

京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書

2022年 4月 20日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 理学研究科

職 名 准教授

氏 名 今 元 泰

助 成 の 種 類	令和元年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	光センサー蛋白質の光応答から紐とく非イメージ形成視覚の分子機構			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容				
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) Y. Imamoto et al., (2019) Conformational differences among metarhodopsin I, metarhodopsin II, and opsin probed by wide-angle X-ray scattering. J. Phys. Chem. B 123, 9134-9142. Y. Imamoto et al., (2020) Regulation of photocycle kinetics of photoactive yellow protein by modulating flexibility of the $\beta$ -turn. J. Phys. Chem. B 124, 1452-1459.			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		設備備品費	424,600	
		消耗品費	513,200	
旅費		62,200		
当財団の助成に つ い て	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) ご採択いただいたおかげで研究を継続することができました。深く感謝申し上げます。			

## 成果の概要／今元 泰

桿体視細胞に存在し、暗所視を担う光センサー蛋白質であるロドプシンは、微弱光の受容に最適化された光センサー蛋白質である。ロドプシンと類縁な光受容蛋白質はオプシン類とよばれ、いずれも共通の祖先蛋白質から分子進化して多様化し、動物のさまざまな光生理機能を担っている。オプシン類の中には、ロドプシンのほか、錐体視細胞で昼間視を担う錐体視物質や、さまざまな非視覚光受容(非イメージ形成視覚)に関わるオプシンがある。例えばメラノプシンは、網膜の一部の神経節細胞に存在し、概日時計の光同調や瞳の対光反射などを制御している典型的な非視覚オプシンである。ヒトのメラノプシンは、分子進化的には脊椎動物ロドプシンよりも無脊椎動物ロドプシンと近縁であり、脊椎動物のロドプシンとは活性化メカニズムが異なっていることが知られている。脊椎動物型オプシンと無脊椎動物型(非視覚型)オプシンの活性化メカニズムを比較解析し、細胞の光応答と関連付けることによって、光と生命の関わりを理解することができると考えられる。そこで本研究では、非視覚オプシン類へ研究を発展させるための基礎として、脊椎動物型ロドプシンの光活性化メカニズムを詳細に解析した。

オプシン類は、光刺激に応答して細胞内の G 蛋白質を活性化する G 蛋白質共役型受容体(GPCR)である。ロドプシンは可視光を受容するための発色団として 11 シス型レチナールと結合しており、光を吸収すると 11 シス型レチナールは全トランス型に異性化する。全トランス型レチナールはアゴニストとして機能し、ロドプシンを G 蛋白質を活性化する状態(メタロドプシン II)に変化させる。この構造ではヘリックス配置が大きく変化することが、結晶構造解析をはじめとしたさまざまな研究から示されている。脊椎動物ロドプシンの場合、メタロドプシン II から全トランス型レチナールが解離した状態(オプシン)に変化することで不活性化する。GPCR では、一般に活性構造と不活性構造の平衡状態にあり、リガンドのはたらきによって平衡がどちらかにシフトすることで活性を制御すると考えられている(二状態モデル)。このモデルに従うと、ロドプシン分子は、リガンドが結合していないオプシン状態では構造の平衡が不活性構造に、アゴニストが結合したメタロドプシン II では活性構造にシフトすると考えられる。すなわちメタロドプシン II では活性構造が安定なのに対してオプシンでは活性構造が不安定な要因が、ロドプシンの活性化メカニズムの本質となると考えられる。そこで本研究では、両者の構造の比較から活性構造の安定化メカニズム検討した。

細胞内に近い条件での構造変化を解析するため、ウシロドプシンを水溶性の生体膜断片であるナノディスクに組み込んだ。この試料を用いて、SPring-8 の放射光施設で X 線散乱測定を行なった。従来の X 線散乱測定では、原点に近い小角 X 線散乱測定が主であった。この領域では散乱強度が高く、X 線ダメージの影響を受けにくい、分解能が低いため、分子の大きさや大まかな形状しか解析することができなかった。一方われわれは、散乱角が大きい領域(実空間で数 10~数 Å)の散乱強度を測定する広角 X 線散乱測定をロドプシンの構造変化の解析に応用することを試みてきた [1]。この領域は散乱強度が低い GPCR のヘリックス間距離に対応し、ヘリックス配置の変化による活性化を検出するために好適な手法である。本研究ではこの手法を用いて、メタロドプシン II とオプシンの構造を比較した [2]。

まず、ウシロドプシンを pH 6 で光照射し、照射前後の散乱カーブの変化(差散乱カーブ)を測定した(図 1 右、黄色カーブ)。この差散乱カーブでは、 $0.2 \text{ \AA}^{-1}$  に正のピーク、 $0.6 \text{ \AA}^{-1}$  にブロードな負のピークが見られた。pH 6 ではメタロドプシン II が生成するので、この差散乱カーブは暗状態とメタロドプシン II の構造変化に由来すると考えられる。暗状態とメタロドプシン II の結晶構造が報告されているので、この構造から

差散乱カーブを計算すると(図 1 矢印①)、実験データとよく一致したので、結晶構造と同様の構造変化が生体膜中でも起きていると考えられた。

発色団と蛋白質の間のシッフ塩基結合を切断する試薬であるヒドロキシルアミン存在下でロドプシンを光照射すると、発色団が解離してオプシンが生成する。このとき、酸性条件(pH 4.0)では活性構造と不活性構造の平衡が活性構造にシフトする。このようにして生成した活性構造オプシンの結晶構造が報告されているが、この構造はメタロドプシン II とほぼ同じであり、活性構造の安定性の違いを説明することはできなかった。そこで生体膜中での暗状態から活性構造オプシンへの構造変化に由来する差散乱カーブを測定した(図 1 右、白色カーブ)。その結果、 $0.2 \text{ \AA}^{-1}$ の正のピークはメタロドプシン II と同様であったが、 $0.6 \text{ \AA}^{-1}$ の負のピークが消失しており、結晶構造とは違った結果になった。この違いを暗状態とメタロドプシン II の結晶構造を組み合わせたモデル構造を用いて再現することを試みたところ、メタロドプシン II 構造のヘリックス III と V の細胞質側を暗状態に戻した構造が、実験で得られた差散乱カーブをよく再現することがわかった(図 1 矢印②)。

ヘリックス III と V の細胞質側の領域の近傍には、E(D)RY 配列、構成的活性化変異部位、構成的不活性化変異部位など、GPCR の活性制御に関わるアミノ酸残基が存在している。リガンドの解離によってこの付近のヘリックス配置が変化することが、オプシンの不活性化の要因であると考えられた。

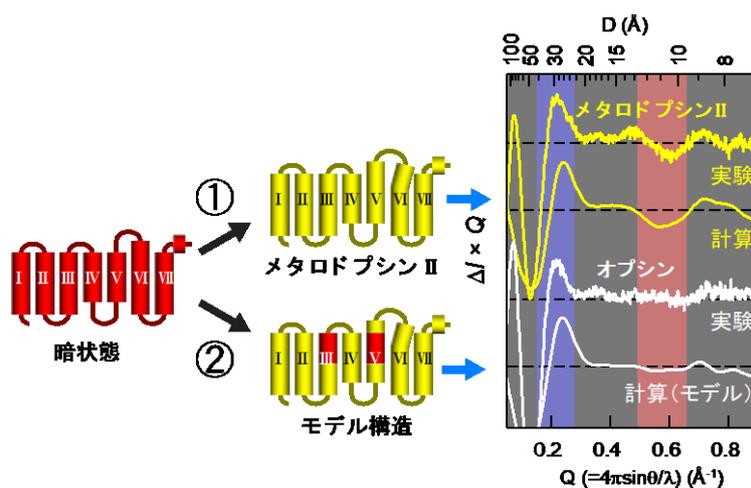


図 1:ロドプシンの光活性化による構造変化を广角 X 線散乱測定により解析した。実験で得られた散乱カーブの変化(差散乱カーブ)(右)を比較すると、G 蛋白質活性化能をもつメタロドプシン II(黄色)とリガンドが解離したオプシン状態(白)とでは、 $Q = 0.6 \text{ \AA}^{-1}$  付近に相違が見られた。暗状態からメタロドプシン II への差散乱カーブは、ロドプシンの暗状態とメタロドプシン II の結晶構造から計算したモデルカーブ(矢印①)と一致した。一方、暗状態からオプシンへの差散乱カーブは、メタロドプシン II の結晶構造からヘリックス III と V の一部を暗状態の構造に戻した構造で再現された(矢印②)。

## 参考文献

1. Imamoto, Y., Kojima, K., Oka, T., Maeda, R., and Shichida, Y. (2015) Helical rearrangement of photoactivated rhodopsin in monomeric and dimeric forms probed by high-angle X-ray scattering. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 1965-1973.
2. Imamoto, Y., Kojima, K., Oka, T., Maeda, R., and Shichida, Y. (2019) Conformational differences among metarhodopsin I, metarhodopsin II, and opsin probed by wide-angle X-ray scattering. *J. Phys. Chem. B* **123**, 9134-9142.