

研究課題別評価

1 研究課題名:光センサータンパク質による細胞機能の制御

2 研究者氏名:伊関峰生

研究員:吉川伸哉 (研究期間 H.15.4~H.17.3)

研究員:鈴木武士 (研究期間 H.15.4~H.18.3)

技術員:鈴木淑子 (研究期間 H.15.1~H.18.3、内 H.15.1~H.16.3 は研究補助者)

3 研究のねらい:

生物は、さまざまな光センサータンパク質を用いて周囲の光情報を検知し、発生・生殖・行動等の制御信号として利用している。近年我々が単細胞生物ミドリムシ (*Euglena gracilis*) において発見した光センサー、光活性化アデニル酸シクラーゼ(Photoactivated adenylyl cyclase, PAC)は、光で活性化されて環状アデノシン 3', 5'-リン酸(cAMP)を生成する酵素である。cAMP は、細胞内信号伝達物質として多くの生命現象に関与することが知られており、PAC を任意の細胞に導入することにより、その細胞の cAMP レベル、ひいてはその細胞の機能を光で人為的に制御できる可能性がある。本研究は、多面的なアプローチでこのユニークな光センサータンパク質の全体像を明らかにすると共に、それを利用してさまざまな細胞機能の光制御を実現しようとするものである。

4 研究成果:

(1)PAC 類似タンパク質の探索とその系統解析

ミドリムシにおける PAC の発見以来、この奇妙なタンパク質の進化的起源は大きな興味の対象であった。そこで、本研究では、ミドリムシに近縁な生物から順次 PAC 類似タンパク質の探索を行った。この探索により、PAC の起源に関して重要な示唆が得られるとともに、PAC と同様に光で活性化されるアデニル酸シクラーゼとしての機能を保持しつつ、より優れた特性(例えば、大量精製しやすい、感度が高い、等)を示す光センサーが見つかる可能性も期待された。

ミドリムシ類は、アフリカ眠り病の病原微生物であるトリパノソーマ等を含む一群の原生動物と祖先を一にすることが、形態学的にも分子系統学的にも支持されている。共通祖先から最初に分岐したのは、捕食栄養を営むミドリムシ類と考えられており、それが単細胞真核藻類を取り込むことにより葉緑体を獲得(二次共生)した結果、光独立栄養を営むグループが生じ、さらにそれらが葉緑体を失って吸収栄養性となったグループが生じたとされる。PAC 類似タンパク質の探索は縮重プライマーを用いた RT-PCR により行い、結果として、調べた光独立栄養性ミドリムシ類および吸収栄養性ミドリムシ類の全てから少なくとも2種類ずつの PAC 類似配列を検出することができた。

一方、捕食性のミドリムシ類からは検出されなかった。

さらに、トリパノソーマのアデニル酸シクラーゼに類似した配列(TAC)をミドリムシから見出し、これが捕食性ミドリムシ類および吸収栄養性ミドリムシ類にも存在することが確かめられた。このことから、ミドリムシ類は複数の進化経路を辿ったアデニル酸シクラーゼを有しており、PAC は二次共生成立に伴って獲得されたものと推測された(図1)。

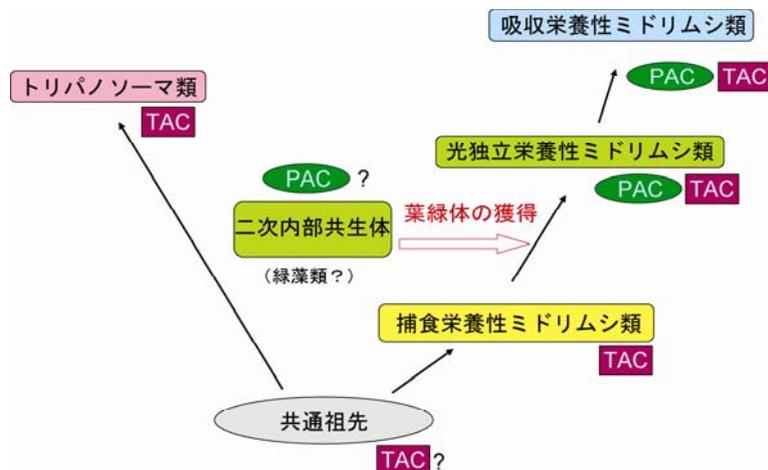


図1 PAC の進化的起源に関する仮説

(2) EST データベースの構築と光集合センサーの探索

PACの発見により、光回避反応のセンサーが明らかにされた一方で、光集合反応のセンサーは何かという新たな問題が提起された。光集合反応は素過程に分解してみれば光回避反応とよく似ており、そのセンサーはPACの場合と同様に新奇なものであることが期待される。そこで、細胞機能制御ツールとして利用可能な光センサータンパク質の選択肢を増やす意味も含めて、光集合反応センサーの探索を行った。探索にあたっては、光受容部位近傍の色素タンパク質の分析、RT-PCRによるフラビントタンパク質の検出等、幾つかのアプローチを進めたものの、いずれも思い通りの結果は得られず、最終的にはゲノム情報に基づく網羅的解析を目指すことが有効と判断された。しかしながら、ミドリムシは実験材料として古い歴史を持つにも関わらず、そのゲノム解析は殆ど進んでおらず、ESTすら全く報告されていなかった。そこで、我々が先鞭をつけるべく、ESTデータベースの構築に着手した。光集合反応を顕著に起こす条件下で培養したミドリムシからcDNAライブラリを作成して、総計 3,934 クローンについて部分シーケンシングを行い、結果として 2,570 の重複を含まないESTを得ることができた。それらのうち既知配列との類似性が有意に認められるESTをKOGs (eukaryotic orthologous groups, Tatusov, R.L. *et al.* (2003) BMC Bioinformatics 4: 41-54)に照らして分類すると、後生動物のみに知られる配列と高等植物のみに知られる配列をそれぞれ約 6%ずつ含んでおり、共生進化を反映する特徴を示した。得られたESTデータベース中には新規アデニル酸シクラーゼを含む複数のcAMP関連タンパク質の配列が含まれており、それらを有力な光集合反応センサー候補として全長を決定した。さらに、RNA干渉法によりこれらをノックダウンし、光集合反応への影響を調べたが、いずれも効果はみとめられず、残念ながら光集合反応センサーは未解明のまま残されることとなった。

(3) PAC の活性化特性

PAC が光で活性化されるアデニル酸シクラーゼであることは生化学的に証明されていたが、その活性に及ぼす光の効果についての定量的な解析は行われていなかった。そこで本研究においては、ミドリムシの光受容器官画分から精製したPAC 標品を用いて、各種光照射条件下におけるアデニル酸シクラーゼ活性を調べた。まず、照射光量依存性を調べるため、青色 LED を光源として光強度および照射時間を変えて酵素反応を行い、生成したcAMPをエンザイムイムノアッセイで定量した。

その結果、PACの活性は光強度 $2\text{--}50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、照射時間 $30 \text{ s--}6 \text{ min}$ の範囲で光量依存的に上昇することが明らかになった。さらに、短時間パルスの効果を調べるため、等明暗周期の間歇照射を行うと、少なくとも 50 ms のパルスにも応答することが示された。次に、基礎生物学研究所

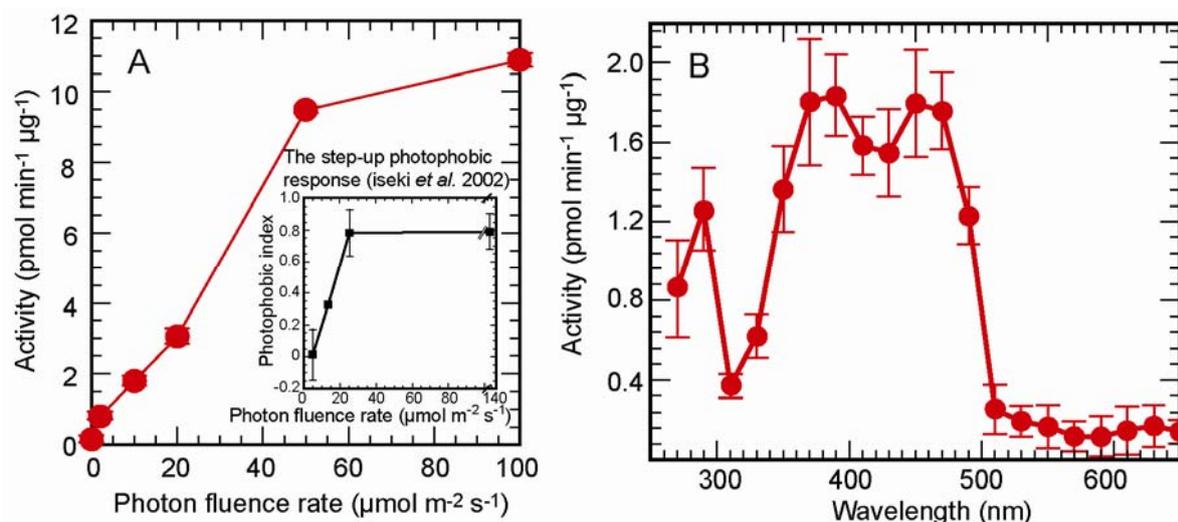


図2 PAC光活性化の光強度依存性(A)と波長依存性(B)

の大型スペクトログラフを利用して PAC 活性化の波長依存性を調べると、効果のピークは、UV-B/C 域、UV-A 域、および青色域に存在することが明らかとなった。これらの結果はいずれもミドリムシの光応答現象を説明するに足るものでもあり、細胞機能制御ツールとして利用するための基礎データを与えるものである(図2)。

(4) 大腸菌における機能発現

細胞機能制御を目指す第一段階として、大腸菌のアデニル酸シクラーゼ欠損株 (MK1010, Kawamukai *et al.* 1991 J. Bacteriol. 173, 264)を用いて機能相補を試みた。pBR322 あるいは pSTV28 をベースとした改変ベクターに PAC サブユニット全長あるいは一部分をコードする cDNA を組み込んで MK1010 を形質転換し、マッコンキー寒天培地で培養すると、C1 ドメインおよび C2 ドメインを含む場合のみ cAMP 産生を示すコロニーの赤色化が観察された。また、液体培養により菌体内の cAMP 量を調べると、やはり C1 と C2 が共存する場合のみで cAMP レベルの上昇が起こっていることがわかった。このことは、PAC は大腸菌内でアデニル酸シクラーゼとしての活性を発揮することを意味し、そのためには触媒ドメインとして C1 と C2 の相互作用が必要であることを示唆する。しかしながら、この系においては光照射による活性の上昇はみとめられなかった。

(5) アメフラシ感覚ニューロンにおける機能発現

学習・記憶といった高次の中枢機能に cAMP が関与していることはよく知られており、神経細胞において PAC の機能発現が実現できれば、今後、脳科学・神経科学分野における有用なツールとなることが期待される。そこで本研究では、軟体動物アメフラシ (*Aplysia kurodai*)を用いて感覚ニューロンにおける PAC の機能発現を試みた。実験材料としてアメフラシを用いた主な理由は、ニューロンが大きくタンパク質の微小注入が可能であること、個々のニューロンの識別が容易であること、学習を反映する cAMP 応答現象が既に報告されていること、の3点である。

微小電極を用いた直接注入法によって被検溶液(cAMP 溶液、ミドリムシから精製した PAC 溶液等)をアメフラシ側神経節内の感覚ニューロンに導入した。これに任意のタイミングで脱分極通電して活動電位を発生させ、電位変化を記録した。結果として、cAMP 溶液を注入した場合には活動電位ピーク高の低下と活動電位幅の増大がみとめられた。一方、PAC 溶液を注入した場合には、暗所では変化が見られなかったが、青色光を照射すると徐々にスパイク高が低下し、スパイク幅が広がった(図3)。このことから、アメフラシ感覚ニューロンに注入された PAC は正常に機能し、青色光で活性化されて cAMP を産生していると考えられる。さらに、アメフラシ用発現ベクターを構築し、PAC を感覚ニューロンで発現させると、光照射に伴って顕著な活動電位ピーク高の低下がみられた。このことから、アメフラシ感覚ニューロンにおいて、PAC は活性を保持した状態で発現し、光に応答して cAMP を生成可能であることが明らかになった。

以上のことは、動物神経細胞においても PAC の機能発現が可能である事を示しており、今後、神経ネットワークの形成や学習・記憶等の高次現象を光で制御できる可能性をも示唆するものである。

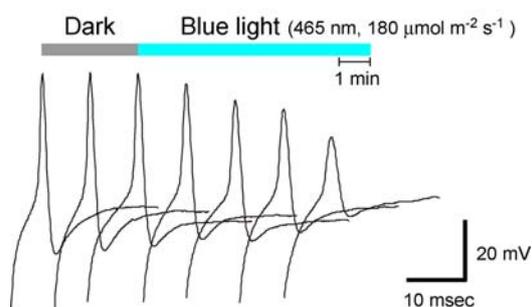


図3 PAC を注入したアメフラシ感覚ニューロンの活動電位に及ぼす光の効果

5 自己評価:

本研究の当初計画は、最終目標である細胞機能の光制御に向けて3つの研究項目、すなわち、1. 関連未解明光センサーの探索、2. 光活性化の分子機構の解明、3. 生体内光スイッチへの応用、を設定し、これらを有機的に結び付けつつ同時進行することで目標の早期達成を目指すものであった。実際に本研究はこの計画に則って進め、上述の研究成果のうち、(1)と(2)は第1項目、(3)は第2項目、(4)と(5)は第3項目に相当するものである。

第1項目の目指すところは、PAC 類似タンパク質を探索してその系統を探ること、光集合センサーを同定すること、PAC よりも優れた特性を持つ光センサータンパク質を探ること、の3点あり、一番目の目標は研究成果(1)により十分に達成された。二番目、三番目の目標は残念ながら達成できなかったが、その過程において、世界に先駆けてミドリムシの EST データベースを構築し、複数の新規タンパク質を同定することができた(研究成果(2))。また、これらの研究成果は進化系統学者の興味も大いに喚起し、現在、共同研究を立ち上げてさらなる発展が見込まれている。

第2項目の目指すところは、PACの大量精製系を確立し、それをを用いてPAC活性の基本的性質を明らかにして光活性化のメカニズムに迫ろうとするものである。大腸菌におけるPACの大量発現・精製法確立のために非常に多くの時間を費やしたものの、結局、PAC本来の活性を保持した試料を得ることはできず、色素結合領域を含む部分タンパク質の解析に留まった。しかしながら、ミドリムシから精製した試料を用いて光活性化の基本特性を明らかにすることができ、今後の応用へ向けての重要な基礎データが得られた(研究成果(3))。

第3項目の目指すところは、実際にPACを他の生物に導入することにより、その細胞機能を光で制御しようとする試みである。まず、最も単純な系としてアデニル酸シクラーゼ欠損大腸菌を用いた機能発現を試みたが、ここでは酵素活性はみとめられたものの、光に対する応答はみられず、不十分な結果であった(研究成果(4))。しかしながら、より複雑で実現が難しいと思われていた動物の神経細胞において、PACの機能発現が実現できたことは大きな収穫であり、今後、PACを細胞機能制御ツールとして本格的に利用するための足掛かりが得られた(研究成果(5))。

以上、3つの研究項目を同時進行したことは、プロジェクトの規模として拡大しすぎたきらいもあるが、そのことで、PACに関する総合的知識が集積し、進化系統学や神経科学方面への新たな展開の道筋も見えてきた。今後、これらの分野でのさらなる発展を図るとともに、本研究で達成できなかった課題を解決していく必要がある。PACは稀有な純国産の光センサータンパク質であり、我々が世界をリードすることは重要な責務と考える。今後一層の努力を重ねたい。

6 研究総括の見解:

伊関氏は、既に単細胞生物ミドリムシで、光センサーである光活性化アデニル酸シクラーゼ(PAC)が、光で活性化されて環状アデノシン 3',5'-リン酸(cAMP)を生成する酵素である事を見つけていた。本研究では、この光センサータンパク質の全体像を明らかにすると共に、それを利用してさまざまな細胞機能の光制御を試みた。

PAC 類似タンパク質の探索とその系統解析の研究の成果としては、PAC よりも優れた特性を持つ光センサータンパク質は発見できなかったが、ミドリムシ類のアデニル酸シクラーゼの進化経路を明らかにし、ミドリムシの EST データベースを構築し、複数の新規タンパク質を同定し、進化系統学者の興味を喚起している。最終目標の細胞機能の光制御への応用では、軟体動物アメフラシの感覚ニューロンにPAC溶液を導入し、PACに活性を保持した状態を発現し、青光に応答してcAMPを生成している様子を、活動電位に及ぼす光の効果を測定して明らかにした。

目標は達せられたが、この純国産の光センサータンパク質PACのより一層の深い研究と、今回は果たせなかったPACよりも優れた特性を持つ光センサータンパク質を見つけ出し、横方向への広がりを今後期待したい。

7 主な論文等:

論文(6件):

(1) Ntefidou, M., Iseki, M., Watanabe, M., Lebert, M. and Häder, D.-P. Photoactivated adenylyl

- cyclase controls phototaxis in the flagellate *Euglena gracilis*. *Plant Physiol.*133, 1517–21 (2003)
- (2) Koumura, Y., Suzuki, T., Yoshikawa, S., Watanabe, M. and Iseki, M. The origin of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), the *Euglena* blue-light receptor: phylogenetic analysis of orthologues of PAC subunits from several euglenoids and trypanosome-type adenylyl cyclases from *Euglena gracilis*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 580–586 (2004)
- (3) Murakami, A., Miyashita, H., Iseki, M., Adachi, K. and Mimuro, M. Chlorophyll *d* in an epiphytic cyanobacterium of red algae. *Science* 303, 1633 (2004)
- (4) Yoshikawa, S., Suzuki, T., Watanabe, M. and Iseki M. Kinetic analysis of the activation of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), a blue-light receptor for photomovements of *Euglena*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 4, 727–731 (2005)
- (5) Ito, S., Murakami, A., Sato, K., Nishina, Y., Shiga, K., Takahashi, T., Higashi, S., Iseki, M. and Watanabe, M. Photocycle features of heterologously expressed and assembled eukaryotic flavin-binding BLUF domains of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), a blue-light receptor in *Euglena gracilis*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 4, 762–769 (2005)
- 他1件。

総説・著書(6件):

- (1) 伊関峰生・渡辺正勝 藻類の光受容体—最近の知見から— 堀輝三・大野正夫・堀口健雄編「21世紀初頭の藻学の現況」日本藻類学会 pp.45–47 (2002)
- (2) 伊関峰生・渡辺正勝 光受容の分子機構—ミドリムシの光運動反応にかかわる光センサー— 遺伝 58, 36–41 (2004)
- (3) Watanabe, M. and Iseki, M. Discovery and characterization of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), a novel blue-light receptor flavoprotein, from *Euglena gracilis*. in *Handbook of Photosensory Receptors* (Briggs, W. R. and Spudich, J., eds.) Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp.247–260 (2005).
- (4) Iseki, M., Matsunaga, S., Murakami, A. and Watanabe, M. Photoactivated adenylyl cyclase (PAC), the photoreceptor flavoprotein with intrinsic effector function mediating euglenoid photomovements. in *Comprehensive Series in Photosciences: Photochemistry and Photobiology of Flavins* (Silva, E. and Edwards, A. M., eds.) Elsevier, in press.
- 他2件。

招待講演(2件):

- (1) Iseki, M., Ntefidou, M., Häder, D.-P. and Watanabe M. Photoactivated adenylyl cyclase and its homologues, a novel photosensory flavoprotein family. The 31st Annual Meeting of the American Society for Photobiology, Baltimore (2003)
- (2) Iseki, M., Ntefidou, M., Häder, D.-P. and Watanabe, M. Photoactivated adenylyl cyclase (PAC), a blue-light receptor for photomovements of *Euglena*. The 14th International Congress on Photobiology, Cheju (2004)

一般発表(招待講演以外):

国際会議1件、国内会議9件