

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 の青色光依存的な構造変化と活性変化の可視化による活性化機構の解明

① 青色光依存的な 0aPAC の構造変化の解明

② 青色光依存的な 0aPAC の活性変化 (cAMP 産生活性) の可視化

(2) 特性 (cAMP 産生量・光応答性) が異なる 0aPAC 改変体群の作製

2. 研究の計画

(1) 0aPAC の青色光依存的な構造変化と活性変化の可視化による活性化機構の解明

① 青色光依存的な 0aPAC の構造変化の解明

2020年度の成果①、2021年度の成果①をさらに推し進め、巨視的な多分子計測と1分子計測で、0aPACの青色光依存的な構造変化の詳細に明らかにする。具体的には、0aPACの特定のアミノ酸に環境依存性の蛍光色素であるテトラメチルローダミン (TMR) を標識し、青色光の照射のオン・オフに伴う蛍光強度の変化を多分子または1分子レベルで測定し、構造変化の詳細を解明する。

② 青色光依存的な 0aPAC の活性変化 (cAMP 産生活性) の可視化

蛍光性ATPの0aPACへの結合・解離を1分子イメージングし、0aPACのcAMP産生活性を調べる。具体的には、ATPが0aPACへ結合し、触媒反応によりcAMPに変換される過程を、全反射顕微鏡や2021年度の成果②で作製したナノ開口基板を用いて捉える。

(2) 特性 (cAMP 産生量・光応答性) が異なる 0aPAC 改変体群の作製

2021年度の成果③と計画1、2で明らかとなった情報をもとに、活性調節に重要な部位に変異を導入し、光応答性やcAMP産生能が異なる0aPAC変異体を作製する。最終的に、様々な種類の細胞で、作製した改変体がオプトジェネティクスのツールとして働くことを示す。

3. 研究の成果

(1) 0aPAC の青色光依存的な構造変化と活性変化の可視化による活性化機構の解明

① 青色光依存的な 0aPAC の構造変化の解明

0aPACのアデニル酸シクラーゼドメイン (ACドメイン) の特定の1アミノを環境依存性蛍光色素であるテトラメチルローダミン (TMR) で標識し、青色光刺激前後の蛍光強度を蛍光分光光度計 (多分子系) で測定した。TMRには疎水性環境下で蛍光強度が高く、親水性環境下で低いといった特性がある。測定の結果、ACドメインのタンパク質表面に位置するV350とT309に標識した変異体は、青色光照射によって蛍光強度が低下し、照射オフ後20秒以内に暗所時の蛍光強度に戻る様子が確認された。これは以前ACドメインのATP結合領域への

TMR標識で観察された結果と同様の結果であり、光に順応した活性化状態から暗所に順応した不活性化状態に変化する際に、ACドメインの標識部位の周辺環境が親水性環境下から疎水性環境下へ変化したことを示している。これらのことから、ACドメインは活性化状態から不活性化状態へ約20秒かけて構造変化すると考えられ、この結果をもとにOaPACのコンフォメーション変化に関するモデルを提案した。

また、この蛍光強度変化を1分子のOaPACで検出することを目指して、OaPACの6×Hisタグ経由でのまばらなガラス基板への固定と、蛍光1分子顕微鏡への青色光刺激系の導入、青色光刺激前・中・後のTMR-OaPACの1分子蛍光強度のシームレスなイメージングを行った。

OaPACの6×Hisタグ経由でのまばらなガラス基板への固定に対しては、HisタグのNi-NTAへのアフィニティがそれほど高くないため (> μM)、Ni-ニトリロ三酢酸 (NTA) を修飾したガラス基板には効率よくOaPACを固定できないことがわかった。そこで、従来のNi-NTAに比べ6×Hisタグに対して10,000倍高い親和性 (1 nM) をもつ3つのNTA基の複合体であるTris-NTA-ビオチンを、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用でガラス基板に固定した系を用いたところ、効率よくまばらにOaPACを固定できた。また、ストレプトアビジンコートしたガラス基板へOaPACを特異的に結合させるため、Avi-tagを導入して大腸菌内でビオチン化リガーゼと共発現させることによってビオチン化したOaPAC変異体も作製した。

蛍光1分子顕微鏡への青色光刺激系の導入は、青色LEDを蛍光1分子倒立顕微鏡の直上に設定し、スイッチのオン・オフによって多分子系で行ったのと同じ青色光刺激が可能な系を構築した。

そして、この系を用いて、青色光刺激前・中・後のTMR-OaPACの1分子蛍光強度のシームレスなイメージングを行い、多分子系で検出した青色光照射による蛍光強度の低下や照射オフ後の蛍光強度回復の検出を試みた。

②青色光依存的なOaPACの活性変化 (cAMP産生活性) の可視化

無標識のOaPACあるいはTMR-OaPACを6×Hisタグ経由のガラス基板に固定し、そこに蛍光性のATPを加えて全反射顕微鏡で蛍光1分子イメージングして蛍光性ATPのOaPACへの結合・解離の1分子イメージングを試みたほか、ナノ開口基板についてもOaPACの固定を目指した表面修飾と蛍光性ATPのOaPACへの結合・解離の1分子イメージングを試みた。

(2) 特性 (cAMP 産生量・光応答性) が異なる OaPAC 改変体群の作製

昨年度明らかにした OaPAC の C 末端領域と活性の関係をさらに詳細に調べ、C 末端領域の特定のアミノ酸残基の疎水度と電荷が活性に影響を与えていることを明らかにした。具体的には、356 と 356 番目の 2 つの親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸へ、もしくは 358～361 番目の 4 つの疎水性アミノ酸を親水性アミノ酸へ置換した変異体は、野生型と比べて cAMP 産生能が約 100 倍高くなった。また、362 番目の正電荷を持ったリジン残基を中性化すると、野生型と比べて数 10 倍 cAMP 産生能が高くなった。これらのことにより、C 末端領域の 356 番目～362 番目のアミノ酸が大きく活性に影響を与える部位であることがわかった。このことにより、上記のアミノ酸残基に数個の変異を導入することで、cAMP 産生量が大きく異なる変異体を創製することができた。

4. 研究の反省・考察

(1) OaPAC の青色光依存的な構造変化と活性変化の可視化による活性化機構の解明

①青色光依存的なOaPACの構造変化の解明

ACドメインをTMRで標識した変異体の青色光照射オン・オフによる蛍光強度の変化を調べることで、ACドメインの活性化状態から不活性化状態への構造変化をとらえることができた。これまで、光を感受するBLUFドメインの二量体間の構造変化をCy3とCy5のFRETで捉え、活性化状態から不活性化状態へのBLUFドメインの構造変化は約5秒以内に行われることがわかってきた。一方、今回捉えた活性化状態から不活性化状態へのACドメインの構造変化は約20秒要していた。このことから、光を受けるBLUFドメインの構造変化とACドメインの構造変化は一体ではないことが示唆された。BLUFドメインの動きがACドメインの変化を引き起こすきっかけになっているが、その後のACドメインの動きはBLUFドメインとは独立して起こっているのであろう。今後、1分子レベルでそれぞれの動きを同時に捉えることができれば、さらに詳細な情報が得られると考えられる。

これらのOaPACの構造変化をTMR-OaPACの1分子の蛍光強度変化として検出することを目

指して、青色光刺激前・中・後のシームレスな蛍光1分子イメージングを行ったが、取得した蛍光強度の変化には、高強度のレーザー光による蛍光色素励起に起因する蛍光褪色の影響が含まれていた。今後はこの影響を最小化するような条件を見だし、多分子系で検出した蛍光強度の変化を検出することに引き続き取り組む。また、新たに作製したビオチン化OaPAC変異体もこの系に導入する。

②青色光依存的なOaPACの活性変化（cAMP産生活性）の可視化

これまで、ナノ開口の溶液交換はナノ開口基板上でピペットチップを用いて直接行ってきたため、溶液交換直後の観察が困難であった。今後は溶液交換直後の結合解離イベントの観察を可能にするため、溶液貫流が可能な試料セルを開発して、研究の効率化をはかる予定である。また、溶液中の蛍光性ATPの濃度を高くする代わりに、基板に固定するOaPACの表面密度を高くして結合の頻度を上げ、基板に固定したOaPACに結合解離する蛍光性ATPの輝点のみを観察する戦略によって、全反射顕微鏡での観察を可能にする系の構築に取り組んでいる。ナノ開口の相補的な系としてこの系も活用し、青色光依存的なOaPACの活性変化の1分子可視化にアプローチしていく。

(2)特性（cAMP 産生量・光応答性）が異なる OaPAC 改変体群の作製

本年度絞り込んだ活性に影響を与えるアミノ酸残基について、疎水度と電荷の影響をさらに調べ、今までとは特性が異なる新規 OaPAC 変異体を作製するとともに、それらの変異体を培養細胞に導入し、オプトジェネティクスツールとしての有用性を示す予定である。

また、今年度他機関より譲り受けて設置したストップフロー装置（複数種類の溶液を混合チャンバー内へ押し出すことで高速に混合させ、その混合直後の溶液の蛍光強度や蛍光偏光などの光学パラメーターの時間変化を高時間分解能で計測できる装置）を用いて、これまでcAMP産生活性・光応答性の時定数パラメーターを効率よく取得し、有用な特性をもつOaPAC改変体群の作製につなげる。

5. 研究発表

(1)学会誌等

なし

(2)口頭発表

①平野美奈子、建部益美、北村有希、三好佑奈、井出徹 “光活性化アデニル酸シクラーゼの活性制御機構の理解に向けた研究・開発” 第45回日本分子生物学会（2022/12/2）

(3)出版物

なし