

令和 3 年 9 月 27 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 20196047

氏 名 山下規央

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ノッティンガム大学 （国名： 英国 ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
光遺伝学による細胞内セカンドメッセンジャー分子の制御

3. 派遣期間： 令和 元 年 9 月 1 日 ～ 令和 3 年 8 月 31 日（ 731 日間）

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名： ノッティンガム大学

部局名： Physical Biochemistry School of Biosciences

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

【記載事項】

- 研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等
- 新型コロナウイルス感染症の影響にかかる特例措置のうち、国内採用開始・採用期間延長・翌年度渡航のいずれかの適用を受けた場合は、当該措置の適用による影響等

（注）「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

【研究目的】

光活性化アデニル酸シクラーゼは（PAC）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、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から発見され、以後、複数の原核生物からも相同遺伝子が見出されていたが、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。申請者はランソウ由来の *Oscillatoria* から見いだされた光活性化アデニル酸シクラーゼ（OaPAC）を大腸菌から単離精製、結晶化・構造解析に成功し、世界で初めて光活性化アデニル酸シクラーゼの立体構造を原子レベルでの解明に成功した（PNAS, 2016; PNAS, 2017）。本研究では、OaPACの光反応機構解明を目的として研究を行なっている。

【成果：XFEL 測定（SACLA）】

昨年度までに、OaPAC シリアル結晶を 0.1M Bis-Tris pH 6.8, 0.1M CaCl₂, 10%PEG550 の条件で、分解能 2.3 Å の反射点が確認し、構造解析が可能なデータであることを確認した。また、シリアル結晶化の再現性を確認することに成功した。多数のシリアル結晶を用いて青色光（440nm）の有無による OaPAC の時分割測定を Diamond Light Source で行い、構造変化のコンフォメーション確認を試みたが、施設へのレーザー使用の規制（研究所法則）により、行うことができなかった。そこで、日本での XFEL 測定（SACLA）に向け、サンプル調整を行った。結晶化はオイルバッチ法により、微小結晶の作製に成功した（図 1）。また、調製した微小結晶（結晶サイズ：約 50μm）からは分解能 2.4 Å のデータが得られた。

XFEL 解析を行なった結果、AC ドメインと BLUF ドメイン間でマップの明瞭さに差があることが判明した（図 2(A)）。そこで単結晶を用いた常温での測定を行ったところ、同様の結果が得られることがわかった。このことから、100 K で測定したデータでは BLUF ドメインのマップがはっきりと確認できるため、常温では OaPAC の BLUF ドメインの運動性が想定より揺らぎが大きいことが示唆される（図 2(B)）。このことから、今後、フラビン分子を保有する BLUF ドメイン部分のマップをより明確にするため、より高分解能の結晶を作製することを試みる予定である。

図 1. OaPAC シリアル結晶作製方法

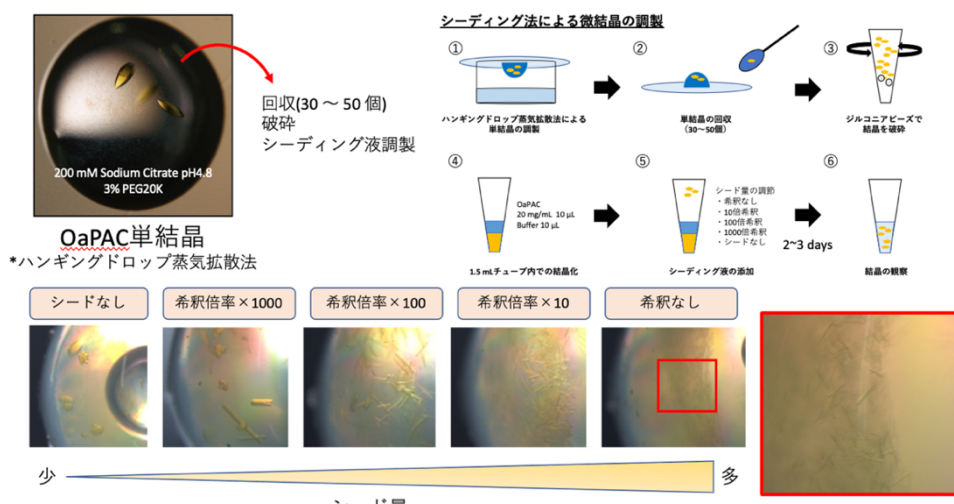
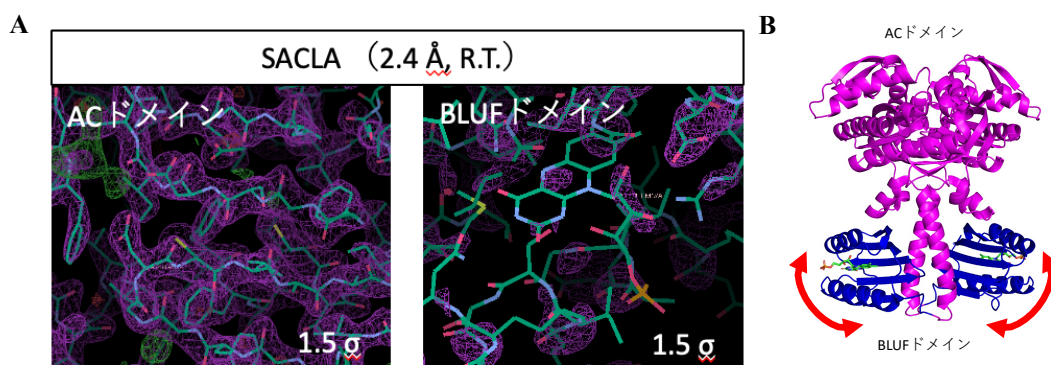


表 1. SACLA 測定実験の結晶サイズと濃度 (左) とデータ測定結果 (右)

SACLA測定		OaPAC MicroCrystal_XFEL	
2020/10/7 SACLA		Resolution	2.4 Å
濃度 (個/mL)	2.2×10^8	R _{work}	0.2305
最大 (μm)	36.66	R _{free}	0.2795
最小 (μm)	8.95	RMS(angles)	0.6
平均 (μm)	27.71	RMS(bonds)	0.003
		Size Ave.	27.71 μm
		Concentration	2.2×10^8 個/mL
		Hit rate	12~13 %

グリース 90 μL 微小結晶 10 μL

図 2. OaPAC XFEL 実験によるドメインごとのマップ変化 (A) と OaPAC の推定される構造変化 (B)



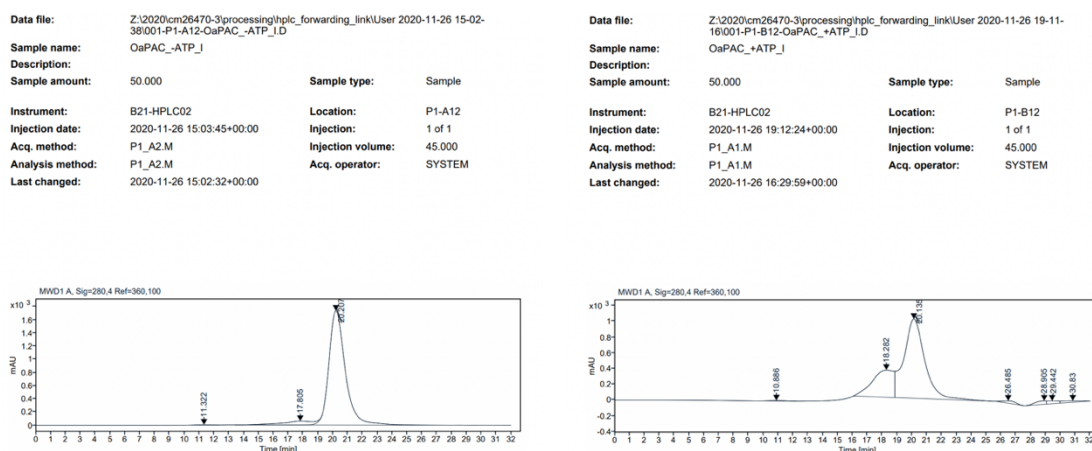
OaPAC の更なる構造変化を捉えるために、溶液における SAXS 実験を試みた。Diamond Light Source B21 のビームラインを使用し、SEC-SAXS 測定を行った。

測定条件は濃度 10mg/mL, 1.0mg/mL, 0.5mg/mL の 3 条件で、50mM Tris-HCl pH 8.5, 150mM NaCl の溶液に、それぞれに ATP を 10uM, Mg を 1mM になるように加え、調整を行った。最初の測定では SEC を使用せず、OaPAC を精製後そのまま目標濃度まで濃縮し、SAXS 測定を行った。しかし、SAXS 測定中または測定前に既にサンプルの凝集が起きており、データを収集することができなかった。おそらく、濃縮中にサンプル溶液内で凝集をしたか、時間が経つにつれて溶液内の ATP の作用によるものかと考えられる。

【成果：SEC-SAXS 用いた OaPAC の構造変化】

SEC-SAXS で濃度条件は 50mM Tris-HCl pH 8.5, 150mM NaCl の溶液に、ATP の有無と光の有無による条件検討のもと測定を行った。測定装置は bioSAXS ロボットを使用し、SEC は Superdex 200 increase を使用した。ATP 有り条件は ATP の濃度 100uM と 1mM MgCl₂ になるように調整し、バッファーに添加した。光有りの条件では、白色光の露光時間 1 秒につき 1 フレームを 60 回測定し、その後光を切って 10 フレームを測定した。その結果、まずカラムから溶出された際に、ATP 有りと無しのものでピークの違いが見られた(図 3)。ATP 有りの溶出ピークは 15-19 分のところに最初のピークが検出され、次にメインとなるピークが 19-23 分に検出された。そこで、二つのピークをそれぞれ分け、解析を行ったが、ATP 有りのバッファーは溶出ピークの分離が難しく積算したデータも凝集の影響が出ているように見られる。反対に、ATP なしのバッファーは大きなメインピークのみであり、凝集もなくピークの積算も問題ないように見られた。

図 3. SEC による OaPAC ATP 無し(左) と OaPAC ATP 有り (右)の溶出ピーク



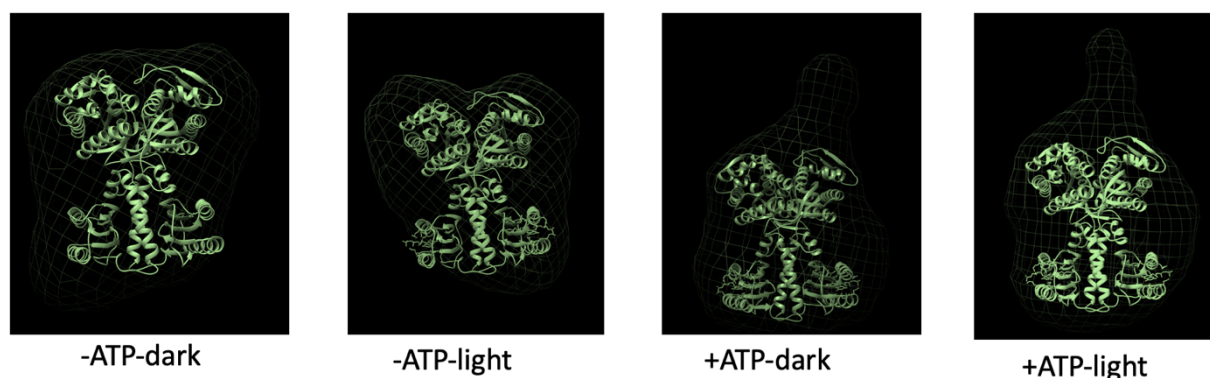
また、モデル構造に少し変化が見られた。ATP 有りのものではないのものに対し、OaPAC の分子量は約 40kDa であり、おそらく溶液中では二量体であり、アデニル酸シクラーゼの活性も二量体で機能すると考えられている。そのことから、SAXS の分子量半径の見

積もりからおおよそ 80kDa の大きさであることが確認されたため、0aPAC であることは明確である。

さらに、ATP 有りの状態において、粒子形状に興味深い違いが見られ、アデニル酸シクラーゼのドメイン上部に大きな突起が見られる(図 4)。考えられるものとして ATP が結合しているか、何かの凝集であると考えられるが、いずれにしても ATP 無しの状態とは異なる。しかしながら、光の有無では違いが見られないため、0aPAC の活性化状態であるかどうかは疑問である。

ATP 無しのバッファーを用いた場合、光有りの状態では 0aPAC のアデニル酸シクラーゼドメインの上方部は光なしの物よりも窪みができており、より AC ドメイン部分が外側に開いているように見える。このことから、溶液状態でもあまり劇的な変化を捉えることはできなかったが、ATP 無しの状態でも 0aPAC の微小な変化を捉えることができたと考えられる。

図 4. ATP 有無(+,-)、光の有無(dark, light)による SEC SAXS 実験測定結果



【まとめ】

今回、0aPAC の中間体の構造をとらえるために、シリアル結晶を用いた XFEL 実験および SAXS 実験による溶液状での解析の結果を以下のようにまとめた。

XFEL に関しては、シリアル結晶を作製することに成功し、また分解能も 2.4Å という構造解析可能な質の高いサンプルを調整することができた。また、予想していたダイナミックな構造変化をすることはなかったが、フラビン分子を保有する BLUF ドメインの動きは、大変興味深く低温状態の結晶構造よりも変化をしていることが分かった。これまでの実験では 0aPAC の結晶に 400 nm 付近の青色光を 20-6-秒照射し、低温で反応をトラップした構造を検討するものだった。その際には、BLUF ドメインの変化はほとんどなく、むしろ AC ドメインの動きが顕著にみられた。しかしながら、XFEL 実験の場合では、室温で行っているため、より 0aPAC 自体の構造変化が大きくなる。その証拠に 2.4Å の分解能にも関わらず、BLUF ドメインの電子密度マップがあまり見られない。さらに、in house での室温における X 線照射実験も同様の電子マップが得られたことから、室温の状態での X 線照射実験をした場合、BLUF ドメインが顕著な動きをとることが考えられる。

SAXS 測定による溶液中での 0aPAC 構造変化は、ATP 無しの場合、光の有無による変化は見られなかった。しかし溶液状では SEC 溶出ピークはシングルピークとなっている。また、0aPAC の分子量は約 40kDa であり、溶液中では二量体を形成していることが分かっていることから、0aPAC 全体のサイズは約 80kDa である。SEC SAXS においても粒子サイズはおおよそ 80-92kDa と見積もられ、正しい構造をとっている。しかしながら、ATP 有りの場合では、SEC 溶出ピークもシングルピークではなく、おそらく四量体サイズ付近に最初の溶出ピークが見られ、次にメインとなる二量体のピークが見られた。また、粒子半径も ATP 有りのものは AC ドメインと見られる上部付近に大きな突起が見られ、少し変化が見られたが、この突起が何なのかは不明である。

以上のことから、XFEL 実験に関しては今後、さらなる高分解能結晶を作製し、より

詳細な構造情報、構造変化をとらえるために検討していきたいと考えている。また、SAXS 実験では、今回は ATP を使用したが、反応が行われているかも疑問であり、また、ATP 溶液では不安定な状態であると考えられるので、今後 ATP のアナログや塩濃度などを高くするなどして、SEC-SAXS を再度検討したいと考えている。