

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03188

研究課題名（和文）天然3D結晶型光センサーオルガネラのアーキテクチャー

研究課題名（英文）Architecture of photosensing organelle with PAC of 3D periodic structure

研究代表者

岩崎 憲治（Iwasaki, Kenji）

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・教授

研究者番号：20342751

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）：ミドリムシの光センサーの正体は1世紀近く謎だったが、21世紀に入って総研大の渡辺博士らによって同定された。光驚動反応の中のステップアップ驚動反応を担う分子だったが、その分子構造を本基盤研究において原子レベルで解明することに成功した。特に困難を要したヘテロ4量体のN末端相互作用部位を解明することに成功した。クライオ電子顕微鏡単粒子解析法の利点を活かし、Focused classificationによって四量体中心に存在する有意な密度をもつ領域の再構成構造の品質改善を行った。特に追加データを得ることなく、シートによる相互作用様式が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質による光センシングのメカニズムは様々だが、このミドリムシの光センサーは、青色光を受光すると、ATPから環状AMPを生成するアデニル酸シクラーゼという酵素活性機能を内包する。よって、この光センサーを遺伝的に細胞に導入できれば、人為的に青色光で細胞内の環状AMPの濃度を変化させることができる。環状AMPは、主要な細胞内セカンドメッセンジャーであるので、細胞生物研究の強力なツールとなる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：The identity of the light sensor of *Euglena* was a mystery for nearly a century, but it was isolated and characterized in the 21st century by Dr. Watanabe and colleagues at SOKENDAI. The molecular structure of the molecule, which is responsible for the step-up photophobic response in the photophobic responses, was successfully elucidated at the atomic level in this Grant-in-Aid for Scientific Research (B). We succeeded in clarifying the N-terminal interaction site of the heterotetramer, which was particularly challenging. Taking advantage of the single-particle cryo-EM method, we improved the quality of the reconstructed structure of the region with significant density in the center of the tetramer by Focused classification. The interaction mode by the β -sheet was clarified without any additional data.

研究分野：クライオ電子顕微鏡

キーワード：クライオ電子顕微鏡 単粒子解析 ミドリムシ 光センサー

1. 研究開始当初の背景

ミドリムシの光応答は大きく3つに分かれる。走行性、光驚動反応、光キネシスの3つである。光驚動反応は、さらに、光強度の急激な上昇に応じて運動方向を転換するステップアップ光驚動反応と、その逆の急激な光強度の減少に応答して運動方向を転換するステップダウン光驚動反応に分かれる。これら遊走方向をコントロールする光センサーは1世紀来の謎だったが、2002年にステップアップ光驚動反応に関する正体がフラビンタンパク質 Photoactivated Adenylyl Cyclase (PAC) であることが報告された。PACは内部に有するアデニル酸シクラーゼを青色光で80倍ほど活性化させる。PACは、1019アミノ酸残基の α サブユニットと859アミノ酸の β サブユニットから構成されている。それぞれのサブユニットがアデニル酸シクラーゼドメインを2箇所有し、Flavin Adenine Dinucleotide (FAD)結合部位を2箇所有していた。しかしその光センシングによるアデニル酸シクラーゼの活性化機構は未だに謎である。

2. 研究の目的

α および β サブユニットが、それぞれ2サブユニットずつ集まって会合したヘテロ4量体であることが示唆されていた。そこで、PFBの原子構造を解明することで、ヘテロ4量体構造であることを確かめると同時に光応答の機構解明の基盤となる情報を得る。さらに光応答によって起きるPACの構造変化を捉えることができれば、その全容解明になる。また、PACが三次元結晶状に並んで光センサー器官PFBを形成していることを申請者は示してきた。なぜ天然で三次元結晶を作っているのか。申請者は、「素早い光応答を行うために局所的なcAMPの急激な濃度上昇を引き起こす三次元結晶が有効であった」という仮説を立てた。PAC一分子の光応答機構からこの仮説の検証を行うことを試みる。

3. 研究の方法

(1) クライオ電顕単粒子構造解析によりPACの完全な原子構造の解明を行い、分子中央構造の役割、 α サブユニットのC末端の役割を明らかにする。

(2) PACの青色応答時における構造変化の解明をめざし、青光照射とシンクロナイズした時分割サンプル凍結装置の開発を行う。

(3) (2)の開発によって、PAC一分子内の暗状態と光刺激後の状態間における構造変化を解明する。クライオ電子顕微鏡データの単粒子解析を行うが、その際、可動領域と非可動領域に分けて個別に解析できるマルチボディアライメント技術を導入する。

4. 研究成果

(1) クラクライオ電子顕微鏡(電顕)データは、大阪大学蛋白質研究所の廣瀬未果氏が試料を準備し、同所属の杉田征彦博士(現:京都大学)がクライオ電子顕微鏡Titan Krios G2を用いて収集したものを使用した。

その後の単粒子解析を筑波大学で行った(図1)。

収集した4,484電顕画像について、試料微動をMotionCor2により見積った。続いてコントラスト伝達関数(CTF)で表される変調を補正するためのパラメータをGctfにより決定した。この補正後の画質の良い4,224電顕画像について、Gautomatchにより粒子の自動抽出を行い、RELION3.0により1,523,728枚のPAC分子の画像(粒子画像とよぶ)を切り出した。以降の単粒子解析はRELION3.0により行った。まず、1,523,728粒子画像に対して二次元クラス分類を行い、二次元クラス平均画像で均一な構造を示したクラスに属する601,205粒子画像を選択し、D2対称性で生成した三次元初期モデルを参照して対称性なし(C1)の三次元クラス分類を行った。次に、分類された4クラスのうち最も解像度が高く、含まれている粒子数が多いクラスAを参照構造として、もう一度601,205粒子に対してC2対称性を適用した三次元クラス分類を行った。解像度が高く、含まれている粒子数が多いクラスiを選択し、そのクラスに含まれている449,596粒子を使用して構造精密化を行い、最終的に3.4Å分解能で電顕密度図を得た(図2左)。

得られた電顕密度図に対して、 α サブユニットの55~426残基、465~795残基、および β サブユニットの56~427残基、469~797残基(周辺領域と呼ぶ)について原子モデルを構築した(図2右)。一方で、 α サブユニットの1~54残基および β サブユニットの1~55残基が存在することが予想されるPACの中心部分には、原子モデル構築が困難な低解像度の密度領域が有意にあった(図3左)。そこで、その領域の三次元再構成像改善に取り組んだ結果、原子モデリングに成功し、N末端領域に相当する密度であることも判明した(図3右)。PACは、全体ではC2対称性を持ち、C2軸に直交して α および β サブユニット2分子ずつが配置しており、その大きさは、約 $130 \times 130 \times 80 \text{ \AA}^3$ であることがわかった。隣接するサブユニットは、BLUFドメインとACドメインが近接するように互いに逆方向に会合していた。

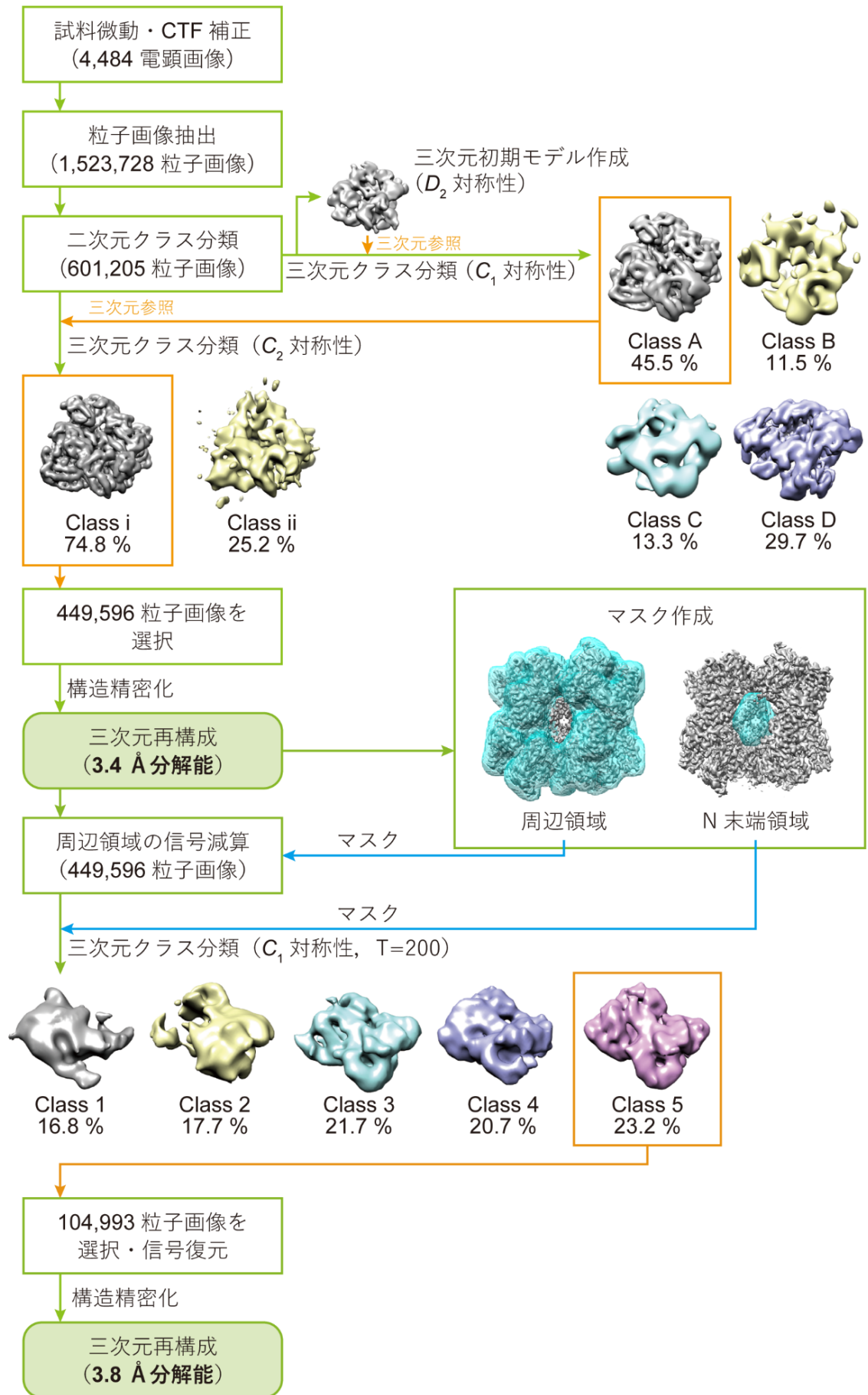


図 1 単粒子解析フローチャート

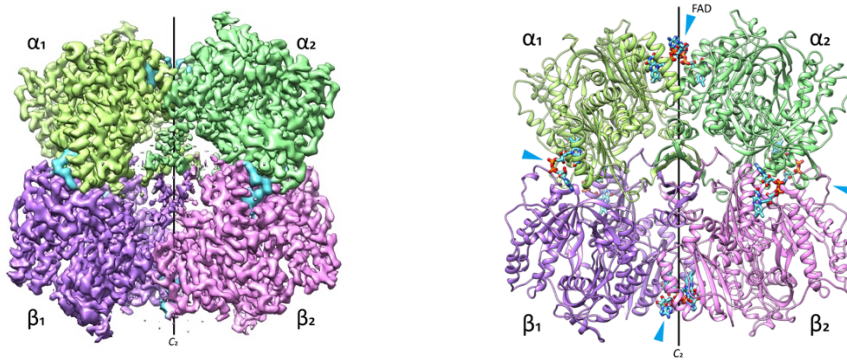


図2 (左) 449, 596 粒子画像から得られた PAC の三次元再構成像 (FSC 分解能 3.4 Å) (右) 左の三次元再構成像を使って原子モデリングした構造。

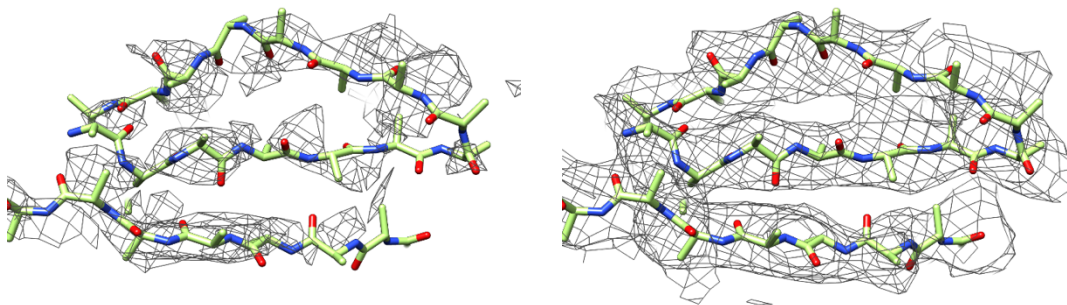


図3 (左) PAC 中心領域の三次元再構成像改善前. 図2 の中心領域の一部拡大に相当. N 末端領域に相当する. (右) PAC 中心領域の三次元再構成像改善後.

BLUF ドメインは α - β 間に 2 つずつ (F1)、 α - α および β - β 間に 2 つずつ (F2) 存在し、FAD は PAC 全体で 8 分子が結合していた。各サブユニット単量体 (α および β サブユニット) は、アミノ酸約 90 残基からなる柔軟なペプチド鎖 (Linker と呼ぶ) で繋がれた二量体構造を形成し、二次構造マッチング (SSM) 法により見積もった両者の立体構造の rmsd は 0.9 Å であることから極めて類似した構造であることが分かった。PAC は、2 つの BLUF ドメインと AC ドメインが両端に局在し、中心部の 2 本の α ヘリックスからなるコイルドコイルによって連結されていた。Central N-ter と名付けた N 末端側約 50 残基の立体構造は、これまでの PAC には見られなかった新規のものである。

PAC は 2 種類のサブユニットからなるヘテロ四量体であるため、 α - β 間にある異種サブユニット間相互作用と α - α および β - β 間にある同種サブユニット間相互作用が存在する。さらに、サブユニット間の相互作用領域は周辺領域と N 末端領域に分けられる。

周辺領域において、異種サブユニット間には、 α ヘリックスや β ストランド、ループが近接し、広い領域にわたって水素結合および疎水的・静電的な相互作用の存在が示唆された。このサブユニット界面には FAD のアデニン鎖が挿入されており、FAD との水素結合を介した相互作用もみられた。

α - α および β - β サブユニット間には、 α ヘリックスを介した水素結合および疎水的・静電的な相互作用が示唆された。しかし、それ以外に残基が近接している部分はなく、異種サブユニット間に比べて相互作用領域が狭かった。また、同種サブユニット間における FAD の結合位置は相互作用部位から遠いため、サブユニット間相互作用には関与しないと考えた。したがって、周辺領域においてサブユニットは α - β 間で強い相互作用を、 α - α および β - β 間では比較的弱い相互作用をもつことでヘテロ四量体の安定化に寄与していると考えた。周辺領域の限定的なサブユニット間相互作用の一方で、N 末端領域は PAC 中心部で会合しているため、ヘテロ四量体の安定化への寄与が大きいことが予想された。各サブユニットの N 末端側約 50 残基は、3 本の β ストランドと 1 本の α ヘリックスを形成し、BLUF ドメインの

N末端にあるロイシンへと続く。同一サブユニット内の3本の β ストランドは逆平行 β シートを形成しているほか、これらは α - β サブユニット間でも逆平行 β シートを形成していることが示唆された。主鎖による相互作用はこれ以外には観察されず、特に同種サブユニット間の相互作用が観察されなかった。ポリアラニンモデルであるため詳細な相互作用様式に言及することはできないが、 β ストランド1~3を形成していると推察される領域には疎水性残基が多く含まれていることから、これらの残基が12本の β ストランドからなる中心部分で疎水性コアを形成し、ヘテロ四量体の安定化に寄与していることが推察された。また、 $\alpha 1$ は周辺領域に近い位置にあるため、側鎖同士の相互作用が存在する可能性があると考えた。

(2) 実験方法で計画していた(2)と(3)を行うために筑波大学にて新たにミドリムシの培養をスタートして、精製を試みたが、コロナ禍のため大阪大学蛋白質研究所に精製方法を習得に行くことができず、細胞の蓄積のみの日が続いた。このため最終年度の終わりによく精製に成功したところで終了した。光照射とシンクロライズした凍結システムは高エネ研の篠田博士の協力を得てプロトタイプの設置まで行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩崎憲治
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡の特性を活かした構造解析
3. 学会等名 筑波大学・東京理科大学 合同リトリート（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩崎憲治
2. 発表標題 構造生物化学のこれからの課題
3. 学会等名 東工大 세미나 -（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩崎憲治
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡の利点を活かした構造解析
3. 学会等名 第21回 多元物質科学研究所 研究発表会プログラム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩崎憲治
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡単粒子解析の利点と欠点
3. 学会等名 2021年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岩崎研究室
<https://r.goope.jp/tsukuiwaken>

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

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