

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15504

研究課題名（和文）光異性化に先立つタンパク質構造変化の誘起機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of protein structural changes prior to photoisomerization

研究代表者

田原 進也 (Tahara, Shinya)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：00783060

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ロドプシンはレチナール発色団を持つ光受容タンパク質である。発色団の光異性化がタンパク質構造変化を駆動し、機能を発現すると考えられていたが、申請者は光異性化に先立ってタンパク質部位が構造変化することを近年示した。本研究は光異性化を起こさない修飾発色団をもつロドプシンを調製し、タンパク質構造変化を観測し、光異性化に先立つタンパク質構造変化の誘起機構を解明する。本研究で申請者は代表的な2種の微生物由来のロドプシンに修飾発色団を高い効率で導入することに成功した。これによりタンパク質構造変化の観測実験の準備が整った。測定はCOVID-19による大学の移動制限が解除され次第、大阪大学にて実施する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光受容タンパク質は光エネルギーを利用して機能するタンパク質である。光応答タンパク質は発色団を内包する。発色団が光を吸収すると、発色団の構造変化が起こり、これによってタンパク質構造変化が駆動されると従来より考えられてきた。しかし申請者は発色団より先にタンパク質構造変化が起こることを近年示した。本研究ではこの速いタンパク質構造変化を駆動する機構を調べる。本研究で申請者は構造変化しない発色団を持つ光応答タンパク質の合成に成功し、タンパク質構造変化の測定の準備が整った。測定から得られる知見は、新規の仕組みで動く分子機械の設計指針を与える。

研究成果の概要（英文）：Rhodopsins are retinal-binding photoreceptor proteins. It has been believed that photoisomerization of the retinal chromophore drives structural changes of the protein moiety and the functions of rhodopsins. However, we recently found that protein structural changes occur prior to the photoisomerization. This study aims to elucidate molecular-level mechanism of this rapid protein structural changes. In this study, we synthesize microbial rhodopsins possessing a retinal analog which does not undergo photoisomerization and observe their protein structural changes upon photoexcitation.

We successfully synthesized *Gloeobacter* rhodopsin and Sensory rhodopsin II possessing the retinal analog at the high yields. Observations of their protein structural changes are the remaining step of this study and will be carried out as soon as the restriction of movement between universities due to COVID-19 is abolished.

研究分野：物理化学

キーワード：光受容タンパク質 超高速ダイナミクス タンパク質構造変化 ロドプシン 紫外共鳴ラマン分光

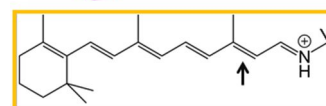
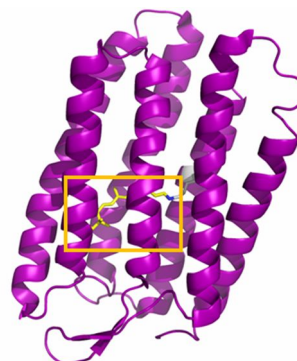
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ロドプシンは代表的な光受容タンパク質であり、レチナール発色団を有する(図 1)。発色団はリジン残基側鎖のアミノ基とプロトン化シッフ塩基結合している。発色団が光を吸収すると *trans-cis* 光異性化反応を起こし、生体反応を誘起し、生体エネルギーの産生等を行う。

ロドプシンは高効率な発色団光異性化を実現し、効率的に生理機能を発揮する。実際にロドプシン中のレチナール発色団の光異性化の量子収率は、溶液中と比べ 2-3 倍高い。このことはタンパク質部位が光異性化を促進することを示唆する。

近年、申請者はタンパク質部位の構造変化がレチナール発色団の光異性化に先立って起こり、光異性化を促進する可能性を指摘した。従来はまず発色団の光異性化が 0.5 ps 程度で起こり(図 2a)、これがタンパク質部位の構造変化を誘起すると考えられてきた。しかし申請者はフェムト秒時間分解ラマン分光法により光異性化の前にタンパク質部位の構造変化が起こることを(図 2b)、バクテリオロドプシンをはじめセンサーロドプシン II (*NpSR II*) やハロロドプシンについて示した。さらに先行研究との関連からこの構造変化が光異性化を促進する可能性を指摘した。しかしこのような光異性化に先立つタンパク質部位の構造変化がどのような機構で誘起されるかは未知である。



all-*trans* レチナール発色団

図 1. 微生物型ロドプシンのタンパク質構造(上図)とレチナール発色団(下図)。レチナール発色団の光異性化する C=C 結合に矢印を付した。

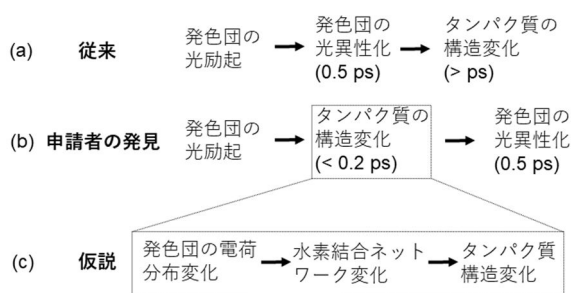


図 2. (a)従来支持されているロドプシンのダイナミクスおよび(b)申請者の発見と(c)本研究で検証するタンパク質構造変化の誘起機構の仮説。

2. 研究の目的

本研究の目的はロドプシンのレチナール発色団光異性化に先立つタンパク質構造変化の分子機構を解明する事である。この機構を明らかにすれば、新規機構で駆動される分子機械の設計指針を得ることができる。

3. 研究の方法

申請者はロドプシンの発色団光異性化に先立つタンパク質構造変化の分子機構として次の仮説を立てた。発色団が光励起されると、発色団内の電荷分布が大きく変わる。これにより発色団のシッフ塩基の電荷分布が大きく変化することが予測される。これによりシッフ塩基と周辺との相互作用、特にシッフ塩基とそのカウンターイオンや周辺の水との水素結合ネットワークに変化が起き、タンパク質構造変化が誘起されるという仮説を立てた(図 2c)。

上記の仮説を検証するため、研究当初は光励起による双極子モーメント変化が小さい化学修飾レチナールを持つロドプシンの構造変化を調べる予定であった。化学修飾レチナールの合成に詳しいイスラエルのワイツマン科学研究所の Mordechai Sheves 教授と本研究について議論した。その結果、まずは光異性化しない化学修飾レチナール発色団(C=C locked レチナール)を持つロドプシンについて構造変化を調べ、光異性化以外の要因で生じるタンパク質構造変化を明らかにすることとなった。C=C locked レチナールは、Mordechai Sheves 教授から提供して頂けることとなり、共同研究を行うこととなった。

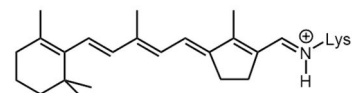


図 3.光異性化しない化学修飾レチナール発色団(C=C locked レチナール)。図はリジン残基とプロトン化シッフ塩基結合した場合の構造。

本研究で実施する時間分解紫外共鳴ラマン分光測定では比較的多量のロドプシン試料(1 g 程度)が必要となる。このためロドプシンに C=C locked レチナールを高効率で導入するための条件検討を行った。代表的なロドプシンである *Natromonas pharaonis* 由来のセンサリーロドプシンII (*NpSRII*)に C=C locked レチナールを導入した。*NpSRII*はロドプシンの中でも高効率(量子収率 0.5, 溶液中の 2-3 倍高い)かつ超高速な発色団光異性化(0.2 ps, 溶液中の 20 倍速い)を実現する。このことは *NpSRII*のタンパク質部分が光異性化を強く促進することを意味する。また比較的精製が容易である *Gloeobacter violaceus* 由来のグロイオバクターロドプシン(GR)にも導入を行った。

試料合成に続き、タンパク質構造変化を観測するため、時間分解紫外共鳴ラマン分光法を適用する。この手法により、発色団励起後のタンパク質中のトリプトファン・チロシンの時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルを取得する。得られたスペクトルは、これらの残基の周辺環境を反映するため、その時間変化を通し、タンパク質構造変化を観測する。これらのロドプシンについて天然のレチナールと C=C locked レチナールを持つ場合でタンパク質構造変化を比較する。これにより光異性化反応有無によってタンパク質の構造変化がどのように異なるか検討する。

4. 研究成果

本研究では C=C locked レチナールを持つ *NpSRII*および GR を高収率で調製する方法を確立した。これにより時間分解紫外共鳴ラマン分光法による測定の準備が整った。*NpSRII*および GR で調製方法は基本的に同じである。以下では GR の結果についてのみ示すが、*NpSRII*と GR で異なる点は、その都度述べる。

まず既報に従い、天然のレチナールを持った GR 試料を調製した。次に GR からレチナール発色団を取り除いたタンパク質であるアポ GR を調製した。得られた GR 試料にヒドロキシルアミン(HA)溶液を加え、連続的に攪拌しながら 540 nm の光を照射した。図 4 には天然のレチナール発色団を持った GR の吸収スペクトル(グレー実線)と HA を加え、光照射開始後の各時刻における吸収スペクトル(赤、緑、青、黒実線)を示した。540 nm 付近の吸収極大は GR に内包された発色団の $S_1 \leftarrow S_0$ 吸収帯である。HA を加え、光を照射する

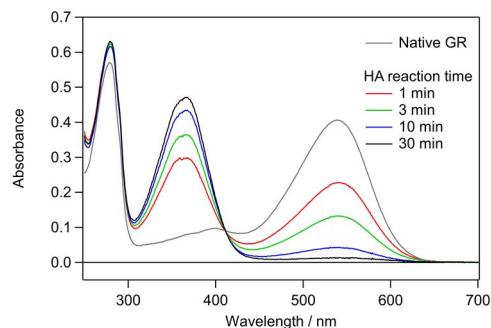


図 4. ヒドロキシルアミン(HA)を加え、光照射開始後の各時刻に得た GR の吸収スペクトル。天然のレチナールを持つ GR の吸収スペクトルも示した。

と時間とともに 540 nm 付近の吸光度が減少し、レチナールオキシム由来の 360 nm 付近に吸収帯が現れた。これは発色団が解離し、発色団を持たない GR(アポ GR)が生成したことを意味す

る。スペクトルから 30 分で 99% の GR がアポ GR となった。この試料に標準的なプロトコルで Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーを行うことで、レチナルオキシムを除去し、アポ GR を単離した。

得られたアポ GR に C=C locked レチナルを導入した。GR が持つアスパラギン酸残基 Asp121 の pK_a は 7.5 程度である。したがってタンパク質を扱う中性付近においてタンパク質構造が pH に対して敏感に変わる。このため、酸性条件(pH 5) および塩基性条件(pH 9)で C=C locked レチナルのタンパク質への結合を検討した。図 5 には pH 5 および pH 9 の 200 μ M アポ GR に対し、2 当量の C=C locked レチナル(エタノール溶液)を加え、室温でインキュベートした際の吸収スペクトルの経時変化を示した。400 nm 付近の吸収帯はタンパク質に結合していない C=C locked レチナルの吸収帯である。インキュベートを続けると、560 nm 付近にアポ GR に結合した C=C locked レチナル由来の吸収帯が現れ、その強度が徐々に増大した。これは修飾発色団を持つ GR が徐々に生成していることを意味している。この吸収帯の強度は 48 時間後にはほとんど増大しなくなった。C=C locked レチナルの導入効率は pH 9 よりも pH 5 のほうが高かった。天然発色団を持つ GR の 540 nm の分子吸光係数と光異性化しない発色団

を持つ GR の 560 nm の分子吸光係数が同じであると仮定すると、光異性化しない発色団が 51% の効率でアポ GR に取り込まれた。以上により GR に C=C locked レチナルを高効率で導入する方法が確立した。NpSR II については pH 9 の条件で 44% の導入効率を得られた。

上記で得られた試料から C=C locked レチナルを持つ GR を単離するため、Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーを行った。図 6 には溶出プロファイルおよび各溶出フラクションの吸収スペクトルを示した。イミダゾール濃度 0 mM から 1 M まで徐々に変化させながら溶出を行った(図 6a 青線)。その結果イミダゾール濃度 200-300 mM 付近でタンパク質の溶出ピークが観測された(図 6a 赤線)。このピークは非対称な形状であっ

た。これは C=C locked レチナルを持つ GR のほか、アポ GR が試料中に残っており、これらの溶出ピークが重なっているためである。図に示すように溶出溶液を 8 分割し、フラクション 1 から 8 として回収した。図 6b には C=C locked レチナル由来の 560 nm の吸光度で規格化したものを示した。スペクトルからこのことはフラクション 1 から 6 には C=C locked レチナルを

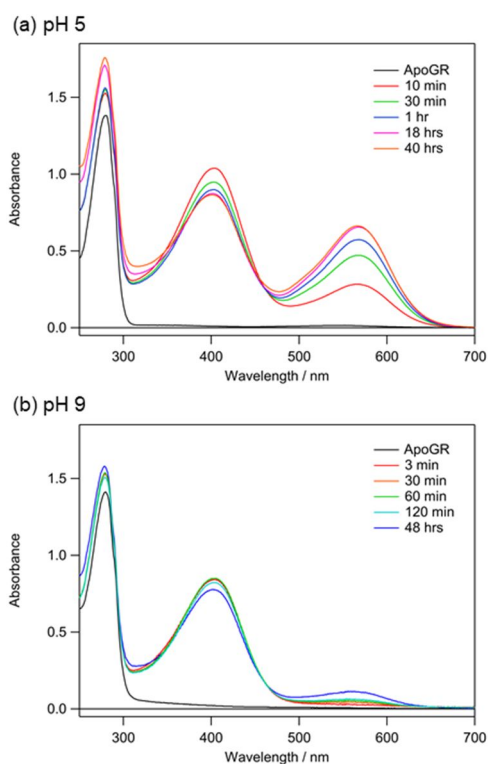


図 5. pH 5, 9 における修飾レチナル発色団のアポ GR への結合。(a)pH 5 および (b)pH 9 の条件でアポ GR と 2 当量修飾レチナル発色団混合後の各時間における吸収スペクトル。

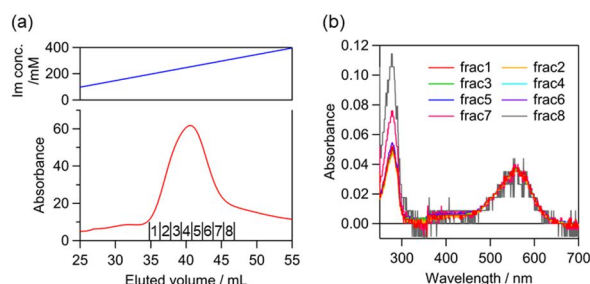


図 6. (a) C=C locked レチナルを持つ GR とアポ GR の混合溶液の Ni-NTA クロマトグラフィーの溶出プロファイル。下図赤線下の 1 から 8 の数字は溶出溶液のフラクション番号を示す。(b)各フラクションの吸収スペクトル。発色団の吸光度(560 nm)で規格化したもの。

持つ GR が支配的であり、アポ GR と分離できることが分かった。すなわち C=C locked レチナールを持つ GR を高純度で得る方法が確立した。*NpSR*IIについては標準的なプロトコルで陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinya Tahara, Misao Mizuno, Yasuhisa Mizutani	4. 巻 124
2. 論文標題 Nonbonded Atomic Contacts Drive Ultrafast Helix Motions in Myoglobin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 5407-5414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpccb.0c04772	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3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shinya Tahara
2. 発表標題 Triggers of Primary Protein Dynamics in Photoreceptor Proteins
3. 学会等名 生物物理学会シンポジウム『光生物学研究の多様性～分子から生物個体まで～』（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田原進也
2. 発表標題 フェムト秒紫外誘導ラマン分光法による微生物型ロドプシンの超高速タンパク質応答の研究
3. 学会等名 ISSPワークショップ「レチナルタンパク質の光機能発現の物理と化学」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Tahara
2. 発表標題 Atomic Contacts Drive Structural Changes of Myoglobin
3. 学会等名 19th Time Resolved Vibrational Spectroscopy（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------