光活性化アデニル酸シクラーゼ合成酵素 OaPAC の 活性化機構解明

横浜市立大学大学院生命医科学研究科構造創薬科学研究室 大木規央, 朴 三用

Mio OHKI and Sam-Yong PARK: Structural and Functional Insights into a Photoactivated Adenylyl Cyclase

Cyclic-AMP is one of the most important second messengers, regulating many crucial cellular events in both prokaryotes and eukaryotes. Precise spatial and temporal control of cAMP levels by light shows great promise as a simple means of manipulating and studying numerous cell pathways and processes. The photoactivated adenylyl cyclase (PAC) from the photosynthetic cyanobacterium *Oscillatoria acuminata* is a small homodimer eminently suitable for this task, requiring only a simple flavin as chromophore. Here we describe its structure using X-ray crystallography and crystal microspectrophotometry. Site-directed mutants show signal transduction over 30 Ångstroms across the protein with minimal conformational rearrangement. The use of the protein in living human cells is demonstrated with cAMP-dependent luciferase, showing a rapid and stable response to light over many hours and activation cycles.

1. はじめに

フラビンを発色団としてもつ新規の青色光受容体タンパク質が、紅色光合成細菌より発見された。この光受容体のフラビン結合ドメインは、原核および真核微生物に幅広く保存されていることがわかり、それらは光応答に関与する光受容体と考えられている。原生動物であるミドリムシ (*Euglena gracilis*) にも光逃避反応の光センサー分子が発見され、その分子は光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC; Photoactivated Adenylyl Cyclase) であることが見出された。¹⁾ PAC分子は動物・植物で普遍的な情報伝達物質 (cAMP) の生産を光で制御できる生体タ

ンパク質であり、生体内での光スイッチとして医学的な応用が期待される分子である。また、哺乳類の脳分化において、青色光照射による制御 (オプトジェネティクス, Optogenetics) など、生体内での光スイッチとして医学的な応用が期待される分子である。光活性化アデニル酸シクラーゼは最初にミドリムシの光忌避センサーとして発見され、²⁾ 以後、シアノバクテリア (*Oscillatoria acuminata*) 由来の PAC (OaPAC) など、複数の微生物からも相同遺伝子が見出されていたが、³⁾⁻⁵⁾ いずれも原子レベルでの構造・機能解明までには至っていない。OaPACはミドリムシの PAC より小さい分子からなり、同様の分子機能をもっている (図1)。OaPACは366アミノ酸残基からな

図1 PACドメインの配列とアミノ酸の相同性。(Sequence homolog in the PAC family.) ミドリムシ (*Euglena gracilis*) と OaPAC のドメイン構造を示す。ミドリムシの PAC α と β -サブユニットでは、それぞれ2つの BLUF ドメイン (F) と AC ドメイン (A) をもち、OaPAC の各アミノ酸の相同性を示す。

り、フラビン色素 (FAD) を結合する光センシングドメインと ATP を cAMP に変換する触媒ドメインおよびその両者をつなぐリンカー領域をもつ (図1). このフラビン結合ドメインは、クリプトクロム (Cryptochrome) またはフォトトロピン (Phototropin) のものとは一次構造における相同性が異なることから、新規の青色光受容機能を有すると考えられ、BLUF (sensors of Blue-Light Using FAD) と名付けられた.⁶⁾ 本稿では、OaPAC 光活性化アデニル酸シクラーゼの原子レベルでの解析から、光活性化メカニズムに関する最新の知見を紹介したい.⁷⁾

2. シアノバクテリア由来の光活性化アデニル酸シクラーゼ OaPAC

2.1 OaPAC の発現、精製、結晶化

シアノバクテリア由来 OaPAC (1-366 残基) の遺伝子を、N 末端の領域に His タグと FactorXa サイトが付加された pCold I ベクターに挿入した。作製したプラスミドを用いて *E. coli* ArcticExpress 株に形質転換し、培養、精製を行い、1 L 培地当たり、約 3 mg の高純度なサンプルを得た。結晶化スクリーニングキットにより、OaPAC の結晶化条件を探索し、最終的に 100 mM クエン酸ナトリウム pH = 5.0, 10% PEG20K により、微結晶を得ることができた。しかし、構造解析に用いられる単結晶ではなく、さらに良好な結晶を得るために、結晶化用添加剤キット (Additive Screen Kit) を用いて結晶化条件の最適化を行った。その結果、最終的に 10 mM マロン酸ナトリウム pH = 7.0, 100 mM クエン酸ナトリウム pH = 5.0, 10% PEG20K をリザーバー溶液として用い、結晶化温度 20℃ にて、大きさ約 30 × 50 × 100 μm の結晶を得ることができた。結晶の空間群は $P2_12_12_1$, $a = 83.76 \text{ \AA}$, $b = 99.78 \text{ \AA}$, $c = 122.87 \text{ \AA}$ であり、分解能 3.1 Å, 結晶学的な非対称単位 ($V_M = 3.15 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, 溶媒率 = 61%) 当たり 2 分子が存在することが確認された。OaPAC 構造は類似の構造が存在せず、得られた結晶の位相問題を解決するため、さまざまな重原子同型置換結晶を作製した。最終的に 10 mM-EMTS (ethylmercurithiosalicylate, Thimerosal), 24 時間ソーキングを行った結晶を用いて、分解能 3.3 Å の良好なデータを収集することができ、位相の決定をすることができた。ATP 非存在下の条件で得られた Closed 状態の結晶に関しては、最終的に分解能 2.9 Å で解析することができた。また、同条件にて結晶化を行った結果、5 mM ATP-analog (α,β -methylene ATP: ApCpp), 2 mM MgCl_2 を添加することにより、Open 状態の結晶を得ることができた。Open 状態の結晶は分解能 1.8 Å, 空間群 $P6_122$ に属し、非対称単位中に 1 分子の OaPAC が存在した。

2.2 OaPAC の全体構造

OaPAC は、フラビン結合部位である BLUF ドメイン

とアデニル酸シクラーゼ触媒ドメインの 2 つの機能ドメインからなる。BLUF ドメインを有するタンパク質は 450 nm 付近にフラビンに由来する吸収極大をもち、光照射に伴い吸収スペクトルが数 nm 長波長側にシフトすることが知られている。^{8),9)} 大腸菌に発現させて単離精製した OaPAC はフラビンモノヌクレオチド (FMN) を保有しており、ラピッドスキャン分光測定により、光照射時の FMN の吸収変化を見ると、図2に示したように 442 nm から 445 nm にレッドシフトを示し、光照射終了後約 20 秒程度で完全に緩和される。この反応のキネティクスは Light 状態から Dark 状態への 2 成分の反応を示唆する。点線の表示は Light と Dark の差スペクトルを表す (図2a)。

われわれは OaPAC について結晶化条件を変えることにより 2 種類の異なる結晶を得ることができ、それらの構造解析を行った (図2a)。OaPAC の全体構造は、12 本の α ヘリックスと 13 本の β シートからなっている。N 末端にはフラビンを結合した BLUF ドメインと C 末端側にはアデニル酸シクラーゼ触媒 (AC) ドメインからなり、ダンベル型となっている (図2b)。また、それぞれのドメイン同士は隣り合わせになっていることが明らかとなった。BLUF の保有するフラビン分子とアデニル酸シクラーゼの活性部位との距離は約 48 Å と離れていることが確認された。

さらに、異なる結晶化条件に基質 ATP のアナログ ApCpp 分子の有無により AC ドメインが開いた状態 (Open) になっている構造 (空間群 $P2_12_12_1$) と閉じた状態 (Closed) になっている構造 (空間群 $P6_122$) がそれぞれ存在することがわかった。OaPAC の Open 状態と Closed 状態の各ドメイン構造を比較すると、BLUF ドメインではほとんど差異が見られなかったが、AC ドメインの $C\alpha$ の変化が約 2 Å ほど開いている。また、分子間でのファンデルワールスコンタクトの面積は Open 状態では 3,660 Å², Closed 状態では 4,020 Å² となっており、BLUF ドメインのファンデルワールスコンタクト面積は変化せず、AC ドメインが変化し、開閉していることが明らかになった。

2.3 BLUF ドメイン

OaPAC の BLUF ドメインは、ほかの BLUF ドメインタンパク質^{10),11)} と同様に 2 本の α ヘリックスと 5 本の β シートからなる典型的な BLUF 構造になっているが、既知の BLUF ドメインは単量体であるのに対し、OaPAC は二量体を形成している (図3a)。われわれは、変異導入により BLUF ドメインを欠失させた OaPAC を作製し、超遠心分析 (Analytical Ultracentrifugation) で AC ドメインの安定性を測定した結果、不安定で二量体を形成しなかった。つまり、OaPAC の BLUF ドメインが二量体を形成することで、AC ドメインの安定化につながる重要な役割をしていることが明らかになった。また、OaPAC の

図2 OaPACタンパク質の吸収スペクトルと立体構造. (Overall structural properties and solution absorption spectra of OaPAC.) (a) OaPACタンパク質のラピッドスキャン分光測定により, FMNの吸収変化をLightからDarkへの吸収スペクトルである. 強力スポット光源の白色光を5秒照射した後に100ミリ秒から52秒までの吸収スペクトルを100ミリ秒時間分解能で測定し, 442 nmから445 nmにレッドシフト示す. 点線の表示はLightとDarkの差スペクトルを表す. (b) OaPACの全体構造で, OaPACの全体構造は, 12本の α ヘリックスと13本の β シートからなっている. N末端にはフラビン結合BLUFドメインとC末端側にはアデニル酸シクラーゼ(AC)ドメインから合成され, ダンベル型の二量体からなっている. フラビン(FMN) C5原子から, Gln48と水素結合が見られており, Dark状態の構造である. 編集部注: カラーの図は電子版を参照下さい.

BLUFドメイン二量体と既知のBLUF構造 (TH0078, 黄色で表示) とを重ね合わせて見ると, OaPACの $\alpha 3$ ヘリックスは非常に長く, そのC末端は上部のACドメインにまで達している (図3a). $\alpha 3$ ヘリックスの外側表面には疎水性残基が集中し, その疎水性相互作用により二量体が形成されていた. これは既存のBLUFドメインの構造には見られない, 唯一OaPACのみに特徴的な構造である. さらに, 構造が未知のPACファミリーのアミノ酸一次配列を比較すると, OaPAC構造の $\alpha 3$ ヘリックスと思われるアミノ酸はそれぞれ保存されており, また両親媒性ヘリックスを描くと, PACファミリーにおいて疎水性アミノ酸は二量体を形成する接触面のみに集中している. PACファミリーの構造は $\alpha 3$ ヘリックスが各分子同士をささえ, 二量体を形成して活性機能を有していると考えられる.

2.4 ACドメイン

OaPACのACドメインは8本の α ヘリックスと7本の β シートからなっており, 構造既知のアデニル酸シクラー

ゼ (CyaC)¹²⁾ のACドメインとはほぼ一致している. しかし, 今回の構造では金属イオン (Mg^{2+}), ApCcp分子を加えて結晶化させているにもかかわらず, 構造から電子マップを特定するには至らなかった. また, OaPACの溶液状態で, 等温滴定型熱量測定 (Isothermal Titration Calorimetry; ITC) によるATP分子の結合も見られなかった.

ACドメインの構造では基質ATP結合部位と思われる広い領域が存在しており, 酵素反応に重要な金属結合にかかわるアミノ酸残基 Asp156, Asp200 も存在し, cAMP生成反応にかかわっていることが確認された. 構造既知のCyaCはBLUFドメインがなく, ACドメインのみもつ酵素でOaPACの基質結合部位を比較すると同じアミノ酸からなっている. また, CyaC分子は二量体で活性機能を有していることが知られており, OaPAC分子も溶液中においては超遠心分析やゲルろ過の結果から二量体を形成しているということが確認され, 結晶と溶液の分子状態がよく一致していた. CyaC分子は二量体で安定なタンパク質として活性を示すが, OaPACではBLUFドメイ

図3 OaPACタンパク質変異体の活性測定と活性化機構。(Enzyme assays and proposed photo-activated regulation pathway of OaPAC.) (a) OaPACタンパク質の構造からBLUFドメイン二量体と既知のBLUF構造(TII0078, 黄色で表示)とを重ね合わせて見ると, OaPACの α_3 ヘリックスは非常に長く, 二量体の構造になっている。(b) 変異体によるcAMPの活性測定。(c) OaPACタンパク質と結合しているFMNと水素結合をしているGln48の背部にある α_3 ヘリックスのLeu111/Leu115, さらにTyr125, Asn256, Phe197, Asp200のそれぞれの変異体の部分と, 黄色い点線の矢印で活性機構経路を示している。(d) OaPACのOpen状態とClosed状態の構造をC α を重ね合わせ, 1.5 Å以上変化しているアミノ酸残基を赤色矢印で表した。BLUFドメインではほとんど差異が見られなかったが, ACドメインのC α の変化が約2 Åほど開いている。編集部注: カラーの図は電子版を参照下さい。

ンが二量体を形成することで, ACドメインが安定な二量体となり活性を示す。これはPACファミリーの特徴的な構造であると考えられる。

3. OaPACの変異体による機構解明

OaPAC立体構造の情報から, PACの光刺激によるアデニル酸シクラーゼの活性機構を解明するために変異体を作製し, 機能解析を行った。フラビン分子と水素結合をしているGln48の背部にある α_3 ヘリックスのLeu111/Leu115(二重置換体), さらにTyr125, Asn256, Phe197, Asp200のそれぞれの変異体によるcAMP活性測定を行った。野生型OaPACと比べ青色光の有無では著しく活性低下が見られた(図3b)。OaPAC変異体の活性結果を踏まえて, 光によるcAMP合成に重要なアミノ酸残基を特定することができ, OaPAC構造からアデニル酸シクラーゼ活性の光刺激による活性機構経路を推測した(図3c)。 α_3 ヘリックスのLeu111とLeu115はお互いのヘ

リックスが疎水性相互作用により安定化するのに重要な役割を担っていると考えられる。また, Tyr125とAsn256はそれぞれの側鎖を介してサブユニット間の水素結合を共有していることがわかり, ACドメインに存在しているPhe197とPhe180は π - π 結合を形成しており, 活性部位の構造安定化に重要な役割を担っていると考えられる。さらに, Asp200はアデニル酸シクラーゼの活性サイトにおいて触媒となる金属イオン配位結合を形成するために重要なアミノ酸であることも明らかとなった。その光刺激による構造変化は黄色い点線の矢印で示したような活性機構経路となると推測できる(図3c)。

また, BLUFドメインとACドメインの距離は約48 Åも離れている。これは, おそらく光励起されたフラビン分子によるBLUFドメインの微細な構造変化が分子間のアロステリックコンフォメーションを引き起こし, ACドメインが開閉されることによりcAMP合成反応の活性化が起こっていると考えられる(図3d)。

4. 光遺伝学への展開

4.1 細胞への応用

OaPACは光によってcAMP生成を制御できる利点から、光遺伝学(オプトジェネティクス)^{1), 13)}などへの応用が期待される。また、既存の光遺伝学ツールとして報告されている光依存性のイオンチャネルやイオンポンプとは異なる分子機能の制御ができるメリットも有するタンパク質である。

われわれはOaPACをHEK293細胞に発現させ、青色光照射により細胞内のcAMPレベルを制御することを試みた(図4a)。実験ではpGloSensor-22Fベクターを用

いて、OaPAC遺伝子とホタルイカのルシフェラーゼ遺伝子を共発現させ、cAMP検出プローブであるGloSensor cAMP Assayによりルシフェラーゼの発光を検出することでcAMPを定量し、細胞内cAMPをリアルタイムに可視化・定量化を行った。その結果、OaPAC発現細胞内のcAMP濃度は、光刺激により一過的に上昇し、その後、数分以内に分解されることがわかった(図4a)。また、刺激光の強度とパルス間隔の調節により、細胞内cAMP濃度を8時間以上高いレベルに保持できることも確認し、OaPACの光操作ツールとしての実効性を示した。

また、既知のPACホモログであるbPACとOaPACとのHEK細胞内における活性強度の比較定量化を行った。

図4 OaPACタンパク質の光遺伝学への応用。(Use of OaPAC to generate cAMP in cultured cells for optogenetics.) (a) OaPAC分子をHEK293細胞に発現させ、青色光照射により細胞内のcAMPの制御を行った。細胞に3分ごとに30秒光を照射し、細胞内でのcAMPをリアルタイムに可視化・定量化を行った。(b) OaPAC分子をマウスの海馬の神経細胞に発現させ、神経細胞の軸索の分岐・伸長の光操作を試みた。細胞培養の4日目に青色光を30分照射し、7日目に観察すると、光照射のあるなしで軸索の長さに違いが見られた。軸索の分岐においても差異が見られ、青色光を照射した細胞のほう(青色)が照射なし(赤色)より、神経軸索の分枝数が増加している。編集部注: カラーの図は電子版を参照下さい。

その結果、両者の活性量はおよそ 100 倍の差があることが明らかになり、cAMP の広範囲な応用が期待され、有用な遺伝子資源になると考えられる。

4.2 神経細胞の制御

光遺伝学的手法において、神経細胞の構造形成や神経回路形成のメカニズムを解明するためには、イオンチャネルだけでなく、細胞内シグナル伝達系を時空間的に制御する方法が必要となる。また、近年では神経軸索の分岐・伸長の誘導には cAMP の介在が必須であると報告されている^{14), 15)}。そこでわれわれは OaPAC をマウスの海馬の神経細胞に発現させ、神経細胞の軸索の分岐・伸長の光操作を試みた。その結果、青色光を 30 分照射した細胞には照射していないものに比べ、軸索の分岐・伸長が著しく促進されることが明らかになった (図 4b)。このことから、OaPAC を用いることで神経細胞の構造形成を光により制御することが可能であり、神経疾患研究への応用が期待される。

5. おわりに

光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC) はミドリムシから発見され、長年の間光反応機構と構造は不明であった。近年、シアノバクテリア由来の *Oscillatoria* から見出された OaPAC について大腸菌からの単離精製・結晶化・構造解析に成功し、世界で初めて構造に基づいて PAC の活性化機構を論じた。また、光遺伝学の応用への道も少し述べて来た。近年、同じく植物プランクトン起源であるチャネルロドプシンを利用することによる神経興奮の光制御、いわゆる「光遺伝学、optogenetics」は急速に普及した。OaPAC を利用した cAMP を介する生体機能光制御も概念上同類とみなされるものではあるが、はるかに広範で多彩な生命活動の光制御につながり、血管新生・脳病変原・神経回路ネットワーク・記憶などの光発生医学現象の制御・解明・治療・創薬スクリーニングという広大な新分野の開拓を先導するものであり、かつ独創的な新領域の研究分野であると言える。今後、さまざまな光活性化タンパク質の創出とそれに基づく広範で多彩な応用展開につながることが期待できる。

謝 辞

PF の BL-17A および NW-12A のスタッフの皆様のデータ測定の技術的なサポートにより構造決定まで至りました。この場をお借りしてお礼を申し上げます。また、東邦大学薬学部薬品物理分析学教室の伊関峰生教授、生自治医科大学の柴山修哉教授、浜松ホトニクス(株)中央研究所の松永茂博士、東京大学大学院薬学系研究科の小山隆太准教授をはじめ多くの方にご支援やご指導を賜りました。この場をお借りして厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) M. Iseki and T. Takahashi: in "Optogenetics", H. Yawo, H. Kandori and A. Koizumi, eds, pp.17-29, Springer Japan (2015).
- 2) M. Iseki, S. Matsunaga, A. Murakami, K. Ohno, K. Shiga, K. Yoshida, M. Sugai, T. Takahashi, T. Hori and M. Watanabe: *Nature* **415**, 1047 (2002).
- 3) M. H. Ryu, O. V. Moskvina, J. Siltberg-Liberles and M. Gomelsky: *J. Biol. Chem.* **285**, 41501 (2010).
- 4) M. Stierl, P. Stumpf, D. Udvari, R. Gueta, R. Hagedorn, A. Losi, W. Gärtner, L. Peterit, M. Efetova, M. Schwarzel, T. G. Oertner, G. Nagel and P. Hegemann: *J. Biol. Chem.* **286**, 1181 (2011).
- 5) H. Yasukawa, A. Sato, A. Kita, K. Kodaira, M. Iseki, T. Takahashi, M. Shibusawa, M. Watanabe and K. Yagita: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **59**, 361 (2013).
- 6) M. Gomelsky and G. Klug: *Trends Biochem. Sci.* **27**, 497 (2002).
- 7) M. Ohki, K. Sugiyama, F. Kawai, H. Tanaka, Y. Nihei, S. Unzai, M. Takebe, S. Matsunaga, S. Adachi, N. Shibayama, Z. Zhou, R. Koyama, Y. Ikegaya, T. Takahashi, J. R. Tame, M. Iseki and S. Y. Park: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 6659 (2016).
- 8) S. Masuda and C. E. Bauer: *Cell* **110**, 613 (2002).
- 9) S. Ito, A. Murakami, K. Sato, Y. Nishina, K. Shiga, T. Takahashi, S. Higashi, M. Iseki and M. Watanabe: *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**, 762 (2005).
- 10) S. Anderson, V. Dragnea, S. Masuda, J. Ybe, K. Moffat and C. Bauer: *Biochemistry* **44**, 7998 (2005).
- 11) A. Kita, K. Okajima, Y. Morimoto, M. Ikeuchi and K. Miki: *J. Mol. Biol.* **349**, 1 (2005).
- 12) C. Steegborn, T. N. Litvin, L. R. Levin, J. Buck and H. Wu: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 32 (2005).
- 13) K. Deisseroth: *Nat. Methods* **8**, 26 (2011).
- 14) H. J. Song and M. -m. Poo: *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 355 (1999).
- 15) Z. Zhou, K. F. Tanaka, S. Matsunaga, M. Iseki, M. Watanabe, N. Matsuki, Y. Ikegaya and R. Koyama: *Sci. Rep.* **5**, 19679 (2016).

プロフィール

大木規央 Mio OHKI

横浜市立大学大学院生命医科学研究科構造創薬科学研究室

Drug Design Laboratory, Yokohama City University

〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29

1-7-29 Suehiro, Tsurumi, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

e-mail: mio-k67@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

最終学歴：横浜市立大学大学院国際総合科学研究科博士課程 (2016 年修了), 博士 (理学)

専門分野：構造生物学・生物学

研究テーマ：センサータンパク質の構造生物学

朴 三用 Sam-Yong PARK

横浜市立大学大学院生命医科学研究科構造創薬科学研究室

Drug Design Laboratory, Yokohama City University

〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29

1-7-29 Suehiro, Tsurumi, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

e-mail: park@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

最終学歴：大阪大学大学院基礎工学研究科博士課程 (1995 年修了)

専門分野：構造生物学・生化学

研究テーマ：疾患由来タンパク質の構造生物学