

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370059

研究課題名 (和文) 受容体蛋白質の伝達メカニズムの解明とその制御

研究課題名 (英文) Elucidation and regulation of signal-propagation mechanisms in receptor proteins

研究代表者

今元 泰 (IMAMOTO YASUSHI)

京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：80263200

研究成果の概要 (和文)：蛋白質は刺激や他の分子との相互作用によって構造が変化し、生理機能を発揮する。本研究では、バクテリアや動物網膜の光受容蛋白質が、光に応じて構造変化するために必要なアミノ酸残基を同定することによって、蛋白質の構造変化を誘導する分子内相互作用を明らかにした。また、光異性化によって長さが変化するリンカー分子を用いて蛋白質の構造を機械的に操作し、その反応を制御することに成功した。

研究成果の概要 (英文)：Proteins change their conformations in response to various kinds of stimuli. To reveal the intramolecular interaction that induces the protein conformational change, the amino acid residues which are responsible for the protein conformational changes of photoreceptor proteins in bacteria and animal retina were identified. Based on these findings, the protein conformation was mechanically controlled by a linker whose length is changed by photo-isomerization to regulate the activity of the protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	16,000,000	4,800,000	20,800,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：ロドプシン、PYP、構造変化、蛋白質、活性化、アゾベンゼン

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質は遺伝子情報に従って合成され、一定の構造に折り畳まれることで固有の機能を獲得する。また、物理的な刺激、基質やリガンドとの結合、他の蛋白質との相互作用などによって、その構造が変化し、生理機能を発揮する。このように、蛋白質の機能は構造と密接に関連しているため、蛋白質の構造やその動きを人工的に制御することができれば、蛋白質の活性を自由に制御できると期待される。

近年の蛋白質科学の進歩によって、蛋白質の静的な立体構造のみでなく、基質結合に伴

う構造変化やダイナミクスが明らかにされてきた。このような知見は、比較的分子量の小さな水溶性蛋白質だけでなく、膜蛋白質のように複雑で構造解析が困難な蛋白質にも拡張されつつある。

蛋白質は、アミノ酸残基の主鎖、あるいは側鎖間を結びつける分子内の相互作用によって一定の構造に折り畳まれている。そして刺激やリガンド結合によって、分子内相互作用が規則正しく組み替えられることで、その構造が一定の変化を起こし活性化される。そのため、このような相互作用の変化、すなわちアミノ酸残基間の距離や位置関係の変化を明

らかにし、そのような変化を人工的に誘導することができれば、蛋白質の活性を制御できると考えられた。そこで、光異性化で長さが変化するアゾベンゼンをリンカーとして蛋白質に組み込み、蛋白質の構造を制御することを試みた。(図1)

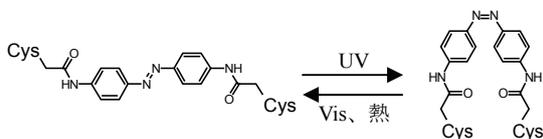


図1: アゾベンゼンの異性化を利用したシステイン残基間距離の制御。

## 2. 研究の目的

本研究では、刺激によって蛋白質の構造が変化する原理の解明すること、およびアゾベンゼンを用いて実際に蛋白質の構造を操作し、活性を制御することを目的とした。

### (1) 分子内相互作用の解明

動物網膜の光センサー蛋白質であるロドプシンや、光合成細菌の光センサー蛋白質である Photoactive yellow protein (PYP) は、刺激を受容する前の不活性状態だけでなく、刺激を受容した後の活性状態の高次構造も高分解能で報告されている。そのため、高次構造変化の原因となる分子内相互作用の解析には好適な試料である。そこで、相互作用を担うと考えられるアミノ酸残基を置換したロドプシン、あるいは PYP 変異体の光反応や活性を解析し、どのような相互作用が蛋白質の構造変化に必要なのかを明らかにすることを目指した。

### (2) 蛋白質構造の制御

蛋白質の構造と機能の相関を直接的に明らかにするためには、構造を人工的に操作し、その結果として生じる物性の変化を評価することが必要である。そこで、活性化にともない相互作用が変化すると考えられる部位に、光異性化によって長さが変化するアゾベンゼンをリンカーとして組み込んだ(図1)。アゾベンゼンの光異性化によって外的に構造変化を誘導することで、蛋白質の反応を変化させることを試みた。

## 3. 研究の方法

PYP 変異体は大腸菌で大量発現させ、*p*-クマル酸無水物で再構成した。ロドプシン、緑錐体視物質、およびその変異体は、HEK293S 細胞に発現させ、11 シス型レチナルで再構成した。アゾベンゼンリンカーは市販のジアミノアゾベンゼンの2つのアミノ基をヨードアセトアミド基に修飾して用いた。

試料の吸収スペクトルは、島津 UV2400PC 自記分光光度計を用いて測定した。光反応を追跡するための過渡吸収スペクトルは、浜松

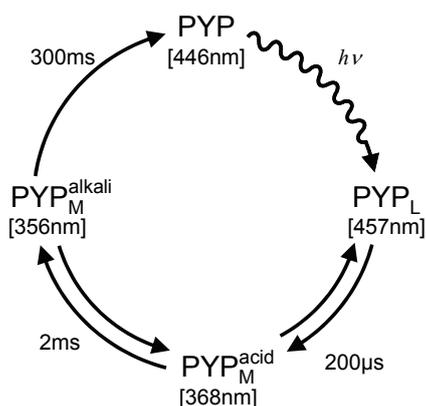


図2: PYP の光反応サイクル。

ホトニクス高速 CCD 分光光度計を用いて測定した。蛍光は、フォトンカウンティングチューブを用いた自作のシステムにより、100 ミリ秒の時間分解能で測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 分子内相互作用の解明

①PYP の光反応サイクルは、発色団の光の吸収によるトランス→シス異性化によって始まり、いくつかの熱反応を経た後に蛋白質部分が大きく変化した  $PYP_M^{alkali}$  が生成する(図2)。 $PYP_M^{alkali}$  は伝達蛋白質を活性化する中間体であると考えられている。 $PYP_M^{alkali}$  の発色団はシス→トランス異性化を起こし、もとの暗状態 (PYP) に戻るが、この熱異性化は、Met100 によって促進されることが知られている。そこで、Met100 を Ala に置換した変異体・M100A の光反応を、低温スペクトル法によって詳細に調べた。野生型 PYP を 80K で照射すると長波長産物が生成するが、M100A を照射すると短波長産物が生成し、長波長産物の生成はわずかであった。また、野生型 PYP では、低温で 66%グリセロールの存在下では  $PYP_M^{alkali}$  が生成しないが、M100A では生成し、その寿命は非常に長かった。スペクトル変化を詳しく比較したところ、これらの反応の違いは、生成物が異なるのではなく、生成物間の平衡が短波長産物に偏ることが原因であることがわかった。

PYP の立体構造から、Met100 は Phe96 および Arg52 と相互作用していることが示唆される。これらの相互作用に改変を加えることによって、光反応サイクルの速度を変化させる可能性があることが示された。

②ロドプシンをはじめとする GPCR は、刺激を吸収すると膜貫通ヘリックスの再配置が起こり、G 蛋白質と相互作用する活性構造を獲得すると考えられている。ロドプシンと緑錐体視物質は、構造がほとんど同じであるが G 蛋白質の活性化効率が互いに異なることが知られている。そこで両者のトランスデュースン活性化過程を速度論的に解析することで、

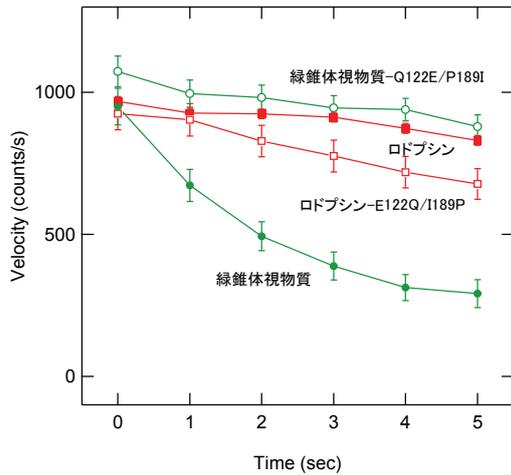


図3：ロドプシンと緑錐体視物質のトランスデューション活性化効率の時間変化。

活性構造に必要な分子内相互作用を明らかにすることを試みた (図3)。

ロドプシンと緑錐体視物質をそれぞれトランスデューシン (G 蛋白質) と混合し、フラッシュ光で光活性化した。その後、トランスデューシンの活性化にともなうトリプトファン蛍光強度の増加を測定し、時間ごとの活性化速度を求めた。

ロドプシンと緑錐体視物質では、G 蛋白質活性化の初速度は同じであり、同様の構造変化を起こしていると考えられた。しかし、緑錐体視物質の活性化速度は時間とともに低下したので、活性構造が急速に失われたものと考えられた。次に、活性構造を安定化する相互作用を明らかにするため、ロドプシンと錐体視物質で違ったアミノ酸残基が保存されている部位 (122 番目と 189 番目) のアミノ酸残基を入れ替えた変異体で同様の解析を行った。その結果、ロドプシンに E122Q/I189P 変異を導入すると活性構造の寿命が短くなり、緑錐体視物質に Q122E/P189I 変異を導入すると活性構造の寿命が長くなった。以上の結果から、Glu122 と Ile189 を含む相互作用が、活性構造を維持するために必要であると考えられた。

③ロドプシンの活性中間体の結晶構造によると、Glu122 は His211 と相互作用していることが示唆される。そこでこれらの残基の近傍にシステイン残基を導入し、その振動モードの変化から、これらの残基周辺の環境の変化を検討した。導入したシステインの SH 伸縮振動をフーリエ変換赤外分光光度計で測定したところ、活性中間体の前駆体で His211 近傍の相互作用が変化していることが示唆された。そのため、Glu122 と His211 の相互作用の変化が活性構造への構造変化に必要であると同時に、活性構造を安定化させていると考えられた。

④ロドプシンの構造を安定化させる分子内相

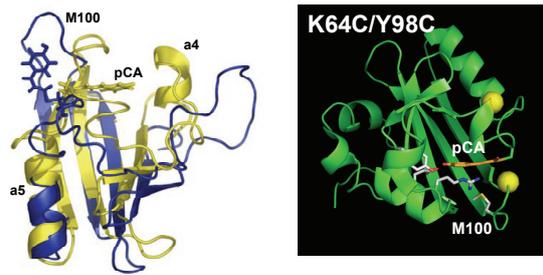


図4：左：NMRにより提唱されたPYPの光による構造変化。暗状態(黄)と比較して、PYP<sub>M</sub>(青)ではM100ループ付近の構造が大きく変化している。右：今回設計したPYP変異体。Lys64とTyr98をCysに置換し(黄色)、ここにアゾベンゼンリンカーを組み込んだ。

相互作用を明らかにするため、ロドプシンの膜外ループ領域でペプチド鎖を切断し、ペプチド断片から非共有結合のみでロドプシンを再構成することを試みた。細胞外第2ループ (ECL2) のC末端側で切断すると、効率よくロドプシンが再構成した。しかし、N末端側で切断すると、再構成効率は大幅に低下した。さらに、ECL2にLeu172とTrp175を含まないコンストラクトでは再構成が全く見られなかった。そのため、これらの残基を含む疎水的な相互作用がロドプシンの構造を安定化していると考えられた。

#### (2) 蛋白質構造の制御

蛋白質の構造変化を人工的に誘導して反応を制御するため、アゾベンゼンをリンカーとしてPYPに組み込んだ。4-(1)-①より、Met100を含む相互作用を変化させると光反応サイクルが変化することが示唆された。また、NMRによって提唱されたPYP<sub>M</sub>の構造では、Met100を含むループ領域が発色団から離れている(図4)。そのため、Met100と発色団の距離を変化させることによって、光反応サイクルを制御することができると考えられた。

PYPの発色団とMet100ループ付近のアミノ酸残基を調べると、Lys64とTyr98の側鎖は分子の外を向いており、特定の分子内相互作用には関与していないと考えられた。そこでLys64とTyr98をシステインに置換した変異PYP・K64C/Y98Cを調製し、導入したシステイン残基をアゾベンゼンリンカーで架橋した(図4)。

まず、アゾベンゼンリンカーを組み込んだK64C/Y98Cを暗におき、アゾベンゼンリンカーをトランス型にした。この試料を青色のフラッシュ光で励起し、その後の吸収スペクトル変化を測定した(図5)。その結果、PYPに由来する449nmの吸光度が励起直後に減少し、10~100秒の時定数で回復した。次に、試料を紫外線LEDで照射してアゾベンゼンリンカーをシス型にし、同様に青色のフラッシュ光で励起した後の吸収スペクトル変化を

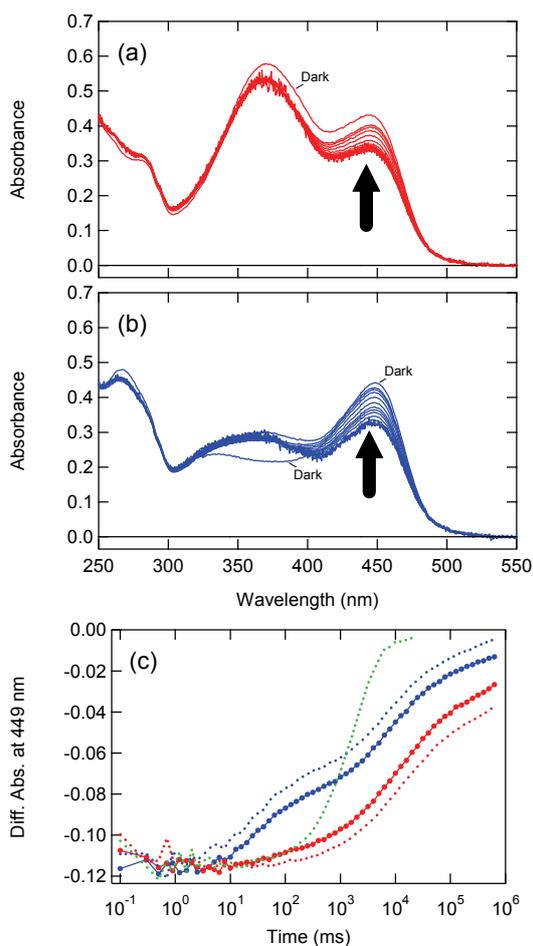


図 5: アゾベンゼンリンカーを組み込んだ K64C/Y98C の光反応サイクル。450nm 付近の吸収バンドは PYP、360nm 付近の吸収バンドはアゾベンゼンリンカーに由来する。(a) 暗中でアゾベンゼンリンカーをトランス型にした試料 (Dark) を青色のフラッシュ光で励起し、その後の吸収スペクトル変化を測定した。矢印は吸収スペクトルが変化した方向を示す。(b) 紫外線 LED で照射してアゾベンゼンリンカーをシス型にした試料 (Dark) を青色のフラッシュ光で励起し、その後の吸収スペクトル変化を測定した。(c) (a)(b)における 449nm の吸光度変化を励起後の時間に対してプロットした (それぞれ赤と青の丸印)。アゾベンゼン由来の吸収スペクトルから、純粋なトランス型、シス型の吸光度変化を算出した (それぞれ赤と青の破線)。緑の破線はリンカーを含まない K64C/Y98C の吸光度変化を示す。

測定した。シス型の吸光度の回復はトランス型よりも速く、0.1~10 秒程度の時定数で回復した。以上の結果から、シス型リンカーは光反応サイクルを加速することがわかった。

アゾベンゼンに由来する 360nm の吸収からシス型、トランス型の比率を算出し、純粋なシス型、トランス型の吸光度変化を求めたところ、シス型で見られた速く戻る成分は、トランス型では消失していることがわかった。このような光反応速度の変化は、アゾベンゼンのシス→トランス異性化を起こす黄色光、トランス→シス異性化を起こす紫外光の照射により、可逆的に変化したので、アゾベンゼン

ンによって PYP の光反応サイクルの制御ができたと考えられた。

本研究では、PYP やロドプシンの構造変化メカニズムをアミノ酸レベルで解析した。また、PYP の反応を、アゾベンゼンを用いて立体構造を操作することで制御することに成功した。この技術をさらに発展させれば、アゾベンゼンの光異性化によって受容体の構造を変化させ、本来の刺激やリガンドなしに活性化することや、リガンド結合部位の構造に変化を加えてリガンドに対する親和性や選択性を変化させることなどが可能になると考えられる。

## 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 8 件)

1. Sakai, K., Imamoto, Y., Yamashita, T., and Shichida, Y. (2010) Functional analysis of the second extracellular loop of rhodopsin by characterizing split variants. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9, 1490-1497. (査読有)
2. Sugawara, T., Imai, H., Nikaido, M., Imamoto, Y., and Okada, N. (2010) Vertebrate rhodopsin adaptation to dim light via rapid meta-II intermediate formation. *Mol. Biol. Evol.* 27, 506-519. (査読有)
3. Chagnenet-Barret, P., Plaza, P., Martin, M. M., Chosrowjan, H., Taniguchi, S., Mataga, N., Imamoto, Y., and Kataoka, M. (2009) Structural effects on the ultrafast photoisomerization of photoactive yellow protein. Transient absorption spectroscopy of two point mutants. *J. Phys. Chem. C* 113, 11605-11613. (査読有)
4. Morizumi, T., Kimata, N., Terakita, A., Imamoto, Y., Yamashita, T., and Shichida, Y. (2009) G protein subtype specificity of rhodopsin intermediates metarhodopsin Ib and metarhodopsin II. *Photochem. Photobiol.* 85, 57-62. (査読有)
5. Harigai, M., Kataoka, M., and Imamoto, Y. (2008) Interaction between N-terminal loop and  $\beta$ -scaffold of photoactive yellow protein. *Photochem. Photobiol.* 84, 1031-1037. (査読有)
6. Imamoto, Y., Harigai, M., Morimoto, T., and Kataoka, M. Low-temperature spectroscopy of Met100Ala mutant of photoactive yellow protein. (2008) *Photochem. Photobiol.* 84, 970-976. (査読有)
7. Imamoto, Y., and Shichida, Y. (2008) Thermal recovery of iodopsin from the photobleaching intermediates. *Photochem. Photobiol.* 84, 941-948. (査読有)
8. Kamikubo, H., Koyama, T., Hayashi, M.,

Shirai, K., Yamazaki, Y., Imamoto, Y., and Kataoka, M. (2008) The photoreaction of the photoactive yellow protein domain in the light sensor histidine kinase Ppr is influenced by the C-terminal domains. Photochem. Photobiol. 84, 895-902. (査読有)

[学会発表] (計5件)

1. 今元 泰「光センサー蛋白質の物性と機能メカニズム」生命機能研究科研究交流会「FBS コロキウム」、大阪大学生命機能研究科、2010年12月15日
2. Imamoto, Y. "Light-induced conformational change of photoactive yellow protein", Memorial Symposium for the 25th International Prize for Biology "Biology of Sensing", Shiran Kaikan, Kyoto University, Kyoto, Japan, December 2, 2009.
3. 今元 泰「蛋白質の構造変化：構造から予測される反応と実際の反応」日本生物物理学会第46回年会シンポジウム「タンパク質の構造に秘められた動作原理を読み取る」、福岡国際会議場、2008年12月4日
4. Imamoto, Y. "Association of rhodopsin and regulatory protein." The 4th Asia and Oceania Conference on Photobiology, Swatantrata Bhawan, Banaras Hindu University, Varanasi, India, November 25, 2008.
5. 今元 泰「蛋白質構造変化の伝播メカニズム」大阪大学蛋白質研究所セミナー「生物における光情報変換の一般性と多様性」大阪大学蛋白質研究所、2008年4月18日

[その他]

ホームページ等

<http://photo1.biophys.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

今元 泰 (IMAMOTO YASUSHI)

京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：80263200

### (2)研究分担者

七田 芳則 (SHICHIDA YOSHINORI)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：60127090

山下 高廣 (YAMASHITA TAKAHIRO)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：50378535

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：