

光活性化タンパク質の活性制御機構の解明と細胞の光制御への応用 —構造機能相関を基盤とした新規オプトジェネティクスツールの開発—

1. 研究の目的

本研究では、光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC) の活性制御機構を明らかにするとともに、明らかにした活性制御機構の情報を基に幅広い光量の光刺激で様々な cAMP 産生能を示す新たな改変体群を創製することを目的とする。

近年、「光感受性タンパク質」の働きを光でオン/オフすることで、目的の細胞の働きを光制御する技術である「オプトジェネティクス」が急速に広まっている。本研究のターゲットである「光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC)」は、青色光刺激によりセカンドメッセンジャーである cAMP を産生する光感受性タンパク質であり、cAMP が重要な役割を果たす心筋細胞、脂肪細胞、筋肉細胞などの様々な細胞で細胞機能を光制御できる可能性を秘めている。本研究では、PAC の一種であるユレモから見つかった PAC (OaPAC) の構造—機能相関に迫ることで OaPAC の活性制御機構を明らかにし、その知見をもとにバリエーションに富んだ改変体群を創製する。そこで、本年度は下記の 2 点を目標とし、各項目に記載した事項について検討を行った。

(1) OaPAC の光依存的な構造変化の可視化

- ① 蛍光分子による OaPAC の標識
- ② 蛍光標識 OaPAC の青色光依存的な蛍光強度変化の測定 (多分子計測)
- ③ 蛍光標識 OaPAC の青色光依存的な蛍光特性の測定 (1分子計測)

(2) OaPAC の活性に関与するアミノ酸の同定

- ① C末端アミノ酸変異体の作製
- ② 酵母を利用した変異体の cAMP 産生能の測定

2. 研究の計画

(1) OaPAC の光依存的な構造変化の可視化

① 蛍光分子による OaPAC の標識

OaPAC の活性に関与するアデニル酸シクラーゼドメインの ATP 結合部位の構造変化を光学的に調べるため、ATP 結合部位の特定のアミノ酸を特異的に蛍光分子で標識する。具体的には、内在性の 5 つのシステインのうち、ATP 結合部位付近にある 201 番目のシステイン (C201) 以外の 4 つをアラニンに置換した変異体を作製する。作製した変異体をシステイン残基に特異的に結合するマレイミド基を持つ蛍光色素と反応させ、C201 を特異的に標識する。蛍光色素は、疎水度が高い環境下ほど蛍光強度が高いという特性を持つテトラメチルローダミン (TMR) または、Cy3 (ドナー) と Cy5 (アクセプター) を混合したものを使用する。

② 蛍光標識 OaPAC の青色光依存的な蛍光強度変化の測定 (多分子計測)

蛍光分光光度計を用いて標識した OaPAC の蛍光強度を測定し、光照射に伴う変化を捉える。具体的には、青色光照射オンからオフの過程の蛍光強度の変化を捉え、光で活性化された状態から暗所で不活性化された状態へ移行する際の ATP 結合部位の構造変化を捉える。また、様々な ATP 濃度下での光依存的な蛍光強度変化を測定し、構造変化の ATP 依存性を調べる。

③ 蛍光標識 OaPAC の青色光依存的な蛍光特性の測定 (1分子計測)

全反射蛍光顕微鏡を用いて、蛍光標識した OaPAC を 1 分子イメージングし、青色光照射オン・オフ時の蛍光強度の変化を捉えることで、構造変化を可視化する。Cy3 と Cy5 の 2 色で標識した OaPAC については、2 量体を形成する OaPAC が Cy3 と Cy5 の両方で標識されているものを確認し、その光依存的な構造変化を測定する。

(2) OaPAC の活性に関与するアミノ酸の同定

① C末端アミノ酸変異体の作製

OaPAC の C 末端は活性に影響を与えることが知られており、疎水性アミノ酸が多いという特徴を有している。C 末端のアミノ酸のうち活性に影響を与えるアミノ酸を絞り込むため、C 末端の 12 残基をすべて疎水性アミノ酸に置換した変異体と、親水性アミノ酸に置換した変異体を作製する。

② 酵母を利用した変異体の cAMP 産生能の測定

以前の研究により、OaPAC を酵母に発現させた場合、cAMP 活性が高い OaPAC では酵母の増

殖能が低下することが示されている。この特性を利用し、変異体を発現した酵母の増殖能を活性の指標として捉え、cAMP産生能を調べる。具体的には、作製した変異体を酵母に形質転換し、青色照射下と暗所で変異体の発現を誘導しながらプレート上で培養し、増殖の様子を観察する。

3. 研究の成果

(1) OaPACの光依存的な構造変化の可視化

① 蛍光分子によるOaPACの標識

内在性の5つのシステインのうち、ATP結合部位付近にあるC201以外の4つをアラニンに置換した変異体を作製し、マレイミド基を持つTMRまたは、Cy3とCy5でC201を特異的に標識した。それらの標識率を測定した結果、OaPAC:TMR = 1:0.5、OaPAC: Cy3: Cy5 = 1:1.1:1.3であった。

② 蛍光標識OaPACの青色光依存的な蛍光強度変化の測定（多分子計測）

TMR標識OaPACを用い、青色光照射によるATP結合部位付近の活性状態から不活性化状態への構造変化を蛍光強度の変化として捉えた。TMR標識OaPACへ青色光を照射し、照射直後の蛍光強度の変化を蛍光分光光度計で測定した。その結果、暗所時と比べ光照射終了直後の蛍光強度は低く、約5secで暗所時の蛍光強度に戻った。また、光照射終了直後の蛍光強度の低下と暗所時の蛍光強度に戻る時定数はATP濃度に依存しており、ATPの濃度が高いほど低下が小さく、暗所時の強度に戻るまで時間がかかることがわかった。TMRは疎水度が高い環境下ほど蛍光強度が高いという特性を持つので、得られた結果は光照射によりOaPACが活性化された状態では、ATP結合部位は不活性化状態と比べて親水性環境に存在し、ATP濃度依存的に活性状態から不活性化状態へ移行することを示している。

また、Cy3とCy5で標識したOaPAC変異体については、2量体間の蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を観察した。多分子の蛍光分光測定により、Cy3の励起波長でCy5の蛍光が観察されたことから、FRETが起こることを確認した。

③ 蛍光標識OaPACの青色光依存的な蛍光特性の測定（1分子計測）

全反射顕微鏡を用い、TMR標識OaPACを1分子レベルでイメージングし、暗所で15s後、青色光照射を20s行い、再び暗所で1min静置した時の蛍光画像を200ms毎に取得した。また、Cy3とCy5で標識したOaPACについても同様に1分子イメージングし、FRETが1分子レベルで起こっていることを確認した。

(2) OaPACの活性に関与するアミノ酸の同定

① C末端アミノ酸変異体の作製

OaPACのC末端の12残基のうち4つの親水性のアミノ酸を疎水性アミノ酸に置換した変異体（疎水性OaPAC）と、8つの疎水性アミノ酸に親水性アミノ酸に置換した変異体（親水性OaPAC）を作製した。

② 酵母を利用した変異体のcAMP産生能の測定

作製した変異体2種と、野生型OaPAC、活性が高いことが知られているC末端を18アミノ酸残基欠失した変異体（OaPAC348）をそれぞれ酵母に形質転換し、発現誘導処理によりOaPAC変異体を酵母に発現させ、10 μ Wから60 μ Wの様々な強度の青色光照射下または暗所で増殖能の違いを調べた。その結果、青色光照射下と暗所でこれらのOaPAC間に増殖能の違いが見られた。暗所ではすべてのOaPACが増殖した一方、青色光照射下では、OaPAC（WT）はすべての光強度下で増殖したが、OaPAC（348）とOaPAC（親水性）は20 μ W以上の光強度の照射下ではほとんどしなかった。以前の研究によりcAMP活性が高いOaPACが発現した酵母は増殖能が低下することが報告されているので、この結果はC末端の疎水度が弱まるとOaPACの活性が高まることを示唆していると考えられる。しかしながら、疎水度を高めたOaPAC（疎水性）では青色光照射下でWTほどの増殖が見られなかったことから、単純にC末端の疎水度が高まっても活性が低くなるわけではないことが分かった。

4. 研究の反省・考察

(1) OaPACの光依存的な構造変化の可視化

① 蛍光分子によるOaPACの標識

OaPACのATP結合部位に蛍光分子を標識した変異体を作製することができた。しかしなが

ら、Cy3とCy5で標識した変異体については、これらの蛍光色素の量がタンパク量を上回っており、非特異的な部位も標識されている可能性がある。今後は、非特異的に結合している蛍光分子を分離する操作を加え、特異的に標識されているOaPACを作製する必要がある。

② 蛍光標識OaPACの青色光依存的な蛍光強度変化の測定（多分子計測）

TMR標識OaPACの蛍光特性を調べることで、青色光による活性化時と不活性化時のATP結合部位の構造状態の違いを捉えることができた。活性化時にATP結合部位が不活性化時と比べて親水的な環境に存在したことから、ATP結合部位は光照射によりタンパク内部の疎水性環境から外部に晒された親水性環境に移動し、ATPが結合しやすい状態に位置すると考えられる。また、TMRの特性を利用して捉えた活性状態から不活性化状態へのATP結合部位の構造変化の時定数約5secは、青色光を感受するBLUFドメインの光依存的な構造変化の時定数とほぼ同じであることから、BLUFドメインで捉えられた光の情報が構造変化としてATP結合部位が含まれるアデニル酸シクラーゼドメインまで伝わっていると考えられる。

③ 蛍光標識OaPACの青色光依存的な蛍光特性の測定（1分子計測）

全反射顕微鏡を用い、TMR標識OaPACとCy3・Cy5標識OaPACの1分子イメージングを行い、蛍光特性の変化を捉えた。今後データを解析し、光照射有無での蛍光特性の違いから構造状態の違いを明らかにすることと、光照射オン・オフ時の蛍光特性の変化から構造変化を捉えることを行う。

(2) OaPACの活性に関与するアミノ酸の同定

酵母を利用してC末端のアミノ酸の一部を置換した変異体のcAMP産生能を測定し、C末端の疎水度が活性に影響を与えていることがわかった。C末端のアミノ酸を親水性アミノ酸に置換して疎水度を弱めると活性が高まったことから、C末端はOaPACのある部位と相互作用してcAMPの産生を妨げているのではないだろうか。しかしながら、C末端の疎水度を強めても活性が弱まらず、逆にWTより若干活性が高まったことから、単純にC末端の疎水度のみが活性に影響を与えているのではなく、別の要因、例えば電荷など、も影響を与えているのではないかと考えられる。今後はアミノ酸の他の特性も考慮し、活性に影響を与えるアミノ酸を絞り込む。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① 公益財団法人新世代研究所2020年度第1回バイオ単分子研究会 “イオンチャネルの基礎研究から生まれた新たな研究・開発” オンライン 2021/3/30

(3) 出版物

なし