

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 (0aPAC) の構造—機能相関に迫ることで 0aPAC 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) 0aPAC の光依存的な構造変化の可視化

- ① 0aPAC の構造変化の FRET での検出のための蛍光標識
- ② Cy3 と Cy5 で標識した 0aPAC 変異体の蛍光強度変化の測定 (多分子計測)
- ③ ナノ開口基板を用いた高濃度蛍光性 ATP 結合の 1 分子イメージング系の確立

(2) 0aPAC の C 末端の光感受性調節機構の解明と、新規 0aPAC 改変体の創製

- 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
- ③ 培養細胞を利用した変異体の cAMP 産生能の測定

2. 研究の計画

(1) 0aPAC の光依存的な構造変化の可視化

① 0aPAC の構造変化の FRET での検出のための蛍光標識

0aPAC の活性変化に伴う構造変化を光学的に捉えるため、特定のアミノ酸に蛍光分子を特異的に標識した。システイン残基のチオール基に特異的に結合するマレイミドを用いて標識するため、まず 0aPAC の内在性の 5 つのシステインをアラニンに置換した変異体を作製し、その後その変異体に蛍光標識用のシステイン残基を 1 つ導入した。具体的には、光感受部位 (BLUF ドメイン) にある 16 番目のグリシンまたは触媒ドメインにある 306 番目のイソロイシンをシステインに置換した。また、以前我々が見つけた光感受性調節部位である C 末端にシステインを付加した変異体も作製した。その後、作製した変異体にマレイミド基が付いた 2 つの蛍光分子、Cy3 (ドナー) と Cy5 (アクセプター) を反応させ、導入したシステイン残基をこれらの蛍光分子で標識した。ちなみに、0aPAC は二量体を形成するため、各変異体は 2 つのシステイン残基を持つ。

② Cy3 と Cy5 で標識した 0aPAC 変異体の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蛍光標識した 0aPAC の蛍光強度を測定し、光照射に伴う変化を捉えた。具体的には、標識した 0aPAC 溶液に高輝度 LED で青色光 ($500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) を 30 秒間照射し、照射をオフした直後からの Cy3 と Cy5 の FRET に伴う Cy5 の蛍光強度の変化を捉えた。

③ ナノ開口基板を用いた高濃度蛍光性 ATP 結合の 1 分子イメージング系の確立

高濃度での蛍光分子の 1 分子検出が可能な直径 100 nm のナノ開口基板を用いて、蛍光性 ATP が ATP 結合蛋白質に結合・解離する様子を EM-CCD カメラを用いて観察した。

(2) 0aPAC の C 末端の光感受性調整機構の解明

① C 末端アミノ酸変異体の作製

0aPAC の光感受性に関わっている C 末端の活性に影響を与えるアミノ酸を絞り込むため、C 末端のアミノ酸の疎水度と電荷に着目し、アミノ酸の置換により疎水度や電荷を変化させた変異体を数種類作製した。前年度に作製した 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に加え、今年度は C 末端の 9 残基をすべて疎水性アミノ酸に置換した変異体と、

362番目の正に荷電したリジンを中性のアラニンに置換した変異体を変異導入キットを用いて作製した。

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、増殖の様子を観察した。

③培養細胞を利用した変異体のcAMP産生能の測定

培養細胞（HEK細胞）にOaPAC変異体遺伝子と、cAMPのバイオセンサーの遺伝子をリポフェクション法で導入した。このセンサーはルシフェラーゼベースのバイオセンサーで、cAMPが結合すると発光する。これらのタンパク質を発現させた細胞に様々な強度の青色光を照射し、産生されたcAMPを発光として捉えた。また、導入したOaPAC遺伝子には2A自己切断ペプチドを介して赤色蛍光タンパク質（RFP）の遺伝子を付加し、OaPAC変異体の発現量をRFPの蛍光強度で見積もった。これにより、各OaPAC変異体の同一の発現量におけるcAMP産生量を比較した。

3. 研究の成果

(1) OaPACの光依存的な構造変化の可視化

①OaPACの構造変化のFRETでの検出のための蛍光標識

2020年度にATP結合部位付近をCy3とCy5で蛍光標識し、これらの間でのFRETを捉えようとしたが、青色光照射による蛍光強度の変化が小さく、捉えるのが難しかった。そのため、FRETで効率よく距離変化を捉えることができるフェルスター距離を考慮して、新たに3つのアミノ酸（16、306、367番目）のいずれかにシステインを導入し、マレイミド基を持つCy3とCy5で標識した。その結果、16番目または306番目にシステインを導入した変異体では、それぞれOaPAC : Cy3 : Cy5 = 1 : 0.15 : 0.16、または1 : 0.23 : 0.33の標識率で標識された。しかしながら、367番目にシステイン残基を導入した変異体は、標識時間や温度を変化させても、ほとんど標識されなかった。このことから、C末端の末端はタンパクの表面に位置しておらず、蛍光分子が届かない内部に位置していると思われる。

②Cy3とCy5で標識したOaPAC変異体の蛍光強度変化の測定（多分子計測）

Cy3とCy5で標識したOaPACを用い、青色光照射によって活性化された状態から不活性化状態への構造変化をCy3とCy5のFRET効率の変化で捉えた。蛍光標識OaPACへ青色光を照射し、照射直後のCy5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、BLUFドメインに存在する16番目のアミノ酸を蛍光標識した変異体では、暗所時と比べ光照射終了直後の蛍光強度は高く、約5secで暗所時の蛍光強度に戻った。Cy3とCy5の距離が近づくとCy5の蛍光強度が高まるので、光照射によりOaPACが活性化された状態では、二量体間の標識部位の距離は近づくことがわかった。一方触媒ドメインの306番目のアミノ酸に標識した変異体では光照射直後の蛍光強度は暗所時と変わらず、変化が見られなかったことから、この部位では二量体間で光依存的な距離の変化はないことがわかった。

③ナノ開口基板を用いた高濃度蛍光性ATP結合の1分子イメージング系の確立

ELISA法を用いてOaPACの活性（cAMP産生）を測定した結果、OaPACのKm値は μM オーダーであり、通常1分子イメージングで使用される全反射顕微鏡での蛍光1分子の検出限界である50 nMを大幅に超えていた。そのため、全反射顕微鏡と比べてより局所照明が可能な直径100 nmのナノ開口基板を用いて蛍光性ATPの結合・解離を捉える系を確立した。このナノ開口基板を用いて、蛍光性ATPが100nMの存在下でATP結合蛋白質へのATPの結合・解離を1分子イメージングすることができた。

(2) OaPACのC末端の光感受性調整機構の解明

①C末端アミノ酸変異体の作製

作製した変異体である、C末端の9残基をすべて疎水性アミノ酸に置換した変異体（疎水性-9）と362番目の正に荷電したリジンを中性のアラニンに置換した変異体（K362A）について、シークエンスを確認し、目的のアミノ酸に変異が入っていることを確認した。

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種に加え、2020年度に作製したC末端の12残基をすべて疎水性アミノ酸にした変異体（疎水性-12）と、野生型OaPAC（WT）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230 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、暗所ではすべてのOaPACが増殖した一方、青色光照射下では、WTと疎水性-9はすべての光強度下で増殖したが、疎水性-12では約130 μ W以上の強度では増殖率が低くなった。以前の研究によりcAMP活性が高いOaPACが発現した酵母ではその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12残基がすべて疎水性になるとOaPACの活性が高まることを示唆している。また、K362Aは、約230 μ Wでは増殖率がWTより低くなった。このことから、362番目の正電荷を持ったアミノ酸を中性化すると、OaPACの活性が若干高まることが示唆された。

③培養細胞を利用した変異体のcAMP産生能の測定

培養細胞に作製した変異体を発現させ、光照射によりOaPAC変異体から産生されたcAMPをcAMPのバイオセンサーを用いて発光として捉えた。その結果、それぞれの変異体のcAMP産生能は酵母を用いた計測の結果と同様の傾向を示した。同一の光強度で、疎水性-9はWTとほぼ同じcAMP依存的な発光量であった一方、疎水性-12は約100倍、K362Aは約10倍の発光量を示した。このことから、C末端の12残基をすべて疎水性にするとOaPACの活性が約100倍高まり、正電荷を持った362番目を中性化すると活性が約10倍高まることがわかった。

4. 研究の反省・考察

(1) OaPACの光依存的な構造変化の可視化

BLUFドメインと触媒ドメインをCy3とCy5で蛍光標識した変異体の蛍光特性を調べること、青色光による活性化時と不活性化時のBLUFドメインの構造状態の違いを捉えることができた。活性化時に二量体間のBLUFドメインの16番目のアミノ酸同士の距離が近づいたことから、これらの部位は光に依存して構造変化をすることがわかった。この部位はバンドルが作られているヘリックスの両側に位置していることが結晶構造解析で明らかとなっている。このバンドルを中心に、16番目のアミノ酸を含むBLUFドメイン同士が近づくと方向へねじれるのではないかと考えられる。

また、ナノ開口基板を用いて蛍光性ATPの1分子イメージングを行い、ATPの結合・解離を輝点のオン・オフとして捉えることができた。今後この系を用いてOaPACへのATPの結合・解離を捉えると同時に、BLUFドメインの16番目のアミノ酸に標識したCy3とCy5のそれぞれの照射光に依存した蛍光強度の変化を1分子レベルで捉えることで、OaPACの光に依存した構造変化と機能変化を明らかにする。

(2) OaPACのC末端の光感受性調整機構の解明

酵母と培養細胞を利用して、C末端のアミノ酸の一部を置換した変異体のcAMP産生能を測定した結果、疎水性-9と疎水性-12で青色光照射時に大きな違いがあった。疎水性-9はWTとほぼ同じ活性であるのに対し、疎水性-12の活性はWTと比べて約100倍高まることがわかった。これらの変異体の違いは、疎水性-9では356番目と357番目のアミノ酸がWTと同じ親水性のアミノ酸である（セリンとグルタミン）であるのに対し、疎水性-12ではどちらのアミノ酸も疎水性であるアラニンである点である。このことから、C末端の中でもこの2つのアミノ酸の疎水度が活性に大きく影響を与えることがわかった。また、362番目の正に荷電したリジンを中性のアラニンに置換した変異体もWTより活性が約10倍高まったことから、このアミノ酸も活性にある程度の影響を与えていることがわかった。今後はこの絞り込んだ活性に重要なアミノ酸がどのように活性を制御しているのかをさらに調べる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①平野美奈子 “オプトジェネティクスツールとしての光活性化アデニル酸シクラーゼ”
浜松ホトニクス株式会社中央研究所・研究交流会 2021/5/10

②平野美奈子 “チャネル活性測定法の開発と光感受性タンパク質の研究・応用” 公益財団法人新世代研究所・2021年度第2回バイオ単分子研究会 2022/2/10

(3) 出版物
なし