

哺乳類内在色素・ビリベルジンを結合する分子の合理的設計と応用利用

静岡大学大学院総合科学技術研究科の成川礼講師（グリーン科学技術研究所兼任）、伏見圭司特任助教、グリーン科学技術研究所の宮崎剛亜助教、東京大学大学院総合文化研究科の佐藤守俊教授らは、「哺乳類内在色素・ビリベルジンを結合する分子の合理的設計と応用利用」に関する研究成果を、米国アカデミー紀要 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 誌のオンライン版で 2019 年 4 月 2 日（火）午前 5 時（日本時間）に公開されました。

シアノバクテリオクロム^{(*)1}とは、酸素発生型光合成原核生物・シアノバクテリア^{(*)2}にのみ保存されている光を感知する色素タンパク質（光受容体）であり、特定の光質や光量を感知します。以前、本研究チームは哺乳類内在性色素・ビリベルジンを結合する天然分子を発見しました。今回、ビリベルジン非結合分子と結合分子を比較することで、ビリベルジンを結合するのに重要な 4 つのアミノ酸残基を特定し、X 線結晶構造解析^{(*)3}によってその分子機構を解明することに成功しました。さらに、これら 4 つのアミノ酸残基を光スイッチや蛍光プローブの開発基盤となり得る分子に導入することで、ビリベルジン結合分子を創出することにも成功しました。中でも、顕著な蛍光を発する分子は、哺乳類の細胞を用いた *in vitro* および個体を用いた *in vivo* のどちらの実験系においても、生きた状態の細胞や組織から近赤外光の蛍光を観測することに成功しました。

今後、哺乳類内在性色素・ビリベルジンを結合するシアノバクテリオクロムを分子基盤とし、実用できる光スイッチや蛍光プローブの創出を目指した開発を進めていきます。

【研究の背景】

光受容体と呼ばれる色素タンパク質は、特定の光質（波長）や光量（強度）を感知する機能を有する分子です。この特性を利用して、光照射によって、生きた細胞や組織の中の生物活性を任意の場所、時間で制御するための光スイッチや、分子動態を観察するための蛍光プローブを開発する応用研究が盛んに行われています。特に、長波長の遠赤～近赤外光は哺乳類の細胞があまり吸収しないため、組織浸透性が高く、非侵襲的に光による制御・可視化が可能であることから、ツールの開発に期待が寄せられています。

シアノバクテリオクロムとは、シアノバクテリアのみに保存されている光受容体であり、本研究グループは、哺乳類内在性色素・ビリベルジンを結合するシアノバクテリオクロムを発見しています。また、この色素は、天然中に存在する類縁体と比べて最も長波長光を吸収することから、応用面において、有力な分子基盤となり得ます。一方、哺乳類非内在性色素・フィコシアノビルリンを結合したシアノバクテリオクロム・AnPixJg2 の分子構造は明らかにされていましたが (Narikawa, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013)、哺乳類内在性色素・ビリベルジンを結合したシアノバクテリオクロムの分子構造は明らかにされていませんでした。この分子機構を解明することができれば、光スイッチや蛍光プローブの分子基盤となる様々なシアノバクテリオクロムに合理的な改変を施すことで、応用研究を拡大することが可能になります。そこで、本研究グループは、シアノバクテリオクロムの分子構造と配列比較からビリベルジンの結合に重要となるアミノ酸残基を特定し、その分子機構を解明することを目的として研究を開始しました。

【研究の内容】

構造情報を基に、哺乳類内在性色素・ビリベルジンを僅かにしか結合しない AnPixJg2、AM1_1870g3 (Narikawa, R. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2015) と顕著に結合する AM1_1557g2 (Narikawa, R. *et al.*, *Sci. Rep.*, 2015)、AM1_C0023g2 (Fushimi, K. *et al.*, *Front. Microbiol.*, 2016)、AM1_6305g2 のアミノ酸配列を比較し、変異導入法を組み合わせた検証を行うことで、最終的に、4つのアミノ酸残基がビリベルジンの結合に重要であることを特定しました。AnPixJg2 にこの変異導入 (His₂₉₃Tyr, Phe₃₀₈Thr, His₃₁₈Tyr, Ile₃₃₆Val) を施した AnPixJg2_BV4 はビリベルジンの結合効率およびタンパク質の発現効率が他の変異体よりも有意に高いことを統計的に明らかにしました (図1A)。

次に、ビリベルジン結合型 AnPixJg2_BV4 の結晶を作製し、X線結晶構造解析を行うことで、その分子構造を解明しました (図1B)。既存のフィコシアノビルリン結合型 AnPixJg2 の分子構造と比較した結果、色素の結合に重要なアミノ酸残基の配座は同じであるにも関わらず、色素と結合する位置が異なっており、それに伴って、色素の空間的な位置がずれていることが明らかになりました。フィコシアノビルリンと比べてビリベルジンは結合ポケットの奥側にずれており、4つの変異導入したアミノ酸残基は、このずれによって生じた立体障害を回避するとともに、巧みな水素結合ネットワークを形成することで、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ます。

さらに、この変異を光スイッチや蛍光プローブの分子基盤となり得るシアノバクテリオクロムに導入し、ビリベルジン非結合分子を結合分子に合理的に改変することにも成功しました。改変に成功した分子の中で、顕著に近赤外光の蛍光を発した NpF2164g5_BV4 に着目し、哺乳類の細胞および個体を用いて、この分子を生体内に導入して蛍光の観察を行った結果、どちらの実験系においても、生きた状態の細胞や組織から近赤外光の蛍光を観測することに成功しました (図2)。

【今後の展望】

本研究は哺乳類内在性色素・ビリベルジンを結合するシアノバクテリオクロムの分子機構を解明することを目的として行われました。今後、哺乳類内在性色素・ビリベルジンを結合するシアノバクテリオクロムを分子基盤とし、特に実用可能な光スイッチの創出を目指した開発を進めていきます。

【補足解説】

光の波長と色の関係

光は周期的な「波」としての性質をもち、その長さを波長と言います。また、相対的に短い波長を短波長、長い波長を長波長と呼びます。我々が識別できる「可視光」は 400–750 nm（10 億分の 1 メートル）前後の波長領域（大まかに、紫色光：400–450 nm、青色光：450–500 nm、緑色光：500–570 nm、黄色光：570–590 nm、橙色光：590–620 nm、赤色光：620–750 nm）で、それよりも短波長の光は「紫外光」、長波長の光は「赤外光」と呼ばれます。また、「遠赤色光」または「近赤外光」の波長領域は、700–800 nm またはそれ以上の長波長の光を指します。

【用語解説】

(*1) シアノバクテリオクロム

シアノバクテリアのみがもつ光受容体であり、特定（色、強さ）の光を吸収することによって、その構造を可逆的に変化させる「光変換」を起こします。これまでに様々な波長領域の光を吸収する分子が発見され、その分子構造や光反応機構が解析されています。

(*2) シアノバクテリア

水圏を始めとするあらゆる場所に生息する酸素発生型の光合成を行う原核生物です。

(*3) X 線結晶構造解析

タンパク質などの高分子の立体構造を決定するための手法の一つです。結晶に X 線を照射して取得する回折パターンから電子密度情報が得られ、タンパク質の立体構造を原子レベルで解明することができます。

(*4) 吸収スペクトル

紫外光～赤外光の波長領域の光の吸収量を連続的にモニターした分布図です。シアノバクテリオクロムは、光変換によって、吸収する光の波長が変化するため、それぞれの吸収型の吸収スペクトルを測定し、既存のシアノバクテリオクロムと比較解析を行うことで、その分子構造や光反応機構を推定することができます。

【論文情報】

題名: Rational conversion of chromophore selectivity of cyanobacteriochromes to accept mammalian intrinsic biliverdin

雑誌名: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2019 年 4 月 2 日オンライン版掲載)

著者: Fushimi, K., Miyazaki, T., Kuwasaki, Y., Nakajima, T., Yamamoto, T., Suzuki, K., Ueda, Y., Miyake, K., Takeda, Y., Choi, J.H., Kawagishi, H., Park, E.Y., Ikeuchi, M., Sato, M., Narikawa, R.

DOI 番号: 10.1073/pnas.1818836116

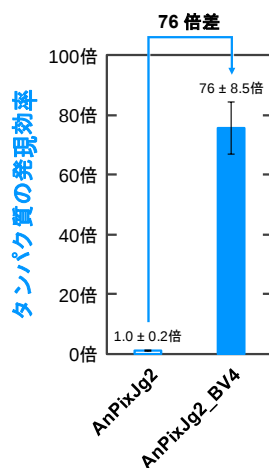
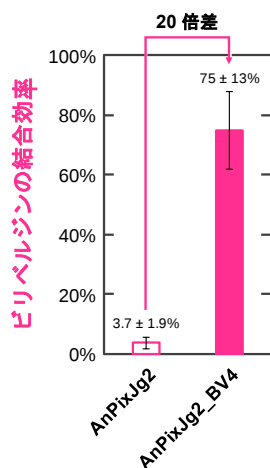
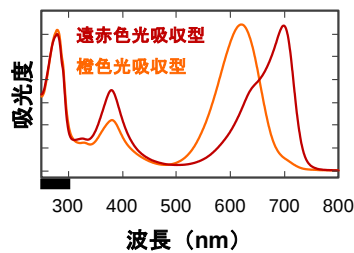
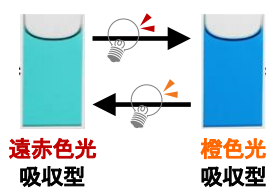
アブストラクト URL: <https://www.pnas.org/content/early/2019/04/03/1818836116.short?rss=1>

【研究助成】

本研究は、JST CREST JPMJCR1653、JSPS 科研費 26702036「若手研究 A」の助成を受けたものです。

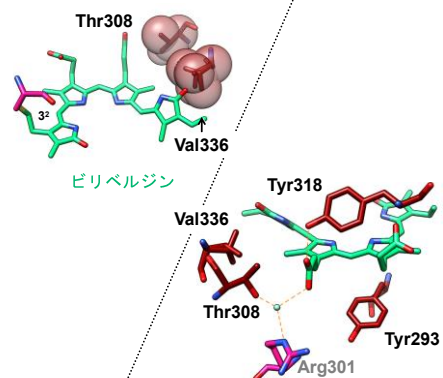
A

AnPixJg2_BV4



B

ビリベルジン結合型 AnPixJg2_BV4



フィコシアノビルリン結合型 AnPixJg2

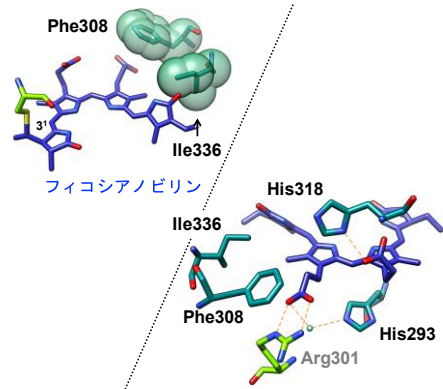
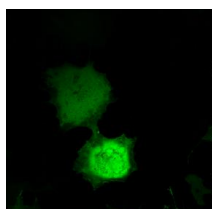
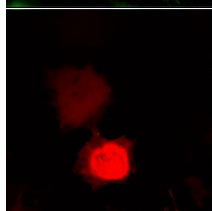
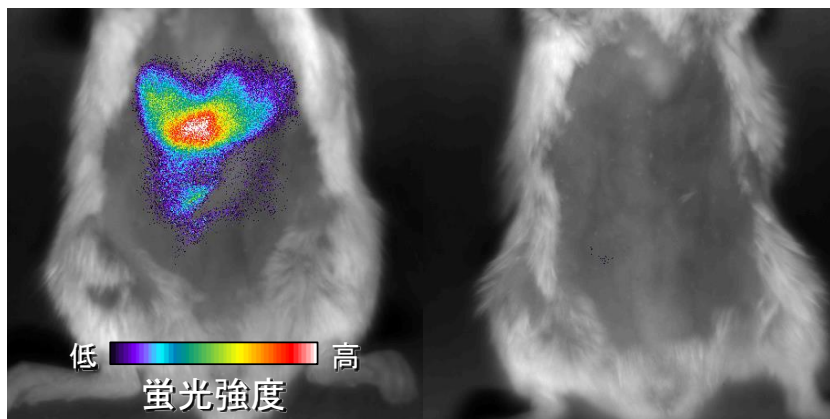


図 1 : A. 哺乳類内在性色素・ビリベルジンを結合する AnPixJg2_BV4 の色と吸収スペクトル^(*) (上)、AnPixJg2 (変異導入前) と AnPixJg2_BV4 (変異導入後) のビリベルジンの結合効率 (左下) およびタンパク質の発現効率 (右下)、B. ビリベルジン結合型 AnPixJg2_BV4 およびフィコシアノビルリン結合型 AnPixJg2 の結晶構造の比較

細胞内の蛍光

緑色光の
蛍光近赤外光の
蛍光

個体内の蛍光



NpF2164g5_BV4 あり NpF2164g5_BV4 なし

図 2 : 哺乳類内在性色素・ビリベルジンを結合し、近赤外光の蛍光を発する NpF2164g5_BV4 の哺乳類の細胞内の蛍光観察 (左上・緑色光蛍光タンパク質 GFP の蛍光、左下・NpF2164g5_BV4 の蛍光。GFP、NpF2164g5_BV4 のそれぞれの分子の蛍光を同じ細胞内で観察)、および個体内の蛍光観察 (中央・マウスの肝臓に NpF2164g5_BV4 を導入した個体の写真、右・NpF2164g5_BV4 を導入していない個体の写真)

【問い合わせ先について】

研究内容について

■静岡大学大学院総合科学技術研究科 講師

成川 礼（なりかわ れい）

■東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻

教授 佐藤 守俊（さとう もりとし）