

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：57101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05758

研究課題名(和文) オプトジェネティクスを促進するビリン色素合成酵素ライブラリの構築

研究課題名(英文) Construction of bilin reductase library, promotes next-generation optogenetics.

## 研究代表者

萩原 義徳 (HAGIWARA, Yoshinori)

久留米工業高等専門学校・生物応用化学科・准教授

研究者番号：10628548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、各光色を受容するビリン色素を生み出す酵素ライブラリを構築することを目的とする。酵素改変によりビリン色素の機能的デザインを行い、光センサータンパク質と組み合わせ、任意の光色を複合的に用いた多スイッチ型マルチタスク制御のオプトジェネティクスの促進を目指した。酵素に電子を供給するタンパク質群の濃度比を調整して酵素反応を進めることで、最終生成物の合成速度だけでなく、酵素反応における中間産物の合成速度と分解速度において、中間産物の安定性も評価した。最終生成物や中間産物と考えられる色素はHPLCで解析し、ビリン色素としての反応中間体の収量を上げるための部位特異的変異酵素の作製も実施した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

ビリン色素はヘムの代謝産物であるため、植物のほか、動物や細菌に至るまで存在する色素である。2017年には、新生児黄疸の原因ともなるビリルビンを合成する酵素の結晶構造が、本研究者が参画した研究によって明らかとなり、ビリン色素の基礎医学的側面からの応用にも光が当てられている(H. Takao, et al., Nat. Commun., 2017)。

生物界に広く存在するビリン色素の改変を目指す本研究によって、有機化学合成が困難なビリン色素を酵素化学的に自在にデザインすることで、光センサータンパク質が鍵を握るオプティジェネティクスの新たな展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to construct an enzyme library that produces bilin pigments accepting each light color. By functionally designing of bilin with enzymatic modification, we combine their bilins with photosensor proteins and aimed to promote optogenetics for multi-switch control using arbitrary light colors.

By adjusting the concentration ratio of the protein group that supplies electrons to the enzyme and proceeding with the enzymatic reaction, not only the synthesis rate of the final product but also the synthesis rate and decomposition rate of the intermediate product in the enzymatic reaction can be evaluated stability. The pigments considered to be final products and intermediate products were analyzed by HPLC. Site-directed mutagenesis was also investigated to increase the yield of intermediate as bilin.

研究分野：構造生物学

キーワード：光合成色素 ビリン色素 オプトジェネティクス 光遺伝学

### 1. 研究開始当初の背景

高等植物の光合成ではクロロフィルが中心的役割を果たすが、ラン藻や紅藻ではこれに加えてビリン色素が用いられる。ビリン色素を結合したフィコビリソームと呼ばれる光捕集アンテナは、吸収した光エネルギーを光化学系 II の反応中心へ伝達する。ラン藻や紅藻は、フィコビリソームのビリン色素の種類や割合を巧みに調節し、生息域の光環境に適応している(補色馴化)。また、ビリン色素は高等植物やラン藻、紅藻の光センサー色素としても用いられ、(バクテリア)フィトクロムタンパク質に光受容体色素として結合する。これが補色馴化や走光性、種子の発芽、開花などの光応答を制御している。さらに、哺乳類ではビリン色素は抗酸化物質として知られ、体内で生じる活性酸素種に対して機能し、細胞内のレドックスバランスを維持している。

ビリン色素は、ヘムがヘムオキシゲナーゼ (HO) の働きによって開裂したビリベルジン IX (BV) が、フェレドキシン依存性ビリン還元酵素 (ferredoxin-dependent bilin reductases, FDBR) によって還元されて合成される開環テトラピロール色素である。FDBR は、BV の異なる部位を還元し、異なる吸収スペクトルを持つビリン色素へ導く(図1)。2006年、本研究者は FDBR の代表である phycocyanobilin:ferredoxin

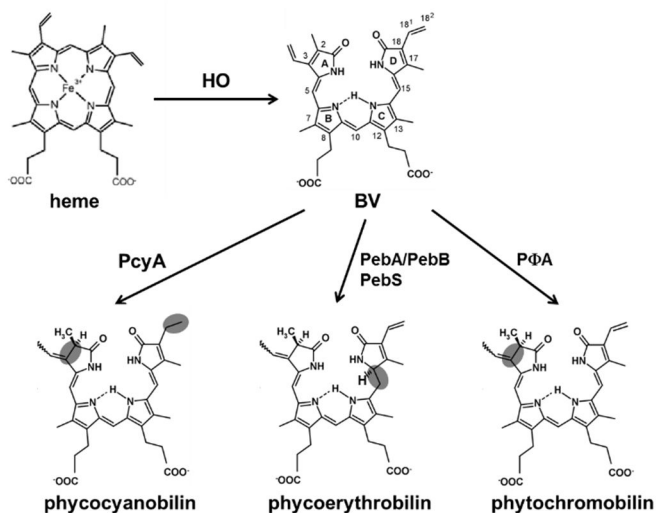


図1. FDBR によるビリン色素合成

oxidoreductase (PcyA) の X 線結晶構造を世界に先駆けて決定し、ビリン色素合成の分子機構解明にブレークスルーを与えた (Y. Hagiwara, et al. PNAS, 2006.)。この結果は多くの研究者によって蓄積されてきた FDBR の生化学的知見を明確化すると共に、以後の研究に指針を示した。そして 2015 年、共同研究にて PcyA の中性子結晶構造解析に成功し、基質や活性残基の水素化状態を明らかにした (M. Unno, et al. JACS, 2015.)。これらにより、PcyA 反応機構の一原子レベルでの理解が進んでいる。

一方、近年注目を浴びているオプトジェネティクスは、光スイッチとなる光駆動型のタンパク質によって、遺伝子発現の On/Off を制御する。主に用いられる光受容タンパク質はロドプシンやフラビントタンパク質、そしてフィトクロムだが、これらの光受容色素はレチナルやリポフラビン誘導体、phytychromobilin のように単一色素であるため、遺伝子発現を制御する光の波長は限られており、任意の波長を用いることはできなかった。

### 2. 研究の目的

PcyA は FDBR の中で、最も分子機構の深化が進んでいるビリン合成酵素である。本課題では PcyA の部位特異的変異による機能改変を通して、ビリン色素の自在なデザインを実現し、多彩な色調の開環テトラピロール色素を創製することを目的とする。

ヘム代謝物であるビリン色素は、植物やラン藻、細菌においては光センサー色素としても機能する。紫外から近赤外までの光をそれぞれ受容する新規ビリン色素と、光センサータンパク質とを組み合わせることで、任意の光を複合的に利用した光スイッチによるマルチタスク制御の遺伝子操作を目指している。そのために、PcyA の活性残基を戦略的に改変し、様々な色彩を持つビリン色素を生み出す酵素ライブラリを構築する。

### 3. 研究の方法

ラン藻由来 PcyA の結晶構造を基に、活性ポケットのアミノ酸残基を部位特異的に変異させた。その後、変異 PcyA と基質 BV を反応させ、生成色素の吸収スペクトルや HPLC を実施した。また、生成色素と光センサータンパク質との結合能も、大腸菌を用いた共発現系で評価することを検討した。以下に、作製するピリン色素と変異部位の例を挙げる。

### 【18<sup>1</sup>, 18<sup>2</sup>-dihydrobiliverdin を合成する PcyA 変異体】

PcyA は BV を基質とし、中間体色素である 18<sup>1</sup>, 18<sup>2</sup>-dihydrobiliverdin を介して、3Z/3E-phytyocyanobilin を合成する (図 2A)。特に、基質の 2 箇所を一定の順序で立体特異的に還元する。先行研究において、E76Q 変異体が 1 段階目の D 環ビニル基還元をスキップし、2 段階目の A 環還元を行い、高等植物が有する phytyocyanobilin を生合成することに成功した (図 2B., Y. Hagiwara, et al. JBC, 2010.)。

本研究では、D 環ビニル基のみを還元し、18<sup>1</sup>, 18<sup>2</sup>-dihydrobiliverdin を合成する PcyA 変異体の作製を目指した。この色素は 653 nm (in methanol) に特異的な吸収ピークをもつ。PcyA の変異部位は以下のアミノ酸残基を想定した。

基質近傍に位置しているバリンやロイシン、アスパラギン、スレオニンの置換、さらに新規のフェニルアラニンや、プロトン供与基としてのグルタミン酸やアスパラギン酸の導入を検討し、還元部位周辺の基質結合環境や活性残基の改変を試みた。

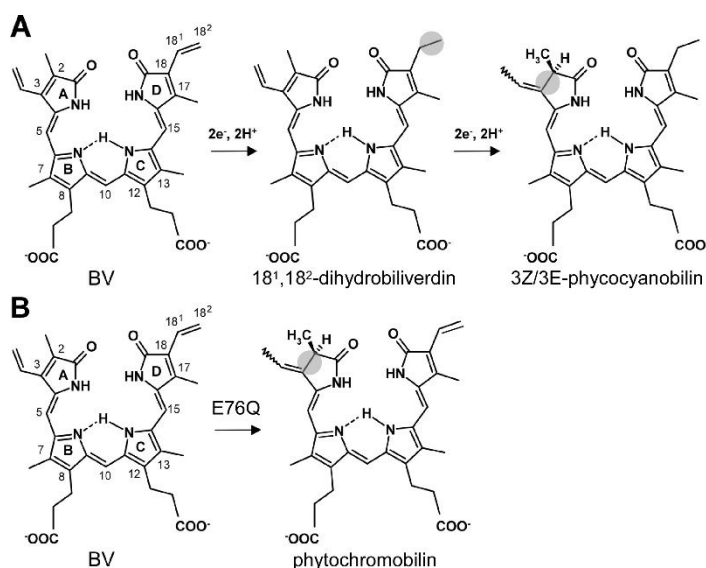


図 2 . PcyA の野生型と変異型の BV 還元反応

A. 野生型 PcyA。

B. E76Q 変異体。

### 4 . 研究成果

光合成色素合成酵素 PcyA に電子を供給するタンパク質群の濃度比を調整して酵素反応を進めることで、最終生成物の合成速度だけでなく、酵素反応における中間産物の合成速度と分解速度において、その安定性も評価した。最終生成物や中間産物と考えられる色素は HPLC で解析した (図 3)。さらに並行して、ピリン色素としての反応中間体の収量を上げるため、上述の部位特異的変異酵素の作製と、その酵素反応物の HPLC も実施した。

本研究の結果から、反応中間体を合成し、かつ野生型酵素よりも蓄積しやすい変異体酵素の候補を見出すことができた。これにより、自在にピリン色素の還元部位をデザインし、新規ピリン色素を酵素学的に合成できる知見が深まったと考えられる。

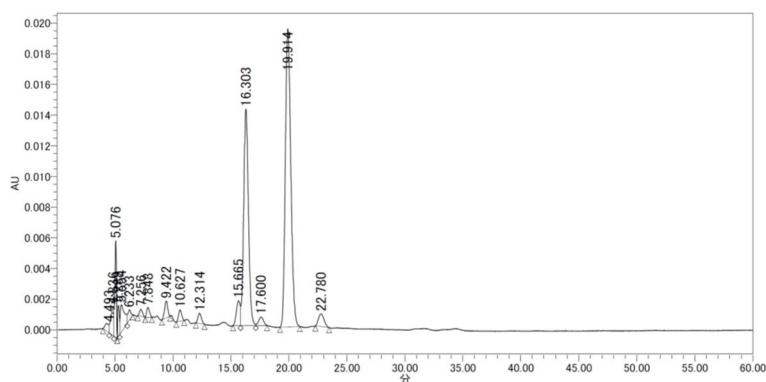


図 3 . 酵素反応物の HPLC 解析例

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Joutsuka Tatsuya, Nanasawa Ryota, Igarashi Keisuke, Horie Kazuki, Sugishima Masakazu, Hagiwara Yoshinori, Wada Kei, Fukuyama Keiichi, Yano Naomine, Mori Seiji, Ostermann Andreas, Kusaka Katsuhiko, Unno Masaki	4. 巻 299
2. 論文標題 Neutron crystallography and quantum chemical analysis of bilin reductase PcyA mutants reveal substrate and catalytic residue protonation states	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102763 ~ 102763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102763	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shota Nakamura, Yoshinori Hagiwara
2. 発表標題 Optimization of buffer composition and cell disruption method for thermophilic cyanobacterium Thermosynechococcus vulcanus
3. 学会等名 International Symposium on Innovative Engineering (ISIE) 2022 -The 6th University Technology PETRONAS - KOSEN Joint Symposium- (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shota Nakamura, Yoshinori Hagiwara
2. 発表標題 Construction of expression systems for iron-sulfur protein from cyanobacteria.
3. 学会等名 The International Joint Symposium 2023 on Innovative Research and Development (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村祥大、萩原義徳
2. 発表標題 好熱性シアノバクテリア由来鉄硫黄タンパク質の発現系構築
3. 学会等名 第31回九州沖縄地区高専フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木雅治、萩原義徳
2. 発表標題 制限酵素におけるリフォールディング効率の導出
3. 学会等名 第28回 高専シンポジウム in 米子
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村祥太、萩原義徳
2. 発表標題 シアノバクテリア由来鉄硫黄タンパク質の発現系構築
3. 学会等名 第28回 高専シンポジウム in 米子
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川祐太、萩原義徳
2. 発表標題 光合成アンテナの構築に関わる新規鉄硫黄タンパク質の生化学的解析
3. 学会等名 第27回 高専シンポジウムオンライン
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川祐太、萩原義徳
2. 発表標題 光合成アンテナの構築に関わる新規鉄硫黄タンパク質の発現系構築
3. 学会等名 第26回高専シンポジウムオンライン
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

久留米工業高等専門学校 生物応用化学科 萩原研究室  
<http://www.cc.kurume-nct.ac.jp/~hagiwara/world/>

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	杉島 正一  (Sugishima Masakazu)  (30379292)	久留米大学・医学部・准教授    (37104)	

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