

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370043

研究課題名(和文) 無脊椎動物の視覚情報変換・伝達の構造基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanisms in a visual transduction system of invertebrate rhodopsin

研究代表者

村上 緑 (Murakami, Midori)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20324387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：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した。この結晶を暗条件下で昇温すると、バソ中間体が170Kでルミ中間体へ、240KでLM中間体へと完全に遷移した。その際、暗順応状態、イソロドプシンの形成率に変化はなかった。この結晶を用いてSPring-8にて回折データセットを収集しロドプシンとの差電子密度マップを計算し構造解析を進めている。

メタ状態の試料を用いて新たに結晶化を行い、100%アシッドメタ状態が形成される条件下で結晶を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Blue light illumination at 100 K induced a red-shift of the absorption maximum, indicating that an equilibrium state of three isomeric states, Rhodopsin, Batho and 9-cis isorhodopsin was established. When this crystal was warmed to 240K, the absorption maximum was blue-shifted. Accurate estimation of isomer composition under this condition suggested that Batho was converted to LM with no change in the contents of the other states. We collected diffraction data set and calculate the difference electron density maps. It indicates that the conformational changes are located at the vicinity of the active site upon formation the LM intermediate. The larger movements of helices that characterize meta formation are not initiated at the early stage of photocycle in squid rhodopsin, but occur during the transition from LM to Meta. We try to crystallize the Acid Meta state of squid rhodopsin and succeed to obtain some new crystals which can diffract up to high resolution.

研究分野：生物物理

キーワード：ロドプシン 光情報変換 結晶構造解析

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 α 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。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、光活性化型はさらに光子を吸収し基底状態へと戻るといった特徴をもつ。これは活性化過程を追跡する上で大変有利であるにもかかわらず、大量培養系が確立されていないこともあり無脊椎動物ロドプシンを用いた構造機能関連研究はあまり進展していなかった。

申請者らはイカロドプシンを非脊椎動物型ロドプシン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結晶構造解析に取り組んできた。これまでに、暗順応状態、光反応初期に現れるバソ中間体、ルミ中間体とイソロドプシンの構造をそれぞれ分解能2.5Å、2.8Å、2.8Å、2.7Åで求めた。これらの構造の比較から、1)イカロドプシンは膜貫通ヘリックス束の中に活動部位からG蛋白質共役部位である細胞質側表面まで及ぶ大きなキャビティをもち、その中で8個の水分子が水素結合ネットワークを形成していること、2)光励起直後にレチナールのポリエン鎖が細胞質側に大きく移動しながら約90度捻じれ、光エネルギーがレチナールの歪みエネルギーとして蓄えられること、3)ポリエン鎖の大きな捻じれによって、レチナールとシッフ塩基結合したリジン残基が大きく変形してヘリックス構造の歪みが起こること、などを明らかにし、光吸収によってレチナールに蓄えられた光エネルギーが近傍のアミノ酸残基へと伝わる様子がイカロドプシンとウシロドプシンでは大きく異なっていることを示した。この違いはレチナールを取り囲むアミノ酸残基の違いを反映していると考えられ(イカロドプシンとウシロドプシンの一次配列の一致度は約30%)、その後の反応過程においてもイカロドプシンはウシロドプシンで考えられている活性化機構とは異なっているとも考えられ、これまでウシロドプシンをモデルとして描かれてきたロドプシン活性化の描像が描き改められるとも考えられた。

2. 研究の目的

本研究はイカロドプシンの光反応過程後期中間体の構造解析を行い、GPCR活性化機構の普遍的構造基盤、無脊椎動物ロドプシンや一般GPCRの機能多様性を保証する構造要因を明らかにすることを目指した。具体的には、ルミ中間体がさらに熱緩和したLM中間体および光産物であるメタ状態の結晶構造解析を行うことを目標とした。

3. 研究の方法

イカロドプシン暗順応状態のP62結晶を用いて光照射や温度など物理パラメータを変化させLM中間体を捕捉し、顕微分光測定により中間体形成を確認した。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て構造解析を行った。中間体の捕捉が不可能な場合は新たな空間群の新規結晶の結晶化を行った。

4. 研究成果

LM中間体の構造解析

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つの異性体がそれぞれ5%、50%、45%の組成で光平衡状態を形成した。この結晶を暗条件下で昇温すると、バソ中間体が170Kでルミ中間体へ、240KでLM中間体へと完全に遷移した(図1)。その際、暗順応状態、イソロドプシンの組成率に変化はなかった。この結晶を用いてSPring-8にて回折データセットを収集しロドプシンとの差電子密度マップを計算した(図2)。現在高分解能構造決定に向けて解析を進めている。

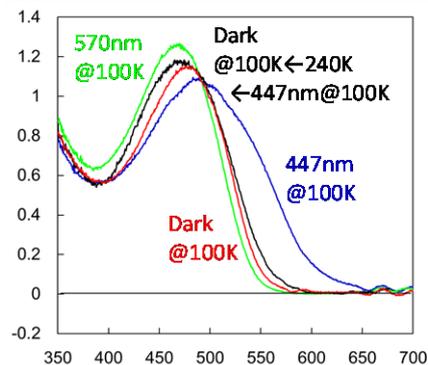


図1. 昇温による吸収スペクトルの変化

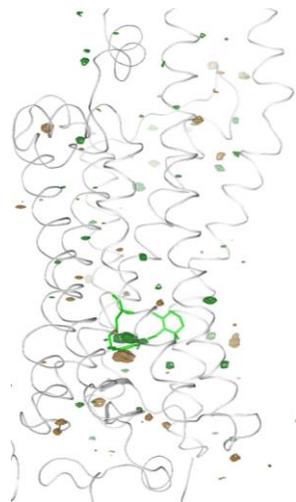


図2. LM中間体形成にともなう差電子密度マップ

昇温によるオプシン・メタ状態の捕捉

空間群 P62 の暗順応結晶を 288K に保管すると数か月で赤橙色から無色へと変換され、オプシン状態に遷移したことが示唆された。この結晶を 277K で全トランス型レチナールを含む中性溶液に浸潤させるとおよそ2日で結晶が赤橙色へと変化した。結晶を浸潤させる溶液を交換し pH5-11 の範囲で変化させ3時間程度保管すると結晶の色が変化した。顕微分光測定を行いスペクトルを観測した結果、pH 6 以上で吸収ピークが下がりはじめ短波長側へとシフトした。このことから、オプシンに全トランス型レチナールが結合しメタ状態が再構成されたことが示唆された。メタ状態は pH 依存的なアシッドメタ状態 ⇄ アルカリメタ状態の平衡状態にあることが知られているので、酸性から中性の pH 領域で形成されたアシッドメタ状態がアルカリメタ状態へと遷移したと考えられた。しかしながら、溶液系では pH11 においてもアルカリメタ状態の形成率が 100%に及ぶのに対し、P62 結晶中ではアシッドメタ状態が残っていることを考えると P62 結晶の結晶格子を形成する分子間接触がメタ状態形成を妨げていると考えられた。

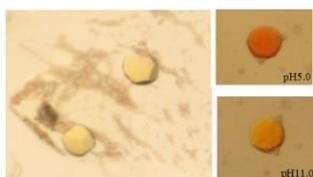


図 3. オプシン、メタ状態の結晶

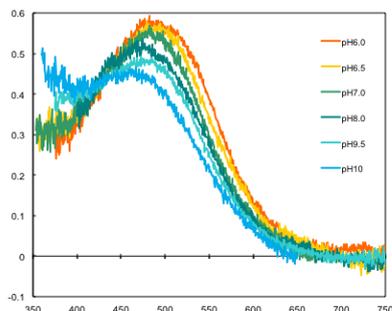


図 4. メタ状態結晶の pH 依存的吸収スペクトル変化

アシッドメタ状態の結晶化

上記昇温によって形成されたメタ・オプシン状態の結晶は回折能が著しく低下しており、構造解析には不向きであったため、メタ状態の試料を用いて新たに結晶化を行った。暗順応状態のロドプシン試料をアルカリ条件下で青色光で照射すると吸収極大波長が 380nm のアルカリメタ状態が形成された。pH をアルカリに変化させるとピークは長波長側へとシフトし吸収極大波長が 480nm のアシッドメタ状態が形成された (図 5)。この試

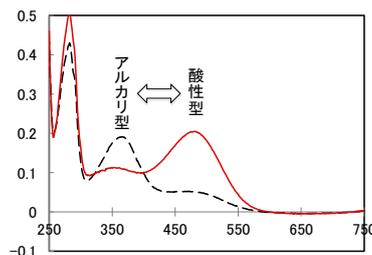


図 5. メタ状態の pH 平衡状態

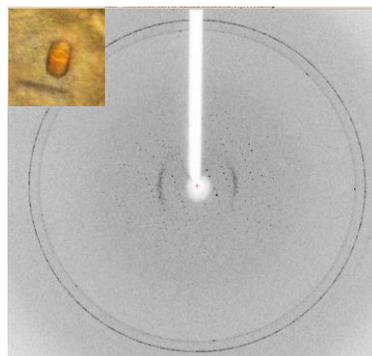


図 6. アシッドメタ結晶と回折像

料を用いて結晶化を行い、100%アシッドメタ状態が形成される条件下で結晶を得ることができた。SPring-8 での回折実験では最大到達分解能が 3Å 程度におよぶので、現在高分解能構造解析を目指して結晶化条件の精密化を行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. E Kanamori E, Kawaguchi S, Kuramitsu S, Kouyama T, Murakami M, Structural comparison between the open and closed forms of citrate synthase from *Thermus thermophilus* HB8, *Biophys. Physicobiol.*, 12, 47-56 (2015), 査読有
2. Murakami M, Kouyama T, Crystallographic Study of the LUMI Intermediate of Squid Rhodopsin, *PLoS one*, 10, e0126970 (2015), 査読有
3. Kouyama T, Kawaguchi H, Nakanishi T, Kubo H, Murakami M, Crystal structures of the L1, L2, N, and O states of pharaonis halorhodopsin, *Biophys. J.* 108, 2680-2690 (2015), 査読有
4. 神山勉, 膜タンパク質の立体構造解析の現状, *パリティ* 30, 62-64 (2015), 査読無
5. Chan SK, Kitajima-Ihara T, Fujii R, Gotoh T, Murakami M, Ihara K, Kouyama T, Crystal structure of cruxrhodopsin-3 from *Haloarcula vallismortis*, *PLoS One* 9, e108362 (2014), 査読有
6. Kouyama T, Fujii R, Kanada S, Nakanishi

- T, Chan SK, Murakami M, Structure of archaerhodopsin-2 at 1.8 Å resolution, *Acta Crystallogr. D* 70, 2692-2701 (2014), 査読有
7. Zhang J, Mizuno K, Murata Y, Koide H, Murakami M, Ihara K, Kouyama T, Crystal structure of deltarhodopsin-3 from *Haloterrigena thermotolerans*, *Proteins* 81, 1585-1592(2013), 査読有
- [学会発表] (計 27 件)
1. Murakami M, Kouyama T, "Structural changes of squid rhodopsin during the thermal relaxation process in the P62 crystal", *Pacificchem 2015*, Honolulu, December 15-20, 2015
 2. Kouyama T, "Crystal structures of the N, X, and O states occurring in late steps of the ion pumping cycle of pharaonis halorhodopsin", *Pacificchem 2015*, Honolulu, December 15-20, 2015
 3. 村上 緑, 神山 勉, "Crystallographic study of the LM intermediate of squid rhodopsin", 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢, 2015 年 9 月 13-15 日
 4. 神山 勉, "プロトン輸送性ロドプシンにおける低障壁水素結合の役割", 日本物理学会第 70 回年次大会, 東京, 2015 年 3 月 21-24 日
 5. 村上 緑, 神山 勉, "イカロドプシンの光異性化—熱的緩和反応の結晶構造解析", 日本物理学会第 70 回年次大会, 東京, 2015 年 3 月 21-24 日
 6. S. K. Chan, T. Kitajima, M. Murakami, K. Ihara, T. Kouyama, "Higher order structure of cruxrhodopsin from *Haloarcula vallismortis* and its photostability", 生物物理学会中部支部会, 岡崎, 2015 年 3 月 10 日
 7. 村上 緑, 神山 勉, "イカロドプシンの p62 結晶における光異性化から熱緩和までの構造変化", 生物物理学会中部支部会, 岡崎, 2015 年 3 月 10 日
 8. T. Kouyama, "Conformational changes in helices C and F of pharaonis halorhodopsin during the ion pumping cycle", 16th International Conference on Retinal Proteins, Nagahama, October 5 - 9, 2014
 9. S. Uyama, T. Kitajima-Ihara, M. Murakami, K. Ihara, T. Kouyama, "A chimeric proton-pumping rhodopsin designed for crystallographic analysis of light-induced structural changes", 16th International Conference on Retinal Proteins, Nagahama, October 5 - 9, 2014
 10. H. Kawaguchi, T. Nakanishi, M. Murakami, T. Kouyama, "Crystallographic study on the N state of pharaonis halorhodopsin", 16th International Conference on Retinal Proteins, Nagahama, October 5 - 9, 2014
 11. S. K. Chan, T. Kitajima-Ihara, M. Murakami, K. Ihara, T. Kouyama, "Crystal structure of cruxrhodopsin-3 from *Haloarcula vallismortis*", 16th International Conference on Retinal Proteins, Nagahama, October 5 - 9, 2014
 12. M. Murakami, T. Kouyama, "New crystal forms of squid rhodopsin", 日本生物物理学会第 52 回年会, 札幌, 2014 年 9 月 25-27 日
 13. M. Murakami, T. Kouyama, "バクテリオロドプシン-ハロロドプシン-キメラ蛋白質の光反応サイクル", 日本生物物理学会第 52 回年会, 札幌, 2014 年 9 月 25-27 日
 14. N. Kuga, T. Gotoh, T. Kouyama, "凍結割断低温原子間力顕微鏡の製作", 日本生物物理学会第 52 回年会, 札幌, 2014 年 9 月 25-27 日
 15. S. K. Chan, T. Kitajima, M. Murakami, K. Ihara, T. Kouyama, "クラックスロドプシンの 3 量体構造と光安定性", 日本生物物理学会第 52 回年会, 札幌, 2014 年 9 月 25-27 日
 16. 川口春樹, 中西太市, 久保宏樹, 井原邦夫, 村上 緑, 神山 勉, "ファラオニス・ハロロドプシンの N 中間体の結晶構造解析", 日本生物物理学会第 52 回年会, 札幌, 2014 年 9 月 25-27 日
 17. 村上 緑, 神山 勉, "発色団を導入したイカロドプシン結晶の吸光特性", 日本物理学会第 69 回年次大会, 平塚, 2014 年 3 月 27-30 日
 18. Haruki Kawaguchi, Taichi Nakanishi, Hiroki Kubo, Kunio Ihara, Midori Murakami, Tsutomu Kouyama, "X-ray structural analysis of the N photoreaction intermediate of halorhodopsin in complex with bromide ions", The IGER International Symposium on Science of Molecular Assembly and Biomolecular Systems 2014, Nagoya, March 12-13, 2014
 19. Shinji UYAMA, Katsuhide MIZUNO, Youko NAKAMURA, Toshiaki GOTO, Midori MURAKAMI, Tsutomu KOUYAMA,
 20. "Investigation of a pre-crystallization solution of octopus rhodopsin by cryo-electron microscopy", The IGER International Symposium on Science of Molecular Assembly and Biomolecular Systems 2014, Nagoya, March 12-13, 2014
 21. Naoto KUGA, Toshiaki GOTO, Tsutomu KOUYAMA, "Observation of bacteriorhodopsin crystal structure by freeze fracture atomic force

- microscopy”, The IGER International Symposium on Science of Molecular Assembly and Biomolecular Systems 2014, Nagoya, March 12-13, 2014
22. 川口春樹, 中西太市, 久保宏樹, 井原邦夫, 村上緑, 神山勉, “ハロロドプシンの光反応サイクルにおける陰イオンの移動”, 生物物理学会中部支部会, 岡崎, 2014年3月6日
 23. 川口春樹, 中西太市, 久保宏樹, 井原邦夫, 村上緑, 神山勉, “ハロロドプシン-臭素イオン複合体のN光反応中間体のX線結晶構造解析”, 日本生物物理学会第51回年会, 京都, 2013年10月28-30日
 24. 村上緑, 神山勉, “Trapping the photoactive form of squid rhodopsin in the P62 crystal”, 日本生物物理学会第51回年会, 京都, 2013年10月28-30日
 25. 久我直登, 五藤俊明, 神山勉, “フリーズフラクチャー原子間力顕微鏡によるバクテリオロドプシンの3次元結晶の観察”, 日本生物物理学会第51回年会, 京都, 2013年10月28-30日
 26. S. K. Chan, T. Kitajima, M. Murakami, K. Ihara, T. Kouyama, “Crystal structure of cruxrhodopsin-3 from *Haloarcula vallismortis*”, 日本生物物理学会第51回年会, 京都, 2013年10月28-30日
 27. 神山勉, “ロドプシン群蛋白質の光誘起構造変化に関するX線結晶解析”, 日本生物物理学会第51回年会, 京都, 2013年10月28-30日

〔図書〕(計2件)

1. 村上緑, 多様化するロドプシンの構造と機能, その応用, 日本の結晶学 (II) -その輝かしい発展-, 日本結晶学会「日本の結晶学 (II)」出版編集委員会編, 日本結晶学会, pp. 336 (2014)
2. 井原邦夫, 神山勉, 光駆動性塩素イオン輸送タンパク質ハロロドプシンの構造, オプトジェネティクス (光遺伝学) -光工学と遺伝子による行動制御技術の最前線-, エヌ・ティー・エス (2013)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 緑 (Midori Murakami)

名古屋大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 20324387

(2) 研究分担者

神山 勉 (Tsutomu Kouyama)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 30170210