

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 10 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14662

研究課題名(和文)青感受性色覚タンパク質の高分解能X線結晶構造解析

研究課題名(英文)High resolution X-ray crystallographic structural study of blue sensitive cone pigment

研究代表者

片山 耕大 (Katayama, Kota)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00799182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトの色覚を担う光受容タンパク質、色覚視物質の原子座標を決めることで、色を識別する分子機構の解明に向けた構造基盤の確立に取り組んだ。具体的には、光異性化しないアナログレチナールを結合した青視物質に対し、短期間で結晶取得を実現する条件の探索、低温紫外可視分光および低温赤外分光測定により、青視物質の光反応過程において生成する中間体の同定、さらにBL中間体の構造解析に成功、緑視物質における熱安定化変異体の発見、およびLCPによるその変異体の結晶構造解析を行った。これらの研究成果は、3報の国際論文、7件の招待講演を含む国内外学会で発表、3件の賞を受賞した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

色認識は生物学者、物理学者から哲学者まで多くの研究者の関心を集める一方、色覚視物質の発現試料に対する構造生物学的解析は過去に全く行われていなかった。本研究では、構造解析のための結晶取得に向けた実験条件の確立に差し迫っており、今後の結晶化・構造決定が大いに期待できる。そして光耐性を有する青視物質アナログの構造基盤に立脚した色盲患者の治療に向けた新薬開発への研究発展が期待される。さらに、分光法による青視物質の中間体の同定およびBL中間体の赤外分光差スペクトル測定の成功は、吸収される青色光情報がどのようにしてシグナル伝達されるのか、青視物質における光情報伝達機構を理解するための構造情報を与えた。

研究成果の概要(英文)：Humans have two kinds of vision: twilight vision mediated by rhodopsin (Rh) and color vision achieved by three cone pigments. A common chromophore, 11-cis-retinal, is used to distinguish different colors in vision. While X-ray structure of Rh was determined, structural studies of cone pigments lag far behind those of Rh. Here, I attempted to determine the 3D structure of cone pigments. To develop light-stable cone pigments, I introduced analogue retinal that is restricted cis-trans isomerization. Successfully obtained blue pigment regenerated with analogue retinal exhibited high thermal stability. Furthermore, by using a novel crystallization procedure, blue pigment analogue resulted in an appropriate phase separation in the crystal drops, which gave the possibility for discovering the suitable condition to obtain crystals. I also found the unique photochromic property of blue pigment upon illumination by using spectroscopic studies, which indicated the specific photoreaction.

研究分野：生物物理

キーワード：色覚視物質 X線結晶構造解析 赤外分光解析 人工合成レチナール 波長制御 水分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの視覚は明暗視を担うロドプシンと色覚を担う3種類(青・緑・赤)の視物質から構成される。中間体の結晶構造まで決定されているロドプシンと比較して、霊長類色覚視物質はこれまで以下の3つ、すなわち 1) 試料調製が困難、2) 限られた試料に対する構造解析手法が存在しない、3) 実験操作のすべてを暗室で行わないといけない、ことから構造生物学的研究は皆無であり、ヒトが色を見分ける分子機構は不明であった。

そのような現状の中、私は高精度低温赤外分光計測法を培養細胞によって発現させたサル色覚視物質に適用することで、2010年に世界で初めて緑・赤視物質の構造解析に成功、続く内部結合水(2012年)や同位体標識試料(2015年)の構造解析によりヒトが緑と赤を見分ける分子機構の解明に成功した。さらに2017年、青視物質の構造解析を実現し、3種の色覚視物質の振動構造データが出揃った。特に、青視物質の赤外スペクトルは、レチナールやタンパク質骨格の振動モードが緑・赤視物質とは大きく異なっていた。また、緑・赤視物質では水分子が疎水的なレチナール分子の近傍に点在するように存在することが示唆されていたのに対し、青視物質では複数の水分子が集合体を形成することを示唆する特徴的な水の振動モードが観測された。このように赤外分光解析により、タンパク質構造の柔らかさによって生み出される、水と油(=レチナール)の絶妙な相互関係を明らかにしてきたわけであるが、色覚視物質の波長制御機構の解明に向けた構造解析を完了させるためには、1) アミノ酸や水分子の正確な位置情報、2) レチナールの分子構造、といった2つの大きな要素を明らかにする必要がある。これを解決できるのがX線結晶構造解析である。

2. 研究の目的

本研究では赤外分光による構造解析を受けて、色覚視物質の原子座標を決めることで色を識別する分子機構をより詳細に理解する。色の認識は生物学者、物理学者から哲学者まで多くの研究者の関心を集める一方、発現試料に対する構造生物学的解析は過去に全く行われておらず、今もって世界中で構造解析を達成できているのは私だけである。一方、当初は試料調製が困難な色覚視物質に対するX線結晶構造解析など、通常の構造生物学手法の適用は難しいと考えていた。しかし霊長類色覚視物質の赤外分光解析を実現する中で、“色覚視物質の三次元構造が見てみたい”、“水分子がタンパク質内部のどこに分布することで波長制御に関与するのか知りたい”と考え、米国のCase Western Reserve大学にて(ウシ)ロドプシンの結晶構造をGタンパク質共役型受容体(GPCR)として世界で最初に決定したPalczewski教授の研究室に留学した。そこで昆虫細胞による大量発現系を確立したことで、培養溶液1Lから~1mgの3種色覚視物質の発現に成功、さらに結晶構造解析においてボトルネックの1つである熱安定性の問題を克服した。

視物質は一度光を吸収し活性化すると、レチナールが解離し退色する。私は、有機化学者との共同研究により人工合成したアナログレチナールを用いることで、光退色せず光反応後に自発的に始状態に戻る、光サイクル型ロドプシンを作製することに成功した(Gulati, Katayama et al. PNAS 2017)。そこで、アナログレチナールを色覚視物質に対しても適用したところ、3種の色覚視物質のうち、青視物質のみ可視領域の吸収を有する青視物質アナログを作製した。生物物理学的手法を駆使した青視物質アナログの分子特性に関する研究により、光サイクル型ロドプシンのような光サイクル反応は示さなかったが、熱安定性の劇的な上昇が確認された(Katayama et al. JBC 2019 図1)。従って、青視物質アナログの三次元構造を決定し、構造基盤に立脚してアナログレチナールを最適化することで、光サイクル反応を示す色覚視物質の創成が可能になり、最終的には色盲患者の治療に向けたレチナール誘導型の新薬開発への研究発展も期待される。さらに、本研究では、青視物質が唯一アナログレチナールを結合できたことから、その結合ポケットの構造的特定性をさらに追及するべく、低温赤外分光法を用いた初期中間体に後続する光反応中間体の構造解析も実行する。

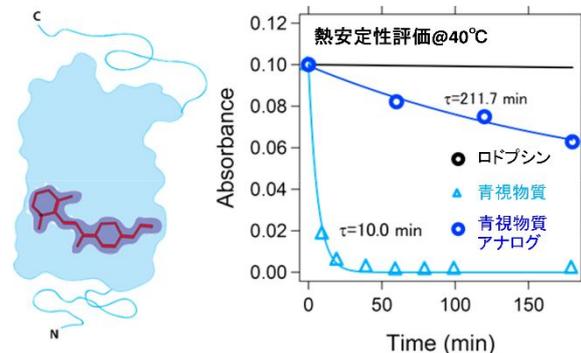


図1. ヒト青視物質の熱安定性比較

3. 研究の方法

本研究では、色覚視物質の中でも青視物質の結晶構造解析を中心とした構造解析を実行する。具体的には(1)青視物質の暗状態でのX線結晶構造解析、(2)青視物質の光反応中間体に関する分光解析、(3)緑視物質の結晶構造解析に向けた熱安定化変異探索、およびその結晶化、である。以下に(1)~(3)のプロジェクト遂行における研究方法について記載する。

(1) 青視物質 X線結晶構造解析

色覚視物質などGPCRの結晶構造解析を実現するためには、3つのボトルネック：タンパク質の大量発現・精製、結晶化、データ測定、を克服しなければならない。さらに、視物質は光に依存しないレチナール分子の熱異性化によって活性化される(熱雑音)ことが知られて

おり、色覚視物質の熱異性化頻度がロドプシンよりも 1000 倍高いことが分かっている。これにより暗室で試料を仕込んででも構造が不安定化され、結晶が育たない問題が生じる。そこで、レチナルの“シーストランス”異性化を人工的に阻害した、アナログレチナルによって再構成された青視物質（青視物質アナログ）を結晶化の対象とした。青視物質アナログは、光反応サイクルは示さず、時間オーダーでの遅い退色反応を示す他方、熱安定性が一桁以上向上することを、すでに論文にて発表している (Katayama et al. *JBC* 2019)。さらに構造決定が実現しているロドプシンと同程度の純度で精製できることも確認した。結晶化法として、ロドプシンの結晶化に用いられた蒸気拡散法を基盤として、近年 GPCR の結晶構造解析に広く使用されている脂質メソフェーズ法 (LCP 法) も適用することで、青視物質アナログの高分解能結晶構造を得るための結晶化取得を目指した。

(2) 青視物質の光反応中間体の同定およびその赤外分光解析

77 K 温度下で初期中間体 Batho を形成させたのち、昇温による Batho 中間体の熱緩和反応過程を紫外可視分光測定による極大吸収波長 (λ_{\max}) のシフトとして計測することで、後続する反応中間体を同定することに取り組んだ。また、同様の温度条件下において、反応中間体に対する低温赤外分光測定により構造解析を実行した。

(3) 緑視物質の熱安定化変異探索および構造解析

2017 年から緑視物質において、長波長シフトに起因する塩化物イオンの結合機構を明らかにするため、全反射赤外分光法を駆使した構造解析を行っており、塩化物イオンが波長シフトのみならず、タンパク質の構造安定化に関与することを発表した (Katayama et al. *PCCP* 2018)。この結果を受け、「塩化物イオン結合部位近傍のアミノ酸が緑視物質の構造安定化の一端を担う」と考え、塩化物イオンが結合すると予想される細胞外側領域において、緑視物質が属する L グループ (長波長吸収グループ) に高く保存されるアミノ酸に着目し、「変異体作成→塩化物イオン効果 (波長シフト効果)→安定化評価」を行った。さらに、候補となるアミノ酸変異体に対し、低温赤外分光測定による構造解析、および脂質メソフェーズ法による結晶化を試みた。

4. 研究成果

(1) 青視物質アナログ X 線結晶構造解析

昆虫細胞 Sf9 によって発現させた霊長類青視物質オプシン (レチナル非結合型アポ体) に対し、モル比にして 5 倍等量の 6 員環挿入型アナログレチナルを混和させることで、青視物質アナログを再構成させた。続く抗体アフィニティーおよびサイズ排除クロマトグラフィーによる精製を経た後、私が留学時に考案した蒸気拡散法と硫酸沈殿法を組み合わせた結晶化法を適用した。その結果、結晶を得ることはできなかったが、結晶化プレート上で良好な結晶化母液との相分離が確認された。本研究では、なるべく天然のタンパク質に近い条件下での構造決定を目指していたが、今後結晶成長を促進させるために、GPCR 全般において自由度の高い第三細胞内ループ部位を親水性タンパク質 (T4 リゾチームや熱安定化したアポ型チトクロム b562 変異体 (BRIL)) に置き換えたいくつかのコンストラクトを作製し、独自の蒸気拡散法により良質な結晶を得ることを目指す。

(2) 青視物質の光反応中間体の同定およびその赤外分光解析

脂質再構成した青視物質に対し、77 K において光照射により光反応初期中間体 Batho を生成させた。その後、昇温させることで Batho 中間体の熱反応過程を低温紫外可視分光測定により λ_{\max} のシフトとして計測し、後続する反応中間体の同定を試みた。その結果、163 K、223 K、253 K、300 K において中間体の遷移が確認され、青視物質の光反応は、“始状態 → Batho → BL → Lumi → Meta-I → Meta-II → 退色”という過程で進行することが分かった。特に、ロドプシンや緑・赤視物質には観測されない、BL 中間体の存在を明らかにした (図 2a)。本研究結果は、青視物質に特異的なシグナル伝達機構の存在を示唆していることから、*Biophysics and Physicobiology (BPPB)* へ論文を投稿した。さらに興味深い点は、これまでロドプシンを含めた視物質は 77 K で生成する Batho 中間体のみ可逆的な光反応 (フォトクロミズム) を示し、後続する中間

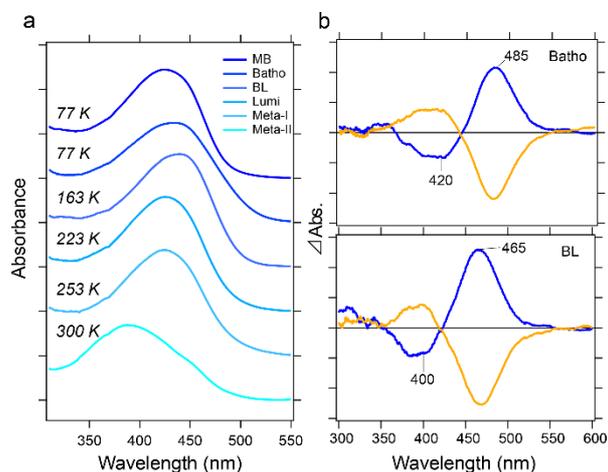


図 2. (a) 青視物質の各温度下で生成する光反応中間体の UV-vis スペクトル (b) 青視物質の Batho 中間体および BL 中間体のフォトクロミック光反応を示す UV-vis スペクトル

体はフォトクロミックな光反応特性を示さないと考えられてきた。しかし、今回同定された Batho 以降の 4 種類の中間体のうち、Meta-II を除く中間体はフォトクロミズムを示すことが明らかとなった (図 2b)。これは、とりわけ青視物質におけるレチナル周辺の特長環境や構造ダイナミクスが他の視物質とは異なることを示唆している。

私は、2017 年に青視物質における Batho 中間体の赤外差スペクトルを測定することに成功しており、レチナルやタンパク質骨格、さらに内部結合水が他の視物質と異なることを発表した (Katayama et al. *Sci. Rep* 2017)。今回、赤外分光解析を進展させ、163 K 温度下での光照射により、BL 中間体の差スペクトルを得ることに成功した (BPPB 論文投稿中、図 3)。レチナルの振動モードがほとんど消失し、BL 中間体の形成に伴いレチナルのねじれ状態が完全に緩和していることを示唆した。また、これに付随して、Batho 中間体で観測されていた、タンパク質骨格の大きな構造変化が BL 中間体では顕著に減少する結果となった。今後、同位体標識試料や変異体、さらに後続する中間体の赤外分光測定を達成することで、フォトクロミズムを示す、青視物質特異的な構造ダイナミクスを明らかにしていく。

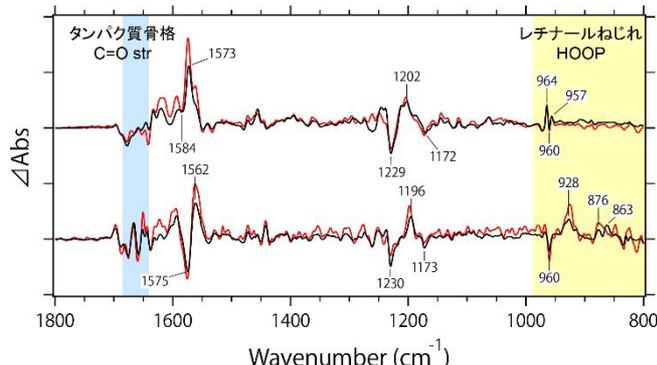


図 3. 青視物質の Batho 中間体および BL 中間体との光誘起赤外差スペクトル 重水水和における測定

(3) 緑視物質の熱安定化変異探索および構造解析：

2017 年から、緑・赤視物質についてタンパク質内部への塩化物イオン結合に伴う長波長シフトのメカニズム解明に向けた赤外分光解析を行っており、塩化物イオンの結合が単に吸収波長のシフトを引き起こすだけでなく、タンパク質の構造安定化に寄与していることを明らかにしてきた。そこで、今回塩化物イオン結合部位を構成することが予想される細胞外側に位置するアミノ酸の中で、L グループにのみ高く保存されるアミノ酸を一次配列より探索した結果、ロドプシンの結晶構造において、レチナルから 10 Å 以上離れた位置に存在する 114 番目のグルタミンをアスパラギンに変異体させることで、熱安定性が飛躍的に向上することを発見した。さらに、この熱安定性向上のメカニズムを探るべく、Q114N 変異体に対する低温赤外分光法を駆使した構造解析を行った結果、レチナル近傍に強い水素結合を形成する水分子が存在することが分かり、水分子を介した新たな水素結合ネットワークが構造安定化に関与していることを明らかにした。これらの研究成果は 2019 年、*Biochemistry* 誌に発表した (Katayama et al. *Biochemistry* 2019)。さらに、Q114N は昆虫細胞 Sf9 による発現量が野生型と比較して 3~5 倍高いことも分かった。

本研究では、青視物質を対象として結晶構造解析を進めてきたが、緑視物質 Q114N 変異体の発現量が高いことや、熱安定性が著しく高いことから、並行して Q114N 変異体の結晶構造解析にも取り組んだ。最近、LCP 法により得られる微結晶を精度よく観察することを可能にする SONICC と呼ばれる装置が注目されている。SONICC は、第二次高調波発生 (SHG) の原理を用いて、LCP 結晶ドロップ内のキラリ結晶を精度よく検出、画期的なシステムである。今回私は、Q114N 変異体を Sf9 細胞により大量発現、精製させ、LCP 法による結晶化を実施した。全ての結晶化作業を暗赤色灯下にて行ったが、脂質モノオレインとタンパク質の混合溶液が透明になることを確認し、適切な LCP の調製および LCP への Q114N 変異体の再構成を完了させた。LCP へ再構成した Q114N 変異体試料を結晶化ロボット、Gryphon LCP (Art Robbins Instruments) を使用して結晶用ドロップを作製した。2~7 日後、定期的に SONICC による結晶観察を行った。今後スクリーニング数を増やすこと、さらに結晶成長を促進させることを目的として、水溶性タンパク質 (T4 リゾチームおよび BRIL) を融合させたコンストラクを作製し、結晶化を目指す。

本研究成果は 2018.4.-2020.3. の 2 年間で、3 件の学術論文、7 件の学会発表として発表し、さらに 3 件の賞を受賞するなど高い評価を得ることができた。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kota Katayama, Sahil Gulati, Joseph T. Ortega, Nathan S. Alexander, Wenyu Sun, Marina M. Shenouda, Krzysztof Palczewski, Beata Jastrzebska	4. 巻 294
2. 論文標題 Specificity of the chromophore-binding site in human cone opsins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 6082-6093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.007587. Epub 2019 Feb 15	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Katayama Kota, Nakamura Shunta, Sasaki Takuma, Imai Hiroo, Kandori Hideki	4. 巻 58
2. 論文標題 Role of Gln114 in Spectral Tuning of a Long-Wavelength Sensitive Visual Pigment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2944 ~ 2952
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.9b00340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katayama Kota, Imai Hiroo, Kandori Hideki	4. 巻 48
2. 論文標題 FTIR Study of S180A Mutant of Primate Red-sensitive Pigment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1142 ~ 1144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/cl.190458	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 7件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kota Katayama
2. 発表標題 Structural basis for elucidating spectral tuning mechanism of cone pigments
3. 学会等名 International Symposium on "Optobiotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kota Katayama
2. 発表標題 Structural basis for elucidating spectral tuning mechanism of cone pigments
3. 学会等名 5th Global Nanotechnology Congress and Expo (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kota Katayama
2. 発表標題 Molecular mechanism of spectral tuning in color vision
3. 学会等名 Scientific seminar in University of Valencia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kota Katayama
2. 発表標題 Molecular mechanism of spectral tuning in color vision
3. 学会等名 The 9th International Conference on Bioscience and Biotechnology (ICBB) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片山 耕大
2. 発表標題 色覚センサータンパク質の色認識とシグナル伝達の分子機構
3. 学会等名 岡山大学 生体物理化学研究室 セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kota Katayama
2. 発表標題 ATR-FTIR study of ligand-binding to G protein-coupled receptors
3. 学会等名 The 18th Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片山 耕大
2. 発表標題 赤外線とX線を融合させたGタンパク質共役型受容体の構造・機能相関研究
3. 学会等名 第10回化学公開セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hideki Kandori, Kota Katayama	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 Just accepted
3. 書名 Protein Reserach by Vlbrational Spectroscopy	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----