

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657100

研究課題名(和文)色を知り、色を作る：ロドプシタンパク質群の挑戦

研究課題名(英文) Investigation of color tuning mechanism in rhodopsins and production of multi-colored pigments

研究代表者

須藤 雄気 (Sudo, Yuki)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10452202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、実験及び理論の両面から、光受容レチナルタンパク質の発色機構を探り、得られた知見を基盤に、様々な色を呈する分子を創成することを目的とした。主な成果は以下の通りである。(1) 発色機構の実験的解明(4報)、(2) 発色機構の理論的解明(2報)、(3) 様々な色を呈する分子の創成(2報)。このように実験と理論の融合により、色素タンパク質の新しい発色機構の解明とそれをもとにした分子創成は、様々な分野の研究者にとって有用な情報を提供するだろう。

研究成果の概要(英文)：Rhodopsins are known to show a large variation in their colors depending on the interaction between the apoprotein (opsin) and the retinal chromophore. In this project, we have investigated the color tuning mechanism in the rhodopsins and have also produced molecules showing a variety of colors such as blue, orange, red and purple, without loss of biological function. Thus the combination of experimental and theoretical studies could provide a useful research tool in a number of scientific fields.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：色 タンパク質 光 実験と理論の融合

### 1. 研究開始当初の背景

光受容タンパク質にとって、色制御機構の理解は極めて重要である。GFP (緑色蛍光タンパク質) や色変異体 (YFP, BFP) は、様々な分野で広く用いられている。また、“ロドプシントタンパク質群”を神経活動制御に利用することが最近可能となり、神経科学者の必須ツールとなりつつある[Zhang, F., et al. (2007) Nat. Rev. Neurosci.]。一方で、光受容タンパク質の吸収 (発光・蛍光) 特性を変化させる方法論が確立されているとは言い難く、ランダム変異や発色団近傍の変異により、半ば偶発的に得られる産物を利用しているのが現状であった。

### 2. 研究の目的

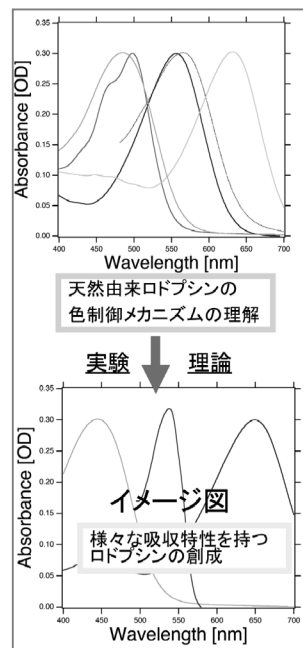
本研究目的は、自然界で最も幅広い吸収帯を示す光受容タンパク質の一つである、“ロドプシントタンパク質群”の「色を知り」「色を作る」ことである。代表者がこれまで蓄積してきた、幅広い吸収極大を持つ数十種類のロドプシンを実験的に解剖し、分担者が理論的に予見し解釈を与える。両分野のトップランナー同士の密接な協力により、ロドプシンの色特性 (吸収極大、吸収幅など) の限界に挑戦する。得られた成果は、他の光受容タンパク質の理解にも生かし、偶発的なアプローチに頼らない色タンパク質の創成へと繋げていくことを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、蓄積してきた様々なロドプシントタンパク質の“色を知り”“色を作る”事を実験/理論両面から検証した (挿入図参照)。

(1)実験的には、代表者がこれまでに見出してきた吸収特性が特徴的なロドプシン類(MR, SRI, AR3など)を鋳型に、分子生物学的・生化学的手法により、アミノ酸置換体 (変異体) を作成・精製した。積分球、高速液体カラムクロマトグラフィー (HPLC)、時間分解過渡吸収変化測定などを利用した精密解析により実験的に発色機構を解明した。

(2)理論的には、主に量子化学計算により、構造既知タンパク質の色制御候補部位を炙り出し、原子レベルでの発色メカニズムを解析した。さらには、構造未知タンパク質の発色性について構造モデルを構築し、理論面か



ら解釈した。

(1)と(2)で得られた実験・理論情報を相互にフィードバックし、再度実験と理論計算を行い、最適化と拡張を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 試料調製法の確立

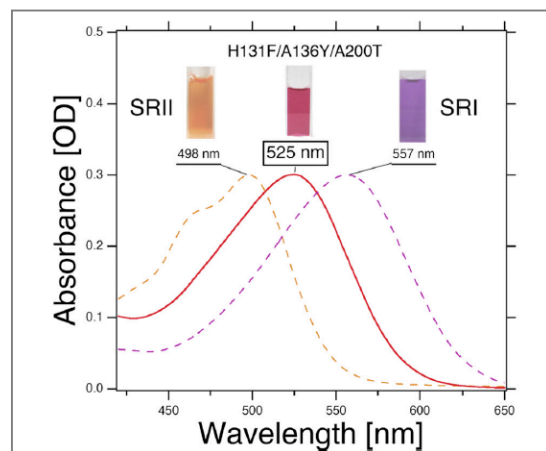
レチナルタンパク質分子をはじめとした膜貫通型タンパク質分子は、一般に不安定で発現量も少なく、そのため研究が難しい。ここでは、可溶性タグと無細胞タンパク質発現系を用いた試験管内合成法を確立した (Sudo et al., 2011, Biophysics)。また、コドン最適化した遺伝子合成による発現系の確立 (Sudo et al., 2011a, J. Biol. Chem.) (Tsukamoto et al., 2013, J. Biol. Chem.)も行った。

#### (2) 発色メカニズムの解明

発色メカニズムを理解するため、赤外分光法を用いた分子構造の解析 (Irieda et al., 2011, Biochemistry) (Furutani et al., 2013, J. Phys. Chem. B)、時間分解過渡吸収変化を指標とした分子構造とその変化の解析 (Inoue et al., 2012, J. Phys. Chem. B) (Sudo et al., 2014, J. Phys. Chem. B)、可視吸収 (色) へのハライドイオンの役割の発見 (Reissig et al., 2012, Biochemistry)、固体 NMR 分光法を用いた平衡状態での発色団レチナルの分子構造解析 (Yomoda et al., 2014, Angew. Chem. Int. Ed.) などを行った。これらの解析により、様々なロドプシン類の構造と色制御メカニズムについての知見を深めた。

実際に、アミノ酸置換により、緑色光を吸収する SRI 分子を青色光吸収型へ、青色光を吸収する SRII 分子を緑色光吸収型へ変換させることに成功した (Sudo et al., 2011b, J. Biol. Chem.) (下図参照)。

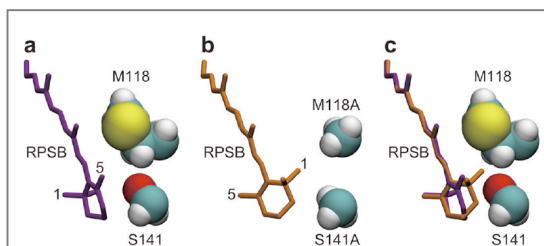
このように、論文成果が示す通り、実験的に分子の形と色の関係に深くメスを入れることが出来たと考えられる。



#### (3) 理論計算

実験的に実証した波長変化を、量子化学計算で説明した。具体的には、発色団レチナルの  $\beta$  イオン環の回転角が、色と密接に関係することを明らかにし、その分子実体は発色

団とタンパク質部分との立体障害に起因するものと結論づけた (Sudo et al., 2013, *J. Biol. Chem.*) (下図参照)。



#### (4) 実験と理論の融合

得られた波長変換機構が他のロドプシンにも適用可能であることを、MR と名付けた分子 (Sudo et al., 2011a, *J. Biol. Chem.*) を用いて、実験的に証明した (Mori et al., 2013, *Chem. Phys.*)。さらに、理論計算で得られた結果から、ある特定のグリシン残基の置換により更なる波長シフトが期待できることが示唆され、その置換を導入した分子を3つ用いたところ、その全てにおいて期待通りの大きな (~100nm) 波長シフトが実験的に実証された (Sudo et al., in preparation)。

#### (5) 生体操作ツールの創成

得られた青色光吸収型分子を動物・線虫に遺伝子導入し、青色光により効率的に線虫個体の行動を止めることが出来ることを示した (Sudo et al., 2013, *J. Biol. Chem.*)。このように、単に分子の波長変換にとどまらず、広く生命機能を光で制御出来るツールとしての応用例も示すことができた。

#### 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 14 件)

- ① Yomoda, H., Makino, Y., Tomonaga, Y., Hidaka, T., \*Kawamura, I., Okitsu, T., Wada, A., \*Sudo, Y., & \*Naito, A.  
“Color discriminating retinal configurations of sensory rhodopsin I by photo-irradiation solid state NMR spectroscopy”  
(2014) *Angew. Chem. Int. Ed.* In press.
- ② \*Sudo, Y., Mizuno, M., Wei, Z., Takeuchi, S., \*Tahara, T., & \*Mizutani, Y.  
“The early steps in the photocycle of a photosensor protein sensory rhodopsin I from *Salinibacter ruber*”  
(2014) *J. Phys. Chem. B* 118, 1510-1518.
- ③ Tsukamoto, T., Inoue, K., Kandori, H., & \*Sudo, Y.  
“Thermal and spectroscopic characterization of a proton pumping rhodopsin from an extreme thermophile”  
(2013) *J. Biol. Chem.* 288, 21581-21592. [Faculty of 1000 Biology “Recommended”]
- ④ \*Sudo, Y., Okazaki, A., Ono, H., Yagasaki, J., Sugo, S., Kamiya, M., Reissig, L., Inoue, K., Ihara, K., Kandori, H., Takagi, S., & Hayashi, S.  
“A blue-shifted light-driven proton pump for neural silencing”  
(2013) *J. Biol. Chem.* 288, 20624-20632.
- ⑤ Mori, A., Yagasaki, J., Homma, M., Reissig, L., & \*Sudo, Y.  
“Investigation of the chromophore binding cavity in the 11-*cis* acceptable microbial rhodopsin MR”  
(2013) *Chem. Phys.* 419, 23-29.
- ⑥ \*Furutani, Y., Okitsu, T., Reissig, L., Mizuno, M., Homma, M., Wada, A., Mizutani, Y., & \*Sudo, Y.  
“Large spectral change due to amide modes of a  $\beta$ -sheet upon the formation of an early photointermediate of middle rhodopsin”  
(2013) *J. Phys. Chem. B* 117, 3449-3458.
- ⑦ Reissig, L., Iwata, T., Kikukawa, T., Demura, M., Kamo, N., Kandori, H., & \*Sudo, Y.  
“The influence of halide binding on the hydrogen bonding network in the active site of *Salinibacter* sensory rhodopsin I”  
(2012) *Biochemistry* 51, 8802-8813.
- ⑧ Irieda, H., Morita, T., Maki, K., Homma, M., Aiba, H., & \*Sudo, Y.  
“Photo-induced regulation of the chromatic adaptive gene expression by *Anabaena* sensory rhodopsin”  
(2012) *J. Biol. Chem.* 287, 32485-32493.
- ⑨ Inoue, K., Reissig, L., Sakai, M., Kobayashi, S., Homma, M., Fujii, M., Kandori, H., & \*Sudo, Y.  
“Absorption spectra and photochemical reactions in a unique photoactive protein, middle rhodopsin MR”  
(2012) *J. Phys. Chem. B* 116, 5888-5899.
- ⑩ Kato HE, Zhang F, Yizhar O, Ramakrishnan C, Nishizawa T, Hirata K, Ito J, Aita Y, Tsukazaki T, Hayashi S, Hegemann P, Maturana AD, Ishitani R, Deisseroth K, \*Nureki O.  
“Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel”  
(2012) *Nature* 482, 369-374.
- ⑪ \*Sudo, Y., Yuasa, Y., Shibata, J., Suzuki, D., & Homma, M.  
“Spectral tuning in sensory rhodopsin I from *Salinibacter ruber*”  
(2011) *J. Biol. Chem.* 286, 11328-11336.
- ⑫ \*Sudo, Y., Ihara, K., Kobayashi, S., Suzuki, D., Irieda, H., Kikukawa, T., Kandori, H., & Homma, M.  
“A microbial rhodopsin with a unique retinal composition shows both sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin-like properties”  
(2011) *J. Biol. Chem.* 286, 5967-5976.
- ⑬ Irieda, H., Reissig, L., Kawanabe, A., Homma,

M., Kandori, H., & \*Sudo, Y.  
“Structural characteristics around the b-Ionone ring of the retinal chromophore in *Salinibacter* sensory rhodopsin I”  
(2011) *Biochemistry* 50, 4912-4922.

- ⑭ \*Sudo, Y., Tanaka, R., Kobayashi, T., Kamo, N., Kohno, T., & Kojima, C.  
“Functional expression of a two-transmembrane HtrII protein using cell-free synthesis”  
(2011) *Biophysics* 7, 51-58.

[学会発表] (計 7 件)

- ① Sudo, Y.  
“Photobiophysical chemistry: What should we learn from retinal proteins?”  
(2014) iCeMS symposium on Mesoscopic Chemical Biology: Integrated Chemical-Physical Systems Towards Cell Control, Feb 2, Kyoto, Japan.
- ② 須藤雄気  
“光操作技術の基盤となるロドプシン分子の多様性と可能性”  
(2012) 第 7 回・NIBB バイオイメーキングフォーラム, 基礎生物学研究所, 11, 26.
- ③ 須藤雄気  
“分子からのボトムアップ研究で拓く光細胞・個体操作”  
(2012) 「細胞を創る」研究会 5.0, 東京工業大学, 11, 21.
- ④ Sudo, Y.  
“Functional diversity of sensory rhodopsins from microbes”  
(2012) 15<sup>th</sup> International Conference on Retinal Proteins, Sept 30, Ascona, Switzerland.
- ⑤ 須藤雄気  
“「Simple is the first?」: 微生物由来レチナル蛋白質の分子進化と多様性”  
(2012) 第 14 回日本進化学会年会 (シンポジウム), 八王子, 8, 21.
- ⑥ 須藤雄気  
“色付きタンパク質の生物学的・化学的・物理学的研究の“面白さ”と“奥深さ””  
(2012) 第 1 回超異分野学会, 東京, 3, 17.
- ⑦ Sudo, Y. & Homma, M.  
“Molecular and evolutionary aspects of microbial sensory rhodopsin”  
(2011) 5<sup>th</sup> Asia and Oceania Conference for Photobiology (AOCP), Sept 31, Nara, Japan.

[図書] (計 5 件)

- ① Inoue, K., Tsukamoto, T., & \*Sudo, Y.  
“Molecular and evolutionary aspects of microbial sensory rhodopsins”  
(2014) *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 562-577.
- ② 須藤雄気  
“ロドプシンの波長制御と光情報変換機構”  
(2013) オプトジェネティクス～光工学と遺伝学による行動制御技術の最前線～, 第 2 章 4 節, pp.79-91.
- ③ \*Sudo, Y.

“Transport and sensory rhodopsins in microorganisms”  
(2012) *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, the 3<sup>rd</sup> edition, CRC Press, Boca Raton, pp. 1173-1193.

- ④ 須藤雄気、本間道夫  
“光受容タンパク質による微生物の光センシングの理解とその利用”  
(2012) *薬学雑誌* 132, 407-416.
- ⑤ 須藤雄気、井原邦夫、本間道夫、加茂直樹  
“高度好塩性微生物の“目”: センサリーロドプシンへの Cl<sup>-</sup>イオン結合の役割”  
(2011) *極限環境微生物学会誌* 10, 23-29.

[産業財産権]  
なし

[その他]  
ホームページ等  
[http://scholar.google.com/citations?hl=en&user=TJ6GZQsAAAAJ&view\\_op=list\\_works](http://scholar.google.com/citations?hl=en&user=TJ6GZQsAAAAJ&view_op=list_works)

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
須藤 雄気 (SUDO YUKI)  
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号: 10452202
- (2) 研究分担者  
林 重彦 (HAYASHI SHIGEHICO)  
京都大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 70402758
- (3) 連携研究者  
なし