

ビリベルジン結合型シアノバクテリオクロム・AnPixJg2 変異体の構造解析 Structural analysis of a cyanobacteriochrome AnPixJg2 mutant that can incorporate biliverdin

宮崎剛亜^{1,2*}, 伏見圭司^{2,3}, 成川礼^{1,2,3}

¹静岡大学グリーン科学技術研究所 〒422-8529 静岡県静岡市駿河区大谷 836

²静岡大学大学院総合科学技術研究科 〒422-8529 静岡県静岡市駿河区大谷 836

³JST CREST, 〒332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8

Takatsugu MIYAZAKI^{1,2*}, Keiji FUSHIMI^{2,3} and Rei NARIKAWA^{1,2,3}

¹Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University,
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529, Japan

²Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University,
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529, Japan

³JST CREST, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama, 332-0012, Japan

1 はじめに

光は光質（波長）、光量（強度）、照射場所、照射時間という4つのパラメーターを自由に制御することが可能なツールであり、数多くの分析技術に利用されている。最近では、光合成生物を始めとする様々な生物のゲノム情報から光を感知する「光受容体」が単離・同定され、その諸性質が明らかにされている。光受容体は色素タンパク質の一種であり、特定の波長光を吸収することによって光変換（可逆的な分子構造の変化）を示す。この特徴的な特性を利用し、光操作によって生物活性を制御する「光スイッチ」の開発を目指す光遺伝学（オプトジェネティクス）が急速に発展している中で、哺乳類に対して非侵襲、高浸透である長波長光を感知する光受容体が特に注目を浴びている。

シアノバクテリアのみに保存されている光受容体であるシアノバクテリオクロム（CBCR）はビリル色素を結合することで光変換を示す。これまでに様々な波長領域で光変換を示すCBCRが発見され、特に、シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC7120 由来のCBCR・AnPixJg2 はフィコシアノビルリン（PCB）が結合した結晶構造 [1] としてその構造が明らかにされている。我々は、CBCR を基盤に光スイッチの開発 [2] や哺乳類等の様々な生物に存在し、天然物の中で最も長波長の光を吸収するビリベルジン（BV）を結合するCBCRの発見 [3, 4] をしてきた。そこで、本研究ではBVを結合するCBCRを利用した長波長光感知型光スイッチの開発を目指し、CBCRにBVを効率的に結合させるための分子機構を明らかにすべく、AnPixJg2 を基盤にした変異導入法による色素結合効率の評価とX線結晶構造解析を行った。

2 実験

CBCRの分子構造 [1] とアミノ酸配列の比較からBVの結合に重要なアミノ酸残基を抽出し、pET28aベクターに組み込まれたAnPixJg2の各箇所部位特異的変異導入を施した。生化学的、光化学的解析から、最終的にH₂₉₃Y, F₃₀₈T, H₃₁₈Y, I₃₃₆Vの4つの変異導入を施した変異体・AnPixJg2_BV4が最も効率的にBVを結合すると判断した。AnPixJg2_BV4をBV合成系プラスミドpKT270 [5] を保有する大腸菌C41株にて発現させ、Hisタグを利用したNiアフィニティークロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーによって電気泳動的に単一に精製した。精製したタンパク質を0.2 M 硫酸アンモニウム、0.1 M カコジル酸ナトリウム（pH 6.0–6.3）、26–34% PEG3350 存在下でハンギングドロップ蒸気拡散法にて結晶化させた。X線回折実験はPF-AR NW12A ビームラインで行った。

3 結果および考察

1.6 Å 分解能でX線回折データを収集した。空間群はC₂に属し、結晶学的非対称単位中に1分子のAnPixJg2_BV4が含まれていることが分かった。野生型のAnPixJg2の立体構造 [1] を鋳型にした分子置換法によりAnPixJg2_BV4の立体構造を決定した。全体構造は野生型とほとんど一致していたが（C α のRMSDにして0.908 Å）（図1）、PCBを結合するAnPixJg2はC3¹位に結合しているのに対して、BVを結合するAnPixJg2_BV4はC3²位に結合していた（図2）。それに伴い、PCBと比べて、BVは結合ポケットの奥側にずれていた。変異導入を施した4つアミノ酸残基は、この空間的なずれによって生じた立体障害を回避するとともに、新たな水素結合ネットワークを形成することにより、色素を安定的に結合することを可能にしていると考えられた。

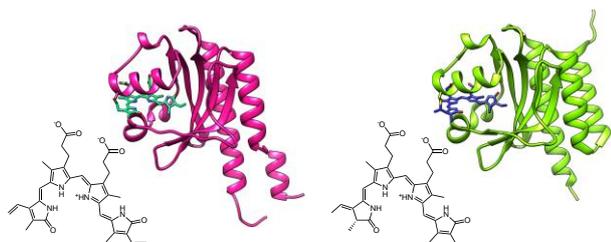


図1 : BV 結合型 CBCR・AnPixJg2_BV4 (左) と PCB 結合型 CBCR・AnPixJg2 (右) の全体構造。

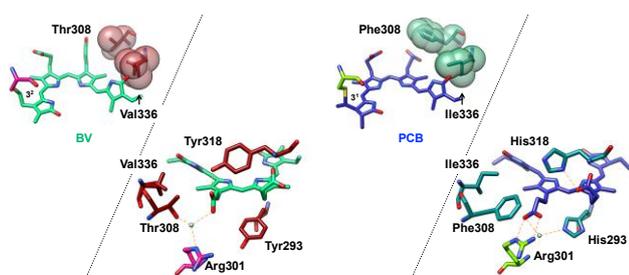


図2 : AnPixJg2_BV4 と BV (左) および AnPixJg2 と PCB (右) との相互作用の比較。PCB は 3¹ 位に結合しているのに対して、BV は 3² 位に結合している。変異導入を施した 4 つのアミノ酸残基は、BV との立体障害を回避するとともに、新たな水素結合ネットワークを形成することで色素の構造を安定化している。

4 まとめ

AnPixJg2 を基盤にした変異導入法による評価の結果、BV を効率的に結合させるために重要となる 4 つのアミノ酸残基を特定した。

この 4 つアミノ酸残基の変異導入 (H₂₉₃Y, F₃₀₈T, H₃₁₈Y, I₃₃₆V) を施した変異体・AnPixJg2_BV4 に BV を結合させた結晶から、1.6 Å の分解能で X 線回折データを収集した。

PCB を結合する野生型の AnPixJg2 と BV を結合する変異体の AnPixJg2_BV4 の分子構造を比較した結果、全体構造はほとんど一致していたが、色素との結合部位が異なっており、それに伴って、PCB と比べて、BV は結合ポケットの奥側にずれていた。

変異導入を施した 4 つアミノ酸残基は、このずれによって生じた立体障害を回避するとともに、新たな水素結合ネットワークを形成することにより、色素の結合を安定化していることが示唆された。

謝辞

X 線回折実験を行うにあたり、ご協力いただきました PF スタッフの方々に感謝申し上げます。

本研究は、JST CREST JPMJCR1653、JSPS 科研費 26702036 「若手研究 A」の助成を得て実施されました。

参考文献

[1] Narikawa, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110**, 918–923 (2013).

[2] Fushimi, K. *et al.*, *Photochem. Photobiol.*, **93**, 681–691 (2017).

[3] Narikawa, R. *et al.*, *Sci. Rep.*, **5**, 7950 (2015).

[4] Fushimi, K. *et al.*, *Front. Microbiol.*, **7**, 588 (2016).

[5] Mukougawa, K. *et al.*, *FEBS Lett.*, **580**, 1333–1338 (2006).

成果

- 伏見圭司ほか、「哺乳類内在性色素結合型シアノバクテリオクロムを基盤とした汎用的光遺伝学ツールの開発」藍藻の分子生物学 2017、2017年12月1日、かずさアカデミアホール（千葉県木更津市）
- Narikawa, R., “Molecular basis of biliverdin incorporation in the expanded red/green cyanobacteriochrome lineage” Photosensory Receptors and Signal Transduction (Gordon Research Conference), March, 5th, 2018, Renaissance Tuscany Il Ciocco (Barga, Lucca, Italy).
- 伏見圭司ほか、「哺乳類内在性色素結合型シアノバクテリオクロムの分子機構」日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 17 日、名城大学天白キャンパス（愛知県名古屋）
- 伏見圭司ほか、「哺乳類内在性色素結合型シアノバクテリオクロムを利用した光スイッチの開発」第 17 回新規素材探究研究会、2018 年 6 月 8 日、新横浜フジビューホテル（神奈川県横浜市）
- 伏見圭司ほか、「哺乳類内在性色素結合型シアノバクテリオクロムの分子機構」第 20 回光生物学協会年会、2018 年 8 月 8 日、京都大学吉田キャンパス（京都府京都市）
- Narikawa, R., “Cyanobacteriochromes covering UV-to-FR region: Newcomers to the photoreceptor field potentially useful for bio-imaging and optogenetics” 第 56 回日本生物物理学会年会、2018 年 9 月 16 日、岡山大学津島キャンパス（岡山県岡山市）
- Fushimi, K. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **116**, 8301–8309 (2019).

* miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp