介する生体機能光制御も概念上同類とみなされつつあるが、はるかに広範で多彩な生命活動の光制御につながり、血管新生・脳病変原生・神経回路ネットワーク・記憶などの光発生医学現象の制御・解明・治療・創薬スクリーニング開拓を先導するものである。

研究成果の概要(英文)：Optogenetics is a rapidly growing field in which light is used to control biological systems. We show that OaPAC protein produces the fundamental second messenger cyclic-AMP (cAMP) in response to blue light, is stable and functional in human cells, and can therefore be used to trigger events by raising cAMP level. OaPAC consists of a catalytic domain controlled by a photosensitive BLUF domain. We have solved the crystal structure to show how activity is triggered by light, and guide mutagenesis experiments. Although the catalytic domain resembles known cyclases, the BLUF domains form an unusual intertwined structure. The protein activity is the same in solution as in the crystal, showing that the activation mechanism involves only very small molecular movements.

研究分野：構造生物学

キーワード：光活性化アデニル酸シクラーゼ 光反応酵素 光遺伝学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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 光産生酵素の創出による光制御医学ツールとして基礎医学的研究を目指す。

PAC は日本の研究グループによって発見されたタンパク質で、青光により活性化アデニル酸シクラーゼ cAMP 分子を量産する酵素として、特性解明や生物機能光制御への展開も提唱・実行してきた (*Nature*, 2002)。本申請者は、PAC の相同遺伝子である OaPAC の立体構造解明に世界で初めて成功した (*PNAS*, 2016; *PNAS*, 2017)。また、光活性化機構に関する構造科学的な研究は本研究グループが先駆的に積み上げてきた。同じく植物プランクトン起源である、クラミドモナス由来のチャンネルロドプシン(光活性化陽イオンチャンネル)によって、神経興奮の光制御、いわゆる「光遺伝学、optogenetics」が急速に普及し、OaPAC による cAMP を介する生体機能光制御も概念上同類とみなされつつあるが、はるかに広範で多彩な生命活動の光制御につながり、血管新生・脳病変原生・神経回路ネットワーク・記憶などの光発生医学現象の制御・解明・治療・創薬スクリーニングという広大な新分野の開拓を先導するものであり、かつ独創的な新領域の研究分野であると言える。今後、先端的・先導的な構造生命科学的解析を基盤として、刺激波長特性や基質特異性の異なる OaPAC の創出や高感度化など、優れた特性の改良型 OaPAC の創出とそれに基づく広範で多彩な応用展開につながることを期待できる。

2. 研究の目的

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 光産生酵素の創出による光制御医学ツールとして基礎医学的研究で、反応機構解明を向けて 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)を利用し、光感受性タンパク質の多様な光応答機構の解明することが目的である。

3. 研究の方法

OaPAC の微結晶をオイルバッチ法により作製を行った。得られた微結晶の密度は 1.1×10^8 個/mL と 2.2×10^8 個/mL で得ることができた。また、サイズについては平均 24.6 μm で、XFEL で測定するため、これらの微結晶をグリースと混合し、その相性確認を行った。微結晶はグリースと混合溶液に溶けず、割れる等の変化は見られなかった。その後、カートリッジに充填し、インジェクターに設置後、XFEL を用いた回折実験を行なった。最大分解能 2.2 \AA でおおよそ 3.5 \AA ほどのデータが得られることがわかったものの、Hit rate が 8% と低かったため、結晶濃度を上げることを検討した。その結果、微結晶密度が 2 倍で混合し、測定を行なった結果、Hit rate が 12~13% と改善傾向が見られた。また、最大分解能は 1.9 \AA であり、最終的に 5000 枚の回折像から、2.4 \AA で構造解明することができた。

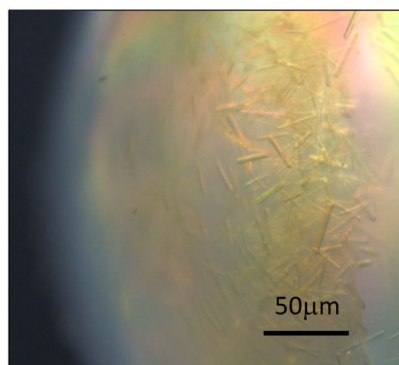


図. OaPAC の微小結晶写真と結晶の大きさ

4. 研究成果

XFEL による光感受性アデニル酸シクラーゼ(OaPAC)の光応答機構の解明するため、単結晶の結晶化条件を微結晶調製用に改良することを試みた。しかしながら回折能のある結晶出現の頻度が低く、その歩留まりは 10% 程度であった。微結晶となるとさらに低い再現性の中で回折能のある微結晶の大量調製方法を探る困難があったため、OaPAC タンパク質調製方法(プラスミドコンストラクティングや発現条件)の検討を行なった。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 in-house の X 線回折装置で実施し、それを微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結晶の大量調製方法の検討を行なった。その結果、タンパク質濃度 20 mg/ml、リガンドとして ATP アナログである ApCpp 存在下でオイルバッチ法により回折能のある微結晶を調製することが可能となり、SACLA における回折実験が可能レベル(2×10^8 個/ml 程度)で微結晶サンプルを調製することに成功した。微結晶は細長い米粒状の形状をしており、各結晶の長軸の長さは平均 27 μm 程度であった(図)。この微結晶サンプルをグリースと混合し、SACLA の XFEL を利用した SFX(serial femtosecond

crystallography)測定を行なったところ、2.4 の分解能で構造解析を行うことができた。得られた電子密度は OaPAC の光受容部分である BLUF ドメインのフラビン分子近傍の温度因子が高く、これを改善する必要があると考えられた。これが測定温度の影響かどうかを調べるための予備実験を現在進めている。また、微小結晶の大きさは 60~70 μm 程度が理想とされているため、結晶を大きくし、且つ大きさのばらつきを抑える微小結晶調製方法の探索を引き続き行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 1. Iwamoto M, Saso W, Sugiyama R, Ishii K, Ohki M, Nagamori S, Suzuki R, Aizaki H, Ryo A, Yun JH, Park SY, Ohtani N, Muramatsu M, Iwami S, Tanaka Y, Sureau C, Wakita T, Watashi K.	4. 巻 116
2. 論文標題 Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 8487-8492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1811064116	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 2. Yun JH, Li X, Park JH, Wang Y, Ohki M, Jin Z, Lee W, Park SY, Hu H, Li C, Zatsepin 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 -
1. 著者名 Lee JG, Youn HS, Kang JY, Park SY, Kidera A, Yoo YJ, Eom SH.	4. 巻 506
2. 論文標題 Crystal structure of the Ube2K/E2-25K and K48-linked di-ubiquitin complex provides structural insight into the mechanism of K48-specific ubiquitin chain synthesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 102-107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.10.067	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 該当する
1. 著者名 Kaneko M, Futamura Y, Tsukuda S, Kondoh Y, Sekine T, Hirano H, Fukano K, Ohashi H, Saso W, Morishita R, Matsunaga S, Kawai F, Ryo A, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Ohtani N, Sureau C, Wakita T, Osada H, Watashi K.	4. 巻 2769
2. 論文標題 Chemical array system, a platform to identify novel hepatitis B virus entry inhibitors targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci 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） 10.1038/s41598-018-20987	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	小山 隆太 (Koyama Ryuta) (90431890)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授 (12601)	

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
---------	---------