

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

2021年度 年次報告書

片山 耕大

名古屋工業大学大学院工学研究科
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、昨年度に引き続き、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。特に今年度は、挿入させる BRIL にも改変を加えた。さらに、AI システムを駆使したタンパク質の構造予測ツール AlphaFold2 を利用して、作製したコンストラクトのモデル構造を作製した。そして自由度が低く、構造揺らぎが少ないことが予測されたコンストラクト 2 つに対し、昆虫細胞 Sf9 を用いて大量発現させた。また、高純度かつ高収率の標的タンパク質の獲得を目指して、精製方法を改善した。2 段階の His タグ精製とゲル濾過精製を組み合わせることで、精製度の向上および単分散性の評価を同時に行えるように確立した。得られた最終精製標品を LCP 法により結晶化を実施し、第二次高調波発生 (SHG) 搭載の顕微鏡 (SONICC) による結晶観察を実施した。その結果、標的タンパク質由来と思われる結晶が観察された。今後は結晶化条件の絞り込みを行い、良質な結晶取得、続く X 線回折測定へと研究を推進させる。

一方、暗室下での色覚視物質のクライオ電子顕微鏡による単粒子解析実施に向けた予備実験を行った。電顕測定用のグリッド作製および単粒子画像解析技術の習得に向けて、微生物ロドプシンの一つを対象とした構造解析を行った。また、標的タンパク質の粒子サイズを大きくすることで画像解析を容易にし、高分解能の構造解析を実現させるため、色覚視物質に特異的に抗体フラグメントが結合できるようなコンストラクトをいくつか作製した。今後、暗室下での色覚視物質のグリッド作製を試みる。