

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07317

研究課題名(和文)無脊椎動物ロドプシンの光活性構造変化の解明

研究課題名(英文)Structural study of photo-activated meta state of squid rhodopsin

研究代表者

村上 緑 (Murakami, Midori)

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：20324387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：イカロドプシンのメタ状態は1か月以上にわたりpH依存的な可逆的な吸光変化を維持することから、その活性化構造を保持していることが示唆された。この試料を用いて結晶化を行い、酸性型メタ状態が100%形成される条件下で新規に六方晶を得ることができた。この結晶を用いて構造解析を行い、3.7Å分解能で構造を決定した。

酸性型メタ状態の全体構造は、暗順応状態の構造とほぼ同じ、ヘリックスが閉じた構造であった。活性部位では、全トランス型レチナールがイオン環を約60°回転させ、リング平面をポリエチレン鎖平面と平行に向けていた。その構造変化によって、周囲の残基の芳香族環が押され活性部位内の空隙がやや広がっていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光活性型が閉じたヘリックス構造をもつことが明らかとなり、イオン環の動きを制御することが循環型の光活性化に必要であることが示唆された。近年発展している光遺伝学のツールとしては、循環型の光活性をもつ微生物型のロドプシンが利用されているが、この結果を生かしてヒトなど高等動物に適したツールとして高等生物のロドプシンを適用することが可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The helix architecture of squid photo-activated metarhodopsin(Meta) is similar to that of the dark adapted form. The retinal chromophore is in an all-trans configuration with nearly same axial length to that of bovine Meta. The beta-ionone ring rotates ~ 60 degree to direct nearly parallel to the polyene chain plane. This rotation pushes surrounding aromatic rings of nearby residues to enlarge the binding pocket. These structural changes within the active site weaken the interhelical interactions at the cytoplasmic side. The salt bridge of the DRY motif between helices 3 and 6 is unlocked, resulting in being in partially open form in squid Meta. The protonated Schiff base of retinal hydrogen bonds to the OH group of Tyr111 in helix 3, and Asn87 and Asn185 are located within 4Å from the Schiff base. The counterion Glu180 is kept ~5Å from the Schiff base by hydrogen bonds with Ser187, Tyr190, Tyr277 and Asn185. These residues form a hydrogen bonding network within the active site.

研究分野：光生物

キーワード：光生物 ロドプシン X線結晶構造解析

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

視物質ロドプシンは網膜視細胞に存在する光受容膜蛋白質で、7本膜貫通 $\alpha$ ヘリックス構造を特徴とするG蛋白質共役型受容体(GPCR)のメンバーである。膜内に含まれる発色団レチナールが光を吸収すると、蛋白質全体の構造が変化し細胞質側表面に結合したG蛋白質へと光情報が伝えられ、視細胞を興奮へと導く。超高速、高効率の光センサとして特化した脊椎動物のロドプシンは光を吸収した活性型がすぐに分解してしまうという一見矛盾するような特徴を持つ。一方、無脊椎動物のロドプシンは光活性化状態が生理的条件下で安定であり、光活性型はさらに光子を吸収し基底状態へと戻る。さらに、無脊椎動物のロドプシンではG蛋白質の活性化効率が神経伝達物質やホルモン受容にかかわる一般GPCRと同程度に高くない。これらのことから、無脊椎動物ロドプシンの光活性化にともなう構造変化や情報伝達の様式はウシロドプシンとはかなり異なることが予想されていた。

申請者はイカロドプシンを非脊椎動物視物質型ロドプシン群のモデルとして捉え、構造生物学的観点からロドプシンの光活性化機構を解明することを目標にX線結晶構造解析に取り組んできた。これまでに明らかにしたイカロドプシンの光反応過程初期から中期までの反応中間体における一連の構造変化から、光反応にともなうレチナールの動きはロドプシンの活性部位近傍のみの構造変化を引き起こすことを突き止めた。

### 2. 研究の目的

本研究はイカロドプシンの光反応後期に至る中間体の構造解析を行い、これまでの結果と合わせてG蛋白質活性化に必要な構造変化を追跡し、GPCR活性化の分子機構を探った。具体的には、G蛋白質活性化能をもつ光産物であるメタ状態の結晶構造解析を行い、共役するG蛋白質へ活性化を伝える構造変化を明らかにすることを旨とした。

### 3. 研究の方法

イカロドプシン暗順応状態の結晶について100Kで447nmの青色光を照射すると暗順応状態、バソロドプシン、イソロドプシンの3つの異性体が光平衡状態を形成する。このP62結晶を暗条件下で240K以上に昇温すると、バソ中間体からルミ、LM中間体を経てメタロドプシンへと遷移する。この結晶を用いて回折実験を行うと回折能が著しく低下しており、メタ形成によって結晶格子内での分子間接触を壊す程の大きな構造変化がロドプシン分子に生じたと考えられた。そこで、メタ状態の試料を用いて新たに結晶化を行った。

### 4. 研究成果

#### 吸光特性の経時変化

暗順応状態のイカロドプシンを含む膜画分を4°C pH10で473nmの青色光で照射すると、吸収極大波長が480nmから380nmへとシフトした(図1、青線)。これはロドプシンがアルカリ型メタロドプシンへと完全に遷移したことを示す。この膜画分の溶液をpH7以下の酸性にすると吸収極大波長が再び480nmへと戻った(図1、赤線)。この波長シフトは可逆であり、暗順応状態のロドプシンはpH依存的な波長変化を呈しないので、吸収極大波長が480nmを示すのは酸性型メタロドプシンであることが分かった。

メタロドプシン状態の膜画分は4°C暗条件下で1か月以上に渡り吸収極大波長がpH依存的な可逆的变化を示すことから、メタロドプシンは長期間状態を保持していると考えられた。

#### 結晶化・回折実験・構造解析

この膜画分を用いて界面活性剤OGで膜を全て可溶化し結晶化を行った。様々な条件で結晶化を試みた結果、100%酸性型メタ状態が形成されるpH7以下で六方晶の結晶を得ることができた(図X)。この結晶を用いて、SPring-8において100Kで回折実験を行いデータセットを収集し、3.7Å分解能で構造を決定することができた。

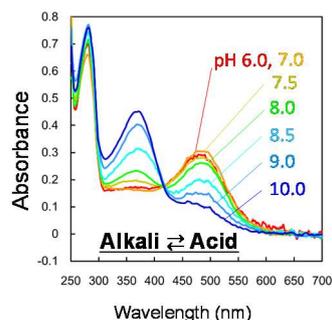


図1. 吸光特性の経時変化

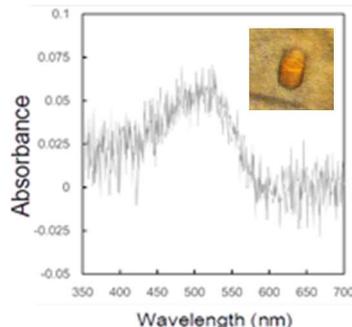


図2. 結晶の吸光曲線(六方晶の写真)

## 全体構造

構造解析の結果、メタロドプシンは全体構造が暗順応状態とほとんど変わらなかった (図 3)。すなわち、酸性型メタロドプシンは G 蛋白質活性化能をもつにもかかわらずヘリックスが閉じた構造であった。

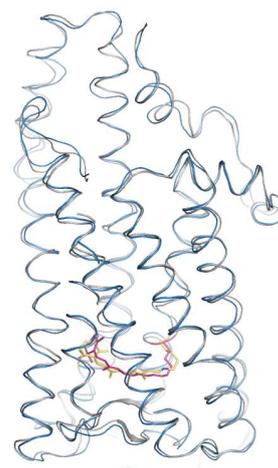


図 3. 全体構造

## 活性部位の構造

全トランス型レチナルでは、ポリエーテル鎖の構造はほぼ不変であった。一方、 $\beta$ イオン環が C6-C7 結合においておよそ  $60^\circ$  回転し、 $\beta$ イオン環とポリエーテル鎖が形成する平面がほぼ平行になった。その動きに合わせて周囲の芳香族環の側鎖は外向きに押され、レチナル結合部位の空隙をやや広げていた。レチナルの細胞質外側に位置する極性残基間に連なる水素結合網はそのまま形成されており、対イオン Glu180 も周囲の残基との水素結合によって保持されていた。プロトン化シッフ塩基は Tyr111 との水素結合によって安定化しており、周囲の Asn87 と Asn185 も 4 Å 程度の近傍に位置し水素結合によって安定化に寄与していると考えられた。そのため、シッフ塩基結合と対イオンの距離も約 5 Å を保ったままであった。(図 4)。

## 細胞質側ヘリックス間の結合

暗順応状態から LM 状態までにおいて、イカロドプシンは閉じたヘリックス構造をもつが、ヘリックス 3-6 間には細胞質側で塩橋が形成され、閉構造の保持に寄与していると考えられている。メタロドプシンでは、上記のようにヘリックス 3 がレチナルの構造変化によってやや外側に押されるため、この塩橋が外れていた (図 6)。この構造変化は閉じたヘリックス間の束縛を弱めるため、メタ状態ではヘリックスが開きやすくなると考えられる。メタ状態でヘリックスが開きっぱなしとなり高効率の G 蛋白質活性化能をもつウシロドプシンと比較して、イカロドプシンは光活性化してもヘリックスが主に閉状態にあるため、G 蛋白質の活性化効率が高くないと考えられる。

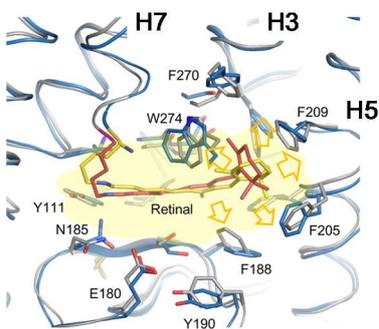


図 4. レチナルの構造

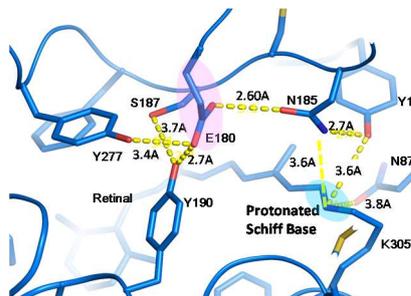


図 5. 活性部位の構造

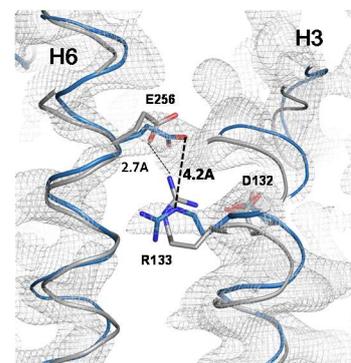


図 6. 細胞質側ヘリックス間の塩橋

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 H Kondo, M Murakami	4. 巻 2018
2. 論文標題 Crystal structures of the putative isocitrate dehydrogenase from <i>Sulfolobus tokodaii</i> strain 7 in the apo and NADP <sup>+</sup> -bound forms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archaea	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/7571984	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Murakami M, Kouyama T	4. 巻 2016
2. 論文標題 Crystal Structures of Two Isozymes of Citrate Synthase from <i>Sulfolobus tokodaii</i> strain 7	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochem. Res. Int.	6. 最初と最後の頁 7560919
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2016/7560919	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Chan SK, Kawaguchi H, Kubo H, Murakami M, Ihara K, Maki K, Kouyama T	4. 巻 55
2. 論文標題 Crystal structure of the 11-cis isomer of pharaonis halorhodopsin: Structural constraints on interconversions among different isomeric states	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 4092-4104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.6b00277	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 5件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 MURAKAMI, Midori
2. 発表標題 Structural basis of bistable photoreaction in invertebrate rhodopsin
3. 学会等名 16th Conference of the Asian Crystallographic Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 MURAKAMI, Midori
2. 発表標題 Structural Basis of Photo-Stability of Invertebrate Rhodopsins
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M Murakami
2. 発表標題 Structure of the photo-activated acid-meta state of squid rhodopsin
3. 学会等名 Asian Biophysics Association Symposium in conjunction with the Australian Society for Biophysics Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M Murakami
2. 発表標題 Towards the structural study of large conformational changes of squid metarhodopsin
3. 学会等名 18th International Conference on Retinal Proteins (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M Murakami
2. 発表標題 Crystallization of squid metarhodopsin
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上緑
2. 発表標題 Towards the structural study of the photocycle of squid rhodopsin
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村上緑
2. 発表標題 イカロドプシンの光異性化から熱的緩和反応までの結晶構造解析
3. 学会等名 平成29年度日本結晶学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村上緑
2. 発表標題 無脊椎動物ロドプシンの双安定性光活性化機構の構造学的研究
3. 学会等名 第7回名古屋大学シンクロトロン光研究センターシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Murakami M
2. 発表標題 Crystallography of squid rhodopsin towards characterizing structural dynamics and bi-stability
3. 学会等名 IGER International Symposium on Physics of Life (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Murakami M
2. 発表標題 Crystal structure of the LM intermediate of squid rhodopsin
3. 学会等名 International Conference on Retinal Proteins (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Murakami M
2. 発表標題 Another World of Rhodopsin; Structure and Function of squid rhodopsin
3. 学会等名 jLBR Seminar (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Murakami M
2. 発表標題 Crystallographic studies of squid rhodopsin
3. 学会等名 Membrane Protein Meeting (招待講演)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----