

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770146

研究課題名（和文）

イカロドプシン反応中間体のX線結晶構造解析

研究課題名（英文）

Structural analysis of photo-intermediates of squid rhodopsin

研究代表者

村上 緑 (Midori Murakami)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：20324387

研究成果の概要（和文）：

視物質ロドプシンのバソ中間体とその光異性体イソロドプシンの結晶構造を求め、光反応サイクルの初期過程の様子を明らかにし、シグナリングに必須な構造変化を明らかにした。暗順応状態とイソロドプシンの構造を比較すると、レチナールは膜面に平行にポリエーテル鎖平面を向けており、レチナールと膜貫通ヘリックス3との立体障害がイソロドプシンを安定に保持することが明らかとなった。一方、暗順応状態からバソ中間体への遷移によってポリエーテル鎖平面は膜の法線方向へと回転しポリエーテル鎖は細胞質側へと大きく移動した。この時、レチナールは大きく捻じれ、近傍残基の側鎖に相補的な動きが惹起され、吸収した光エネルギーはレチナールおよび近傍残基の歪みとして蓄えられることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Photochemical properties of invertebrate rhodopsin are different largely from vertebrate rhodopsin. Recent crystallographic studies of squid and bovine rhodopsins suggest profound differences in the structure of these photoreceptors. Here, we perform X-ray crystallographic studies of squid bathorhodopsin and an artificial 9-cis isomer isorhodopsin. Analyses of diffraction data of frozen crystals that were illuminated at these wavelengths provided the structural information of each isomeric state. The result showed that the formation of bathorhodopsin is accompanied by a large movement of the central moiety of the retinal polyene chain towards the cytoplasmic side with small movements of the  $\beta$ -ionone ring and the Schiff base; i.e., the retinal takes on a right-handed screwed all-trans configuration. Conversely, the retinal in isorhodopsin takes on a planar 9-cis configuration; i.e., as compared to the 11-cis retinal in the unphotolysed state, a limited configurational change is observed around the C9=C10 bond.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、X線結晶構造解析

### 1. 研究開始当初の背景

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 $\alpha$ ヘリックス構造を特徴とするG蛋白質共役型受容体(GPCR)の一員である。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に結合したG蛋白質へと光情報が伝えられる。最近明らかになった無脊椎動物スルメイカのロドプシンの構造と、脊椎動物ウシのロドプシンの構造を比較すると、ウシロドプシンの構造が光受容に高度に特化しているのとは対照的に、イカロドプシンでは他の一般のGPCRと共通した構造を持つと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、イカロドプシンのバソ反応中間体と光異性体イソロドプシンの構造を決定し、光反応サイクルの初期過程の様子を明らかにし、シグナリングに必須な構造変化を明らかにする。

### 3. 研究の方法

ロドプシン結晶に対し、低温下で光照射すると、全トランス型バソ中間体と11-cis型ロドプシンの他に9-cis型イソロドプシンが生成し、3状態の平衡状態となった。結晶に照射する光の波長によって3状態の平衡を制御し、バソ中間体およびイソロドプシンそれぞれの生成率が大きくなる条件を見出し、X線構造解析を行った。このとき、顕微分光法を用いてX線照射による損傷の影響を定量的に解析し、可能な限り損傷の影響を排除した構造解析を行った。

### 4. 研究成果

100Kで凍結したロドプシン結晶に対しさまざまな色の光を照射し吸収スペクトルを比較することで、各異性体について結晶中での生成率を見積もった(図1)。

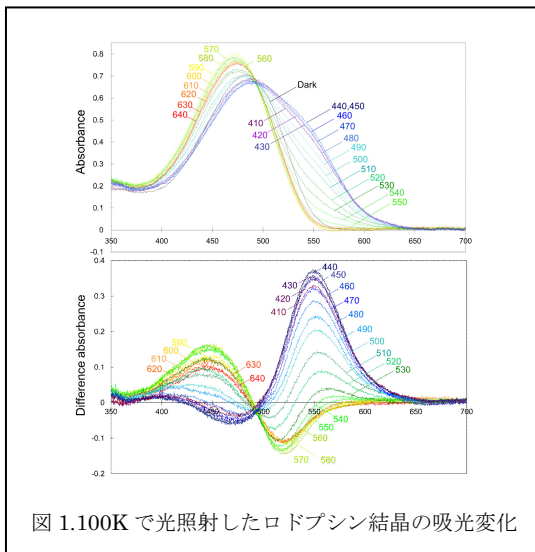


図 1.100K で光照射したロドプシン結晶の吸光変化

その結果、100Kでのロドプシン結晶中においては、11-cis型ロドプシン、全トランス型バソ中間体、9-cis型イソロドプシンの3状態の光平衡状態が成立していることが明らかとなった。

黄緑色光を照射してほぼ100%イソロドプシンが生成した結晶を用いて収取した回折データセットからイソロドプシンの結晶構造を求めた。イソロドプシンは9-cis型レチナールを含み、ポリエン鎖平面を暗順応状態と同じ膜面方向へと配向させた(図3)。さらに、青色光照射により約40%のロドプシンがバソ中間体に変換された結晶を用い、暗順応状態、イソロドプシンの構造に基づいて、バソ中間体の構造モデルを解析した。暗順応状態からバソ中間体へと遷移すると、レチナールはポリエン鎖平面を膜の法線方向へと回転させ、弓型にゆがんだ全トランス型へと変化した。ポリエン鎖は細胞質側へと大きく移動し、同時にレチナール近傍のアミノ酸残基が相補的に動いた。バソ中間体形成により吸収した光エネルギーがレチナールおよび近傍残基の構造歪みエネルギーへと蓄積されることを示した。

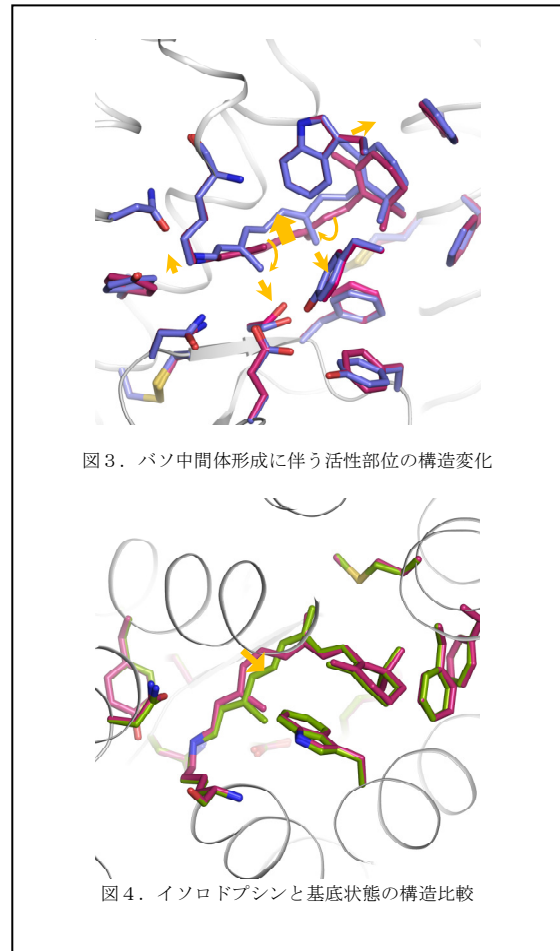


図 3. バソ中間体形成に伴う活性部位の構造変化

図 4. イソロドプシンと基底状態の構造比較

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5件)

- (1) Murakami M, Kouyama T, "Crystallographic analysis of the primary photochemical reaction of squid rhodopsin", *J. Mol. Biol.* 413, 615-627 (2011), 査読有
- (2) Kanada S, Takeguchi Y, Murakami M, Ihara K, Kouyama T, "Crystal structures of an O-Like blue form and an anion-free yellow form of pharaonis halorhodopsin", *J. Mol. Biol.* 413, 162-176 (2011), 査読有
- (3) 村上緑, "無脊椎動物のロドプシン研究", *生物物理* 50, 274-275 (2010), 査読有
- (4) Kouyama T, Murakami M, "Structural divergence and functional versatility of the rhodopsin superfamily", *Photochem Photobiol Sci.* 9, 1458-65 (2010), 査読有
- (5) Kouyama T, Kanada S, Takeguchi Y, Narusawa A, Murakami M, Ihara K, "Crystal structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*", *J. Mol. Biol.* 396, 564-579 (2010), 査読有

[学会発表] (計23件)

- (1) 村上緑, "X線結晶構造から観る無脊椎動物ロドプシンの光反応過程", 生命情報科学研究セミナー, 東京, 2012年3月22日
- (2) 中西太市, 金田創運, 井原邦夫, 村上緑, 神山勉, "ハロロドプシンの光誘起構造", 平成23年度日本生物物理学会中部支部講演会, 名古屋, 2012年3月19日
- (3) 水野克秀, 張進, 中村洋子, 村上緑, 神山勉, "タコロドプシンの結晶化", 平成23年度日本生物物理学会中部支部講演会, 名古屋, 2012年3月19日
- (4) 村上緑, 神山勉, "イカロドプシンルミ中間体の構造解析", 平成23年度日本生物物理学会中部支部講演会, 名古屋, 2012年3月19日
- (5) 張進, 山崎芳和, 樋掛正則, 村上緑, 井原邦夫, 神山勉, "バクテリオロドプシンのO中間体の結晶構造", 平成23年度日本生物物理学会中部支部講演会, 名古屋, 2012年3月19日
- (6) 村上緑, "イカロドプシンルミ中間体の結晶構造解析", 蛋白研セミナー「結晶学でみるタンパク質の化学と物理」, 大阪, 2012年3月6日-3月7日
- (7) 村上緑, 神山勉, "イカロドプシン光反応中間体の結晶構造解析", 平成23年度日本結晶学会年会, 札幌, 2011年11月24日-11月25日
- (8) 張進, 山崎芳和, 樋掛正則, 村上緑, 井原

邦夫, 神山勉, "バクテリオロドプシンのO中間体の結晶構造", 日本生物物理学会第49回年会, 姫路, 2011年9月16日-9月18日

(9) 中西太市, 金田創運, 村上緑, 井原邦夫, 神山勉, "ファラオニス・ハロロドプシンのアザイド結合型紫状態のM中間体の結晶構造", 日本生物物理学会第49回年会, 姫路, 2011年9月16日-9月18日

(10) 村上緑, 神山勉, "イカロドプシンルミ中間体のX線結晶構造解析", 日本生物物理学会第49回年会, 姫路, 2011年9月16日-9月18日

(11) 中西太市, 金田創運, 竹口優, 村上緑, 井原邦夫, 神山勉, "ハロロドプシンのアザイド結合の状態", 平成22年度生物物理学会中部支部講演会, 名古屋, 2011年3月30日-3月31日

(12) 張進, 山崎芳和, 樋掛正則, 村上緑, 井原邦夫, 神山勉, "バクテリオロドプシンのLeu93の役割に関するX線結晶構造解析", 平成22年度生物物理学会中部支部講演会, 名古屋, 2011年3月30日-3月31日

(13) 張進, 山崎芳和, 樋掛雅則, 村上緑, 井原邦夫, 神山勉, "バクテリオロドプシンのLeu93の役割に関するX線結晶構造解析", 日本生物物理学会第48回年会, 仙台, 2010年9月20日-9月22日

(14) 神山勉, 金田創運, 張進, 竹口優, 村上緑, 井原邦夫, "Natronomonas pharaonis由来の光駆動塩素イオンポンプ・ハロロドプシンのX線結晶構造解析", 日本生物物理学会第48回年会, 仙台, 2010年9月20日-9月22日

(15) 村上緑, 神山勉, "イカロドプシン光異性化反応産物のX線結晶構造解析", 日本生物物理学会第48回年会, 仙台, 2010年9月20日-9月22日

(16) M. Murakami and T. Kouyama, "X-ray crystallography of the primary photoreaction intermediate of squid rhodopsin", 14th International Conference on Retinal Proteins, Santa Cruz, 2010 August 2-6

(17) 村上緑, 神山勉, "イカロドプシン光異性化反応のX線結晶解析", 2009年度日本生物物理学会中部支部講演会, 岡崎, 2010年3月29-30日

(18) 村上緑, 神山勉, "イカロドプシン光反応初期中間体のX線結晶構造解析", 日本薬学会第130年回, 岡山, 2010年3月28-30日

(19) J. Zhang, S. Kanada, M. Tsuda, T. Iwasa, T. Gotoh, M. Murakami, T. Kouyama, "Crystallization of octopus rhodopsin v", 分子研研究会「拡がるロドプシンの仲間から“何がわかるか”“何をもたらすか”」, 岡崎, 2010年3月23-24日

(20) 村上緑, "イカロドプシンの光化学反応: バン中間体の構造解析から何がわかるか

”,分子研研究会「拡がるロドプシンの仲間から“何がわかるか”“何をもたらすか”」,岡崎,2010年3月23-24日

(21) M. Murakami, “X-ray analysis of the primary photochemical reaction of squid rhodopsin”, International Symposium “Fifty Years of Biophysics Research at Nagoya University”, Nagoya, 2010 March 12-14

(22) J. Zhang, S. Kanada, M. Tsuda, T. Iwasa, T. Gotoh, M. Murakami, T. Kouyama, “Crystallization of octopus rhodopsin”, International Symposium “Fifty Years of Biophysics Research at Nagoya University”, Nagoya, 2010 March 12-14

(23) 村上緑, “イカロドプシンの結晶構造解析—X線でレチナールの光異性化反応を見る—”, 生命情報科学研究セミナー, 東京, 2010年2月19日

## 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