

量子技術を適用した生命科学基盤の創出
2019年度採択研究者

2020年度 実績報告書

片山 耕大

名古屋工業大学 大学院工学研究科
テニュアトラック助教

構造基盤に立脚した色認識機構および色覚情報伝達機構の解明

§ 1. 研究成果の概要

本研究では、色覚視物質の X 線による 3D 構造を決定し、波長制御機構を明らかにすること、そして赤外分光計測法により光反応過程の構造変化を明らかにすることを目指している。

今年度は、アミノ酸点変異によって熱安定化した変異型緑視物質に対し、結晶成長を促進するために第三細胞内ループに親水性タンパク質 BRIL を挿入したいくつかのコンストラクトを作製した。そして、昆虫細胞により良好な発現が確認できた 4 種類のコンストラクトを対象として、His タグ精製、1D4 抗体精製を経て収量、純度の高かったコンストラクトを用いて LCP 法による結晶化を試みた。今後、結晶化スクリーニング条件を増やし、良質な結晶取得を目指す。

また、色覚視物質のクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行うための準備実験を開始した。暗室下で電顕測定用のグリッドを作製するための技術習得に向け、微生物ロドプシンの一つを対象として明条件下でグリッド作製を試み、200 kV のクライオ電子顕微鏡を用いて測定を行った。その結果、2D 画像解析までの段階で微生物ロドプシンの 5 量体構造が観測された。今後、暗条件下でのグリッド作製技術を習得し、色覚視物質への適用を目指す。

一方、昨年度赤外分光測定に成功した、緑視物質の活性中間体メタ II の結果から、これまで色覚、明暗、異なる機能に関わるアミノ酸として重要視されてこなかったアミノ酸を特定した（色覚視物質:102 番目、ロドプシン:86 番目）。今年度は両視物質間においてこのアミノ酸の相互転換変異体を作製し、赤外分光、紫外可視分光、蛍光分光測定を行った。ロドプシンの変異体では、緑視物質と同様のカルボン酸のプロトン化/脱プロトン化反応変化が観測された他方、 α ヘリックスの構造変化には違いが生じた。今後、継続して部位特異的な変異体に対する一連の分光測定を駆使することで、両者の構造ダイナミクスの違いを明らかにしていく。

さらに、青視物質に対する低温紫外可視吸収分光測定、および赤外分光測定を行い、163 K においてロドプシンや緑・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。得られた BL 中間体の赤外差スペクトルの結果、レチナールの光異性化直後に観測されていたねじれ構造が緩和することが分かった。また、視物質における 100 K 以上の温度で観測される中間体は、一般的に熱や光エネルギーによって始状態に戻らず退色反応を示すが、今回観測された青視物質の BL 中間体は二光子吸収により始状態に戻る、光可逆性（フォトクロミズム）を示すことも分かった。今後、同位体標識試料や変異体、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。尚本研究成果は Biophysics and Physicobiology へ発表した^[1]。

【代表的な原著論文情報】

[1] Hanai, S.; Katayama, K.; Imai, H.; Kandori, H. “Light-induced difference FTIR spectroscopy of primate blue-sensitive visual pigment at 163 K” *Biophys. Physicobiol.* 2021, 18, 40-49.