

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21651047

研究課題名（和文）色素蛋白質3量体極小カラーRGB感受性超分子ユニットの創製

研究課題名（英文）The creation of the supramolecular chromoprotein trimer unit sensible color RGB light.

研究代表者

富岡 寛顕 (TOMIOKA HIROAKI)

埼玉大学・教育学部・教授

研究者番号：50212072

研究成果の概要（和文）：

ヒトの色覚では色覚色素蛋白質が赤(R)緑(G)青(B)の各光を吸収する。それらは光分解し、不安定である。その色覚色素蛋白質に類似の細菌型蛋白質が知られ、光分解せず、安定である。3量体を形成し、R光吸収体と同じ吸収極大波長 (λ_{max}) を持つものがある。蛋白質部分や補欠分子であるレチナールの類似体置換により、GB各光の吸収体ができれば、RGB各光吸収体が揃う。それら3種から成る3量体超分子（極小3原色RGBユニット）作成が本研究の目的である。NH₂OH処理でレチナールを外し、レチナール再添加でホロ色素蛋白質が再構成できる。それらの条件をコントロールすることにより、3量体は均一ではなく不均一であることを見だし、ヘテロ3量体作製の可能性を示した。さらに蛋白質部分のアミノ酸を類似体に置き換え、80 nm 青色移動させ、G光吸収体作製にも成功した。

研究成果の概要（英文）：

Human color vision is mediated by three cone receptors in retina. Cone cells contain photosensitive protein molecules which consist of the protein opsin linked to retinal (vitamine A aldehyde), a prosthetic group. The three distinct photoreceptor proteins have absorption maxima (λ_{max}) at 560, 530 and 426 nm respectively. These absorbances correspond to the red (R), green (G) and blue (B) regions of the spectrum. The photoexcited cone pigments are degraded to opsins and retinals. These are unstable and unable to apply to photosensitive devices.

Extremely halophilic archaeobacteria have photosensitive proteins homologous with rhodopsin. These bacterial rhodopsin-like proteins are not photodegraded and extremely stable. One of the bacterial rhodopsin, bacteriorhodopsin (bR) forms trimer in the cell membrane. The absorption maximum for bR is 560 nm identical to that for the red cone pigment. If the stable chromoproteins with λ_{max} at 530 and 426 nm is able to prepared, it is possible to challenge to make the mixed trimer unit consisting of three distinct chromoproteins with absorbances corresponding to RGB regions. The creation of the artificial proteins with 80-nm blue shifted λ_{max} is successful.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	0	1,400,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	240,000	3,340,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノ材料創製、バクテリオロドプシン、3量体

1. 研究開始当初の背景

ヒトの色覚については、心理学的研究により提唱された、あらゆる色が赤(R)緑(G)青(B)の三原色の混色により得られるという Young-Helmholtz の三原色説が知られている。近年の研究で、色覚の光受容細胞である錐体（直径約 $5 \mu\text{m}$ ）は RGB 各光に対する光受容蛋白質をその細胞膜に持つことが解明された。この3種の光受容体は約 350 個のアミノ酸と補欠分子団であるレチナール(ビタミンAのアルデヒド)とから成り(レチナール蛋白質)、生体内で働く多くの受容体と共通する構造を持ち、7 回膜貫通ヘリックス受容体 (7 TM受容体) ファミリーを形成している。

各錐体の光受容体は色覚色素とも呼ばれ、7 本のヘリックス束の内部にレチナール発色団を有している。レチナールそれ自身は 380 nm に吸収極大を持つが、色覚色素の蛋白部分 (オプシン) と相互作用し、各色素は各々 426、530、560 nm へと吸収極大波長を深色移動している。レチナールが、光を吸収すると cis→trans の異性を始めとする一連の構造変化 (色の変化等で追跡可) を起こし情報伝達分子の G 蛋白へと光受容情報を伝え、最終的には細胞膜の陽イオンチャネルを閉じ膜電位を変化 (錐体を興奮) させ、それが視神経興奮となり脳へ伝えられる。

色覚色素と同様な構成成分から成るレチナール蛋白質は全く異なる生物である細菌にも見出されている。古細菌に分類される高度好塩菌が持つレチナール蛋白質にはバクテリオロドプシン(bR)、ハロロドプシン(hR)、センサーロドプシン(sR)、フォボロドプシン(pR)の4種が知られている。bR は光駆動

の H⁺ポンプ、hR は光駆動の Cl⁻ポンプである。sR と pR は走光性の光受容体である。これらの細菌型ロドプシンは約 250 個のアミノ酸とレチナールから成り、色覚色素に比べ、アミノ酸数では約百少なく分子量も小さくコンパクトで、安定性も高く、ものによっては乾燥状態で 10 年以上安定であるなどの利点もある。中でも bR の安定性は高く、光学素子として応用もされている。イオンポンプである bR と hR は 3 量体形成能を有し、特に bR は細胞膜上で 3 量体を基本単位とする 2 次元結晶を形成している。その 2 次元結晶を用いて立体構造が解かれ、それは膜蛋白質として世界で最初に解かれた例となった。

2. 研究の目的

bR の 3 量体の電子密度図を眺めていた時に着想を得たのだが、赤を吸収するもの、緑を吸収するもの、青を吸収するものの 3 つからなる 3 量体作成ができれば、ひとつの 3 量

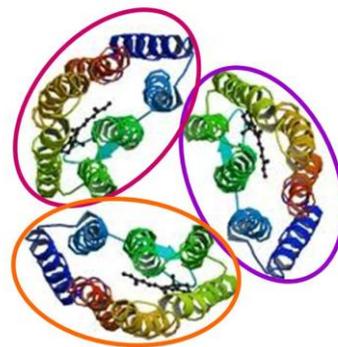


図 RGB 3 量体のイメージ図。楕円で囲まれたのが bR 1 分子

体がひとつの RGB 画素のようになり、それは極小の 3 原色 RGB ユニット (直径約 6.2

nm 高さ約 4.5 nm の円柱状の構造)ということになる。そのような超分子構造体の作成報告は今までにはない。さらにイオンポンプであることを応用すれば、単に RGB の色識別素子というだけでなく、電位変化誘起の興奮性を有する極小素子にもなれる可能性も有している。このような極小 RGB 3 量体作成を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

上図に示したように bR を始めとするレチナール蛋白質はオプシン (各色のリボンで示された部分) とレチナール (各色リボンの中の棒状モデルで示された部分) とから成る。色素蛋白質改変にあたっては、蛋白部分の改変と補欠分子の改変という 2 つのアプローチを取ることにより多様な改変が可能となる。

蛋白部分を変えるにはアミノ酸を置換する方法がある。高度好塩菌のレチナール蛋白質の発現系は大きく 2 つのものが知られている。好塩菌それ自身で行うものと大腸菌を用いるものである。大腸菌の発現系は置換体作成が容易、発現に関する知見も多く、置換体合成に要する時間が短いという長所がある。本研究では主に大腸菌の発現系を導入し、研究を進めた。1990 年以降 MIT のコラーナ研やマックスプランクの Oesterhelt 研や UCI の Lanyi 研で行われた bR のアミノ酸の置換体の研究により色に大きく影響を与えるのはレチナールがオプシンと結合している 216 番の Lys の近傍を含むレチナールを包み込んでいる領域 (レチナールポケット) に存在するアミノ酸残基であることが知られているので、それらも参考にアミノ酸置換体を作成した。

補欠分子であるレチナールの改変はレチナールの共役系の長さが異なる類似体合成

を試みた。その類似体を bR の蛋白部分であるバクテリオオプシンに加えることによりホロ色素蛋白質作製も試みた。

色の変化は通常の分光光度計で測定し、光励起時に起こる構造変化 (フォトサイクル) については時間分解の可視光の分光光度計で調べた。

3 量体を形成すると CD (円偏光 2 色性) スペクトルに特徴的な吸収を持つようになることから、3 量体形成能を測定することができる。この方法で改変蛋白質の中で一定水準以上の安定性を有するものの 3 量体形成能についても調べた。

色の変異体はイオンポンプ能にも影響を与える可能性が高いのでイオンポンプ活性も測定し電位変化を起こすかどうかについても調べることは重要であり、測定系構築を始めた。

4. 研究成果

bR をヒドロキシルアミン処理することによりレチナールを外し (ブリーチ)、蛋白部分であるバクテリオオプシン (bop) を得ることができる。そうして得た bop にレチナールを添加することで bR を再構成できる。そのブリーチ過程で、条件をコントロールすることにより、3 量体は均一ではなく不均一であることを見いだした。このことはヘテロな分子の 3 量体形成に関しての基礎的なデータとなる。

大腸菌発現系によりメチオニン残基を置換したものの内の一つが約 80 nm 短波長シフトすることが解り、そのもの自身は橙色となった。現在その置換体の性質を詳細に調べている途中であり、それがまとまると論文として発表できると考えている。他の置換体の作製も行っている。

さらにオプションと再構成可能なレチナールの類似体ができただ可能性を示すデータも得ているのでさらに研究を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富岡 寛顕 (TOMIOKA HIROAKI)

埼玉大学・教育学部・教授

研究者番号：50212072