

光センサータンパク質による細胞機能の制御

伊関峰生

自然科学研究機構 基礎生物学研究所

1. 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 (図1)。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。

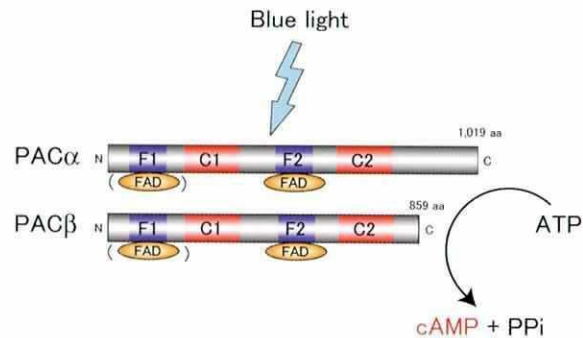


図1 PAC のドメイン構造と機能を示す模式図

2. 研究成果と考察

(1) PAC の進化的起源

PAC の発見以来、このユニークな光センサーの生物界における分布は大きな興味の対象であった。そこで、ミドリムシ近縁生物から RT-PCR による PAC の探索を行い、最終的に 10 種のミドリムシ類から PAC 類似タンパク質を検出した。これらは、光独立栄養を営むものと、それらが二次的に葉緑体を失って生じた吸収栄養を営むものに限られ、捕食性のミドリムシ類からは検出されなかった。一方、別の進化経路を辿ったと考えられるアデニル酸シクラーゼの存在も明らかとなり、PAC は二次共生に伴って獲得されたものと推測された。

(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。光回避と光集合は、反応素過程の類似性から同様に cAMP が関与していると推察され、cAMP 関連タンパク質を網羅的に調べることが光集合反応センサー同定の近道と考えられた。そこで、ミドリムシ類では従来報告のなかった EST データベースの構築に着手し、2,570 の重複を含まない EST を得た。既知配列との類似性が有意に認められる EST を分類すると、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% ずつ含み、共生進化を反映する特徴を示した。また、これらの中に複数の新規 cAMP 関連タンパク質の配列を見出し、それらの全長を決定した。

(3) PAC の活性化特性

PAC を細胞機能制御ツールとして利用するにあたり、光活性化の基本的特性を知ることは極めて重要である。そこで、ミドリムシから精製した 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。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、PAC 活性化の波長依存性ピークは、紫外域と青色域に存在すること、刺激光として 50 ミリ秒明暗周期の繰り返しパルス光を用いた場合も活性の上昇がみられること、が示された。これらはミドリムシの光応答現象を説明するに足るものであった (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。PAC サブユニット

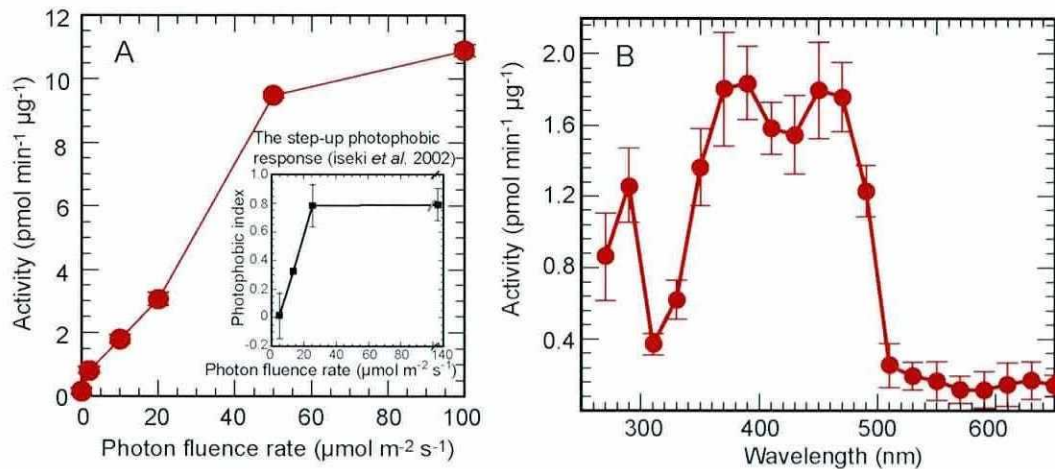


図2 PAC 光活性化の光強度依存性(A)と波長依存性(B)

全長あるいは一部分をコードする cDNA を組み込んだベクターで MK1010 を形質転換し、マツコンキ寒天培地で培養すると、C1 および C2 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、この時確かに菌体内の cAMP レベルが上昇していることがわかった。このことは、大腸菌内で発現した PAC が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、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。側神経節の感覚ニューロンに直接注入法によって PAC 溶液を導入すると、光照射に応じて cAMP 応答を反映する活動電位ピーク高の低下と活動電位幅の拡大が観察された。さらに、アメフラシ用 PAC 発現ベクターを構築して感覚ニューロンに導入すると、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。

3. 謝辞

グループメンバーとして本研究を共に遂行した吉川伸哉、鈴木武士、鈴木(高村)淑子の各氏、ならびに共同研究者としてご協力いただいた渡辺正勝教授(総研大)、長濱辰文教授(東邦大)に厚く御礼申し上げます。

4. 主な論文

- (1) 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)
- (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) 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)