

機関番号：12702

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006 ～ 2010

課題番号：18077003

研究課題名(和文) 一人三役の光センサー蛋白、光活性化アデニル酸シクラーゼの分子内ドメイン相互作用

研究課題名(英文) Interactions among intramolecular domains of Photoactivated Adenylyl Cyclase (PAC), the blue-light sensor with intrinsic effector function

研究代表者

渡辺 正勝 (WATANABE MASAKATSU)

総合研究大学院大学・先導科学研究科・教授

研究者番号：40124226

研究成果の概要(和文)：我々がミドリムシから発見した、光を感じて細胞諸機能制御因子環状 AMP を生成する光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC) について：4 量体構造をとり、水素結合ネットワークの異なる 2 状態を行き来し、高感度・低速度とその逆の 2 成分から成ることを解明；光感受に伴う蛋白質構造変化の解析に強力な一分子赤外線吸収分光法を開発；複数の生物に遺伝子的に導入して神経活動や行動の光制御に成功；その遺伝子の染色体上局在を多数検出。

研究成果の概要(英文)：Biophysical studies performed to elucidate the mechanisms how the euglenoid photoreceptor photoactivated adenylyl cyclase (PAC) converts light signal to cyclic AMP, the versatile second messenger, have led to the following outcomes: electron micrographic details of its tetrameric structure, spectroscopic unveiling of its two states of hydrogen bond networks, division of labor between high-sensitivity-low-speed and the opposite subunits, invention of the single-protein infrared spectroscopic method, photomanipulation of neuronal and behavioral activities of various organisms by heterologous expression of PAC, and elucidation of PAC gene localization along the *Euglena* chromosomes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	11,300,000	0	11,300,000
2007年度	13,400,000	0	13,400,000
2008年度	14,200,000	0	14,200,000
2009年度	12,300,000	0	12,300,000
2010年度	12,300,000	0	12,300,000
総計	63,500,000	0	63,500,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学／生物科学・機能生物化学

キーワード：光センサー・フラビン・環状 AMP・ドメイン相互作用・細胞行動

1. 研究開始当初の背景

最近申請者らが単細胞藻ミドリムシの副鞭毛体より同定した、「光活性化アデニル酸シクラーゼ」(Photoactivated Adenylyl Cyclase; PAC) (Iseki *et al.* 2002: Nature

415, 1047-1051) は、青色光に応答して鞭毛運動を変化させ細胞の強光からの逃避行動をもたらず、光 on のセンサーである一人三役(光センシング・信号伝達・セカンドメッセンジャーcAMP合成)のフラビン蛋白質で

ある。

2. 研究の目的

上記の「光活性化アデニル酸シクラーゼ」(PAC)について、光による酵素活性のスイッチング機構を解明する。そのために、発色団-アポ蛋白質相互作用および光センサードメインとアデニル酸シクラーゼドメインの分光学的および構造生物学的解析を行う。

3. 研究の方法

主としてミドリムシから生化学的に精製したPACタンパク質を試料として、一分子分光および電子顕微鏡的単粒子解析を行った。光反応速度論解析においては、大腸菌にて異種発現させたPACの光感受ドメインを試料とした。神経活動等の光操作においては、PACのcDNAを発現ベクターにつないだものを顕微注射等によって目的細胞あるいは組織に導入・発現した。

4. 研究成果

(1) 単一分子分光分析：東工大グループとの共同で、反射型対物レンズを機軸とした共焦点光学系を用いて、液体ヘリウム温度下におけるPACの単一分子蛍光測定をおこなってきた。その結果、PAC 1分子には8個のFADが結合していることが示されたほか、PACには水素結合ネットワークの異なる2つの状態が存在し、これが光スイッチングを反映したものであることが示唆された(論文①)。光センシングに伴って予想されるタンパク質高次構造の変化の検出と解析のために有効な赤外線吸収分光を一分子で可能にする手法を開発し論文報告した(東工大松下道雄准教授らと共同、論文③)。

(2) 構造と機能に関する理論解析：PACの機能ドメインのホモロジーモデリングを行い、それを基にしたドッキング解析により α サブユニット、 β サブユニット、PAC分子全体像のモデルができた。

(3) 単粒子解析：大阪大グループとの共同で電子顕微鏡によるPACの単粒子解析を行った。ミドリムシから精製したPAC分子の3次元構造再構築に成功しており、明瞭な4量体構造を明らかにするとともに、各機能モジュールのホモロジーモデリングおよびドッキング解析によって得られたモデルとの高い一致性を示した(大阪大岩崎憲治准教授・アドバンスソフト長谷川浩司博士らと共同、学会発表③④)。さらに、ミドリムシの光受容オルガネラに見られる格子状構造もPACの配置で説明可能であることが示された(学会発表③④)。

(4) 光感受ドメインの光反応速度論： α サブユニットと β サブユニットのF2ドメインの光サイクル速度論解析により、 α と β では、感度と速度に違いがあり(前者は高感度・低速度で後者は逆)、その違いの大半は一つのアミノ酸に帰属できることを明らかにした(論文②)。

(5) ドメイン間相互作用の解析：ミドリムシの光逃避行動の光センサーPACは、そのサブユニットであるPAC α とPAC β のそれぞれに、光センサードメイン(F1, F2)と、アデニル酸シクラーゼ酵素ドメイン(C1, C2)を持ち、それらの相互作用により青色光で活性化される。この相互作用を解析するために、大腸菌における機能相補を行った。C1とC2が共存することと、最低1つのフラビン結合ドメインが存在することが、アデニル酸シクラーゼの活性に必須であった。

(6) 光活性化アデニル酸シクラーゼの導入による神経活動等の光制御：PACを細胞工学的に任意の細胞に導入して光条件により細胞内cAMP濃度を人為的に変化させ、各種の生命活動をコントロールする「細胞機能光スイッチ」として応用する可能性については、PACの発見当初より提唱していた。東邦大の長濱辰文教授らとの共同で、cAMPによる神経応答現象が良く知られるアメフラシ感覚ニューロンにPACを導入したところ、光照射によって活動電位が変化することが明らかとなった(論文⑩)。また、ドイツグループとの5年の共同研究の成果として、アフリカツメガエル卵母細胞やヒト培養細胞においてPACの機能発現を実現し、さらにはショウジョウバエにおいて個体レベルでの行動の光制御に成功した(論文⑮)。

(7) 光センサー分子遺伝子の染色体上局在位置：PAC遺伝子のミドリムシ染色体上での局在を蛍光in situ hybridization法により多数検出した(学会発表①)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計15件)

- ① Fujiyoshi S, Hirano M, Matsushita M, Iseki M, Watanabe M, Structural change of a cofactor binding site of flavoprotein detected by single-protein fluorescence spectroscopy at 1.5 k., Phys Rev Lett., 査読有, 2011, 106(7), 078101 (e-pub).
- ② Ito S, Murakami A, Iseki M, Takahashi T, Higash S, Watanabe M,

- Differentiation of photocycle characteristics of flavin-binding BLUF domains of a- and b-subunits of photoactivated adenylyl cyclase of *Euglena gracilis*. , Photochem. Photobiol. Sci., 査読有, 2010, 9, 1327-1335.
- ③ Fujiyoshi S, Furuya Y, Iseki M, Watanabe M, Matsushita M, Vibrational Microspectroscopy of Single Proteins., J. Phys. Chem. Lett., 査読有, 2010, 1, 2541-2545.
- ④ Matsunaga S, Uchida H, Iseki M, Watanabe M, Murakami A., Flagellar motions in phototactic steering in a brown algal swarmer., Photochem Photobiol., 査読有, 2010, 86(2), 374-381.
- ⑤ Kim E, Park JS, Simpson AG, Matsunaga S, Watanabe M, Murakami A, Sommerfeld K, Onodera NT, Archibald JM., Complex array of endobionts in *Petalomonas sphagnophila*, a large heterotrophic euglenid protist from Sphagnum-dominated peatlands., ISME J., 2010, 査読有, 4(9), 1108-1120.
- ⑥ Suzuki T, Izawa N, Takashima T, Watanabe M, Takeda M, Action spectrum for the suppression of arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*, Photochem Photobiol., 査読有, 2009, 85(1), 214-219.
- ⑦ Suzuki T, Watanabe M, Takeda M, UV tolerance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. , J. Insect Physiol., 2009, 査読有, 55(7), 649-654.
- ⑧ Ikehata H, Shoichi S, Watanabe M, Hieda K, Ono T, Analysis of action spectra of UV-induced mutation in mouse skin., 2009, 査読有, Photomed. Photobiol. 31, 3-4.
- ⑨ Maruyama S, Misawa K, Iseki M, Watanabe M, Nozaki H, Origins of a cyanobacterial 6-phosphogluconate dehydrogenase in plastid-lacking eukaryotes., BMC Evol Biol., 2008, 査読有, 8, 151-161.
- ⑩ Nagahama T, Suzuki T, Yoshikawa S, Iseki M, Functional transplant of photoactivated adenylyl cyclase (PAC) into *Aplysia* sensory neurons. , Neurosci Res., 2007, 査読有, 59(1), 81-88.
- ⑪ Nozaki H, Iseki M, Hasegawa M, Misawa K, Nakada T, Sasaki N, Watanabe M, Phylogeny of primary photosynthetic eukaryotes as deduced from slowly evolving nuclear genes., Mol Biol Evol., 2007, 査読有, 24(8), 1592-1595.
- ⑫ Shihira-Ishikawa I, Nakamura T, Higashi S, Watanabe M, Distinct responses of chloroplasts to blue and green laser microbeam irradiations in the centric diatom *Pleurosira laevis*. , Photochem Photobiol., 2007, 査読有, 83(5), 1101-1109.
- ⑬ 伊関 峰生, ミドリムシにおける光センシングの分子機構, 原生動物学雑誌, 2007, 査読無, 40(2), 93-100
- ⑭ 渡辺 正勝, 伊関 峰生, 松永 茂, 植物は感じて動く 微細藻類の光運動反応 - 単細胞鞭毛藻ミドリムシを例に, 遺伝, 2007, 査読無, 61, 81-82
- ⑮ Schröder-Lang S, Schwärzel M, Seifert R, Strünker T, Kateriya S, Looser J, Watanabe M, Kaupp UB, Hegemann P, Nagel G, Fast manipulation of cellular cAMP level by light in vivo., Nat Methods., 2007, 査読有, 4(1), 39-42.
- [学会発表] (計 22 件)
- ① 澁澤麻実 他, *Euglena gracilis* における核分裂と染色体の特徴, ユーグレナ研究会第 26 回研究集会, 2010 年 11 月 13 日, 東京大学農学部(東京・本郷)
- ② 大友康平 他, 数 K の単一分子分光法による光合成アンテナタンパク質の発光励起スペクトルに現れる構造変化の起源探求, 第 4 回分子科学討論会, 2010 年 9 月 14 日-17 日, 大阪大学豊中キャンパス(大阪・豊中市待兼山町)
- ③ 宮崎直幸 他, 非晶質氷切片を使用した極低温電子顕微鏡による in vivo 構造解析, 第 10 回日本蛋白質科学会年会, 2010 年 6 月 16 日-18 日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)
- ④ 宮崎直幸 他, CEMOVIS による *Euglena* の構造解析, 日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会, 2010 年 5 月 25 日, 名古屋国際会議場(愛知・名古屋)
- ⑤ 岩田達也 他, 2 種類の BLUF ドメイン, AppA と PAC の赤外分光解析, 第 47 回日本生物物理学会年会, 2009 年 11 月 1 日, 徳島文理大学・徳島キャンパス・アスティ徳島(徳島)
- ⑥ 藤芳 暁 他, 光活性化アデニル酸シクラーゼの単一タンパク質分光, 第 3 回分子科学討論会, 2009 年 9 月 24 日, 名古屋大学東山キャンパス(名古屋)
- ⑦ 松永 茂 他, 褐藻遊走子の走光性: 光で起こる後鞭毛の一過性の速い振動が遊泳方向を調節する, 日本植物学会第 73

- 回大会、2009年9月17日、山形大学・小白川キャンパス（山形）
- ⑧ Watanabe M et al.、Single molecule studies on fluorescence and 3-dimensional structure of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), the sensor for photoavoidance in *Euglena*.、The 13th Congress of the European Society for Photobiology (招待講演)、2009年9月8日、The Faculty of Law, University of Wrocław (Wrocław, Poland)
- ⑨ Iseki M et al.、Single molecule analyses of structure and function of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), a sensor for photomovement in *Euglena*.、The 15th International Congress on Photobiology (招待講演)、2009年6月20日、Congress Centre Düsseldorf (Düsseldorf, Germany)
- ⑩ 宮崎直幸 他、電子顕微鏡によるミドリムシ光センサータンパク質 Photoactivated Adenylyl Cyclase (PAC) の構造解析、第9回日本蛋白質科学会年会、2009年5月21日、熊本全日空ホテルニュースカイ（熊本）
- ⑪ 石床知佐江 他、ミドリムシの step down 光驚愕反応に関与する光センサータンパク質の精製と同定、日本生物高分子学会 2008 年度大会、2008年11月14日、京都学園大学バイオ環境館（京都・亀岡）
- ⑫ 長谷川浩司 他、フラグメント分子軌道法によるミドリムシ光センサー-PAC とフラビン発色団との相互作用解析、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008年3月29日、名城大学天白キャンパス（名古屋）
- ⑬ Nagahama T et al., Functional transplant of photoactivated adenylyl cyclase (PAC) into *Aplysia* sensory neurons., The 8th Asia Pacific Marine Biothchnology Conference, 2008年11月13日、Busan, Korea
- ⑭ 藤芳 暁 他、低温のタンパク質分光の励起過程の検討、第2回分子科学討論会、2008年9月26日、福岡国際会議場（福岡）
- ⑮ Nagahama T et al., Functional transplant of photoactivated adenylyl cyclase (PAC) into *Aplysia* sensory neurons., The 34th Meeting of the American Society for Photobiology (招待講演), 2008年6月25日、Burlingame, CA
- ⑯ Watanabe M, Attempts at photoregulation of neural and developmental phenomena by using photoactivated adenylyl cyclase (PAC) of euglenoid origin., Channelrhodopsin and light-gated enzymes, 2008年5月21日, Frauenchiemsee, Germany
- ⑰ 伊関峰生、ユーグレナの光センサー、光活性化アデニル酸シクラーゼの遺伝子構造、ユーグレナ研究会第23回研究会、2007年11月17日、大阪府立大学(大阪)
- ⑱ Hasegawa et al., K, Flavin-Binding Properties of Photoactivated Adenylyl Cyclase (PAC) in *Euglena gracilis*: Ab initio Fragment Molecular Orbital (FMO) Calculations., 情報計算化学生物学会 2007 年大会, 2007年10月3-5日, 広島大学・東広島キャンパス (広島)
- ⑲ 丸山真一朗 他、二次共生藻および非光合成原生生物におけるシアノバクテリア型遺伝子の進化的系譜、日本植物学会第71回大会、2007年9月22日、東京理科大学(野田)
- ⑳ 平野充遥 他、二波長の励起光を同時に利用できる低温の単一タンパク質分光装置の開発、第1回分子科学討論会、2007年9月18日、東北大学・川内北キャンパス(仙台)
- ㉑ Nozaki H et al., "Super" plant kingdom reinstated: nonmonophyly of primary photosynthetic eukaryotes as deduced from slowly evolving nuclear genes, PSA Annual Meeting 2007 with the International Society of Protistologists (ISOP), 2007年8月6-9日, Providence, Rhode Island, USA
- ㉒ Maruyama S, Origin of the cyanobacterial *gnd* gene in secondary phototrophs and non-photosynthetic protists., PSA Annual Meeting 2007 with the International Society of Protistologists (ISOP), 2007年8月6-9日, Providence, Rhode Island, USA
- [図書] (計4件)
- ① 渡辺正勝、鈴木武士、共立出版、単細胞生物の「目」寺北明久・蟻川謙太郎編「見える光、見えない光：動物と光のかかわり」、2009、96-113
- ② 渡辺正勝、クバプロ、光を見る微生物の仕組み in 爆発する光科学の世界-量子から生命体まで、2007、175-194
- ③ 鈴木武士、渡辺正勝、走光性 in 山村庄亮、長谷川宏司・編、アイピーシー、天然物化学-植物編一、2007、446、58-65
- ④ Iseki M, Matsunaga S, Murakami A, Watanabe M, RSC Publishing, Photoactivated adenylyl cyclase (PAC),

the photoreceptor flavoprotein with
intrinsic effector function mediating
euglenoid photomovements, Flavins
-Photochemistry and Photobiology,
2006, 271-286

研究者番号：

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 正勝（ WATANABE MASAKATSU ）
総合研究大学院大学・先導科学研究科
教授
研究者番号：40124226

(2) 研究分担者

伊関 峰生（ ISEKI MINEO ）
総合研究大学院大学・学融合推進センター
特別研究員
研究者番号：60414009
小川 和男（ OGAWA KAZUO ）
自然科学研究機構
岡崎共通研究アイソトープ実験センター
准教授
研究者番号：30132731

(3) 連携研究者

（ ）