

研究終了報告書

「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」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：片山 耕大

1. 研究のねらい

ヒトの色認識における波長制御は、レチナールと蛋白質場との特異かつ精密な相互作用によって実現される。ヒトは光の三原色 (RGB) に応答する3種類 (青・緑・赤) の色覚視物質を有するが、いずれも同一の発色団として11シスレチナールを用いて異なる波長の光吸収を実現している。これはレチナールの励起状態でのエネルギー準位の制御、といった蛋白質環境が量子効果を巧みに操っていることを示している。さらに、色覚視物質の機能発現において光情報変換も重要な役割の一つである。視物質はG蛋白質共役型受容体 (GPCR) ファミリーに属しており、レチナールの異性化反応が蛋白質の構造変化を誘起させ、細胞質内でのG蛋白質との相互作用によって情報が伝達され、光反応が完了する。ヒトの明暗視を担う光受容蛋白質、ロドプシンにおける光吸収・情報伝達過程に関しては、分光学的・生化学的、さらにX線や赤外線を含む構造生物学的手段を駆使することで、ロドプシンが発現する桿体視細胞から視神経を介して電気スパイクとして脳に伝える一連の複雑で精緻な視覚反応を支えるロドプシンの役割が原子・分子レベルで理解されてきた。一方、ヒトの色覚を支える色覚視物質については、主に試料調製が困難なことから、構造研究は皆無であった。

本研究では、(1) 色覚視物質の暗状態での高分解能X線結晶構造解析を実現し、低温赤外分光測定法を駆使した構造解析と組み合わせることで色覚視物質がもたらす波長制御機構の基本原理の確立に向けた構造解析を完了させる。さらに(2) 室温条件下での時間分解赤外分光測定に波長可変赤外量子カスケードレーザー (QCL) を導入することで、光反応に伴う色覚視物質の動的構造変化によって生成する中間体の構造情報を捉え、光情報伝達機構の解明を目指す。色覚視物質の構造決定に成功した際には、レチナール結合ポケットの精緻な構造情報をもとに理論科学者と協力することで、波長制御機構の基本原理を確立する。また、(2) において色覚視物質の動的構造変化を完全に理解することで、創薬への展開を目指すGPCR情報伝達機構研究に新たな知見を与えることができると期待する。そして(1)(2)から得られる色覚視物質の静的および動的構造情報をもとに、色覚異常の治療に向けたレチナール誘導型新規化合物の探索・開発への貢献を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

色覚視物質の機能発現 (波長制御・情報伝達) における光反応過程を理解するためには、(1)量子化学に支配される発色団の励起状態のエネルギー準位を決定し、(2)ニュートン力学で記述可能な動的構造変化を明らかにする必要がある。本研究は、X線結晶構造解析により色覚視物質の原子座標を決定し、発色団と蛋白質場との相互作用を原子レベルで「観る」。

さらに赤外分光解析により光反応中間体の構造変化をリアルタイムに追駆する。

(1) 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、結晶成長を促進させるために、第三細胞内ループに親水性蛋白質 BRIL を挿入したいくつかのコンストラクトを作製した。さらに AI システムを駆使した蛋白質の構造予測ツールを利用して、コンストラクトの最適化を行った。最終的に、昆虫細胞による発現・精製・熱安定性・単分散性の良好な 2 種類のコンストラクトに対し、脂質キュービック相法 (LCP 法) による結晶化を実施した。また、暗赤色灯下での結晶観察は、第二次高調波発生 (SHG) 搭載の顕微鏡 (SONICC) を用いた。その結果、標的蛋白質由来と考えられる微結晶が観察された。今後は結晶化条件の絞り込みを行い、X 線回折測定へと研究を推進させる。一方、熱安定化変異且つ BRIL 挿入型緑視物質改変体に対し、暗赤色灯下にて低温電子顕微鏡 CryoEM による単粒子構造解析に向けたグリッドを作製し測定を行った結果、良好な 2 次元画像を得ることに成功した。2 次元画像から 3 次元構造モデルを構築した結果、高分解能の構造決定への道筋を示すことができた。

(2) 色覚視物質に対する量子カスケードレーザー (QCL) による時間分解赤外分光解析に先立って、低温光誘起赤外分光測定により光反応過程で生成する全ての中間体のスペクトル測定の獲得に取り組んだ。その結果、緑視物質における光反応初期中間体から活性中間体までの計 4 種類の中間体のスペクトル、青視物質では 3 種類の中間体のスペクトル測定に成功した。今後は部位特異的変異体に対する同様のスペクトル測定を行い、バンド帰属を実現することで、スペクトル基盤に立脚して光情報伝達機構の理解を深めるとともに、QCL による時間分光測定へと研究を展開する。

(2) 詳細

本研究では構造基盤に立脚した色覚視物質の波長制御および光情報伝達機構を解明することを目的とする。そして静的・動的構造情報を基に色覚異常の治療に向けた新規化合物の探索・開発を目指す。具体的には、色覚視物質の高分解能 X 線結晶構造解析を実現し、色覚視物質がもたらす波長制御機構を解明する。さらに FTIR 分光法によって光反応過程の構造解析を実行し、各反応過程の赤外吸収スペクトルの変化から得られるダイナミックな構造変化を捉える。さきかけ研究期間に実施し得た研究成果について以下に記述する。

1-1 緑視物質の X 線結晶構造解析

色覚視物質の X 線結晶構造解析の実現に向けて、アミノ酸の点変異によって熱安定化した変異型緑視物質の第三細胞内ループ (ICL3) を水溶性蛋白質である BRIL に置き換えた改変型緑視物質をいくつか作製した。さらに、AI システムを駆使した蛋白質の構造予測ツール AlphaFold2 を利用して、作製した種々のコンストラクトのモデル構造を構築し、BRIL 挿入位置の最適化を図った。そして、昆虫細胞 Sf9 による発現・精製・熱安定

Construct name	insertion	notes
MG1	None	Tried crystallization
MG2	A-1 BRIL	purification
MG3	A-2 BRIL	purification
MG4	A-3 BRIL	Making virus
MG5	B-1 BRIL	-
MG6	B-2 BRIL	No express

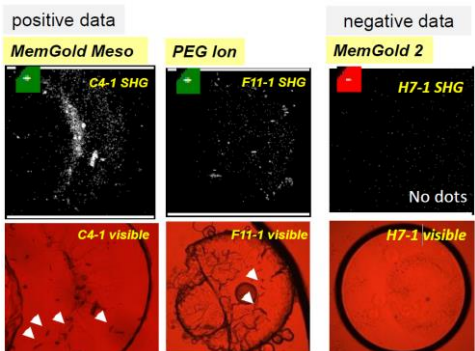


図12. 各種BRIL挿入位置を要しSHG変異型緑視物質の可視光観察クト

性・単分散性の良好な2種類のコンストラクト(図1, MG18とMG19)に対し、脂質キュービック相法(LCP法)による結晶化を実施した。また、結晶観察には、LCP結晶ドロップ内のキラリ結晶を精度よく検出できる第二次高調波発生(SHG)を搭載した顕微鏡SONICCを使用し結晶観察を行った結果、MG18由来と考えられる微結晶が観察された(図2)。今後は、LCP化させる際の蛋白質濃度を増加(30~50 mg/mLまで)させて再度LCP結晶化を試みることで、良質な結晶取得を目指す。

1-2 緑視物質のCryoEM単粒子構造解析

近年、クライオ電子顕微鏡(CryoEM)の目覚ましい技術発展によって、これまで構造解析が困難であった蛋白質の原子分解能での構造解析が実現されてきている。そこで、緑視物質に対するCryoEM単粒子構造解析に取り組んだ。CryoEM構造解析の実現には、標的蛋白質の分子量が理論上100 kDa前後は必要となる。私は、大きく2種類のコンストラクトに対し構造解析を実施した。一つ目は、BRIL挿入型緑視物質改変体とBRILを特異的に認識する抗体フラグメント(antiBRIL-Fab)との複合体構造解析、もう一つが緑視物質のICL3を別のGPCR(オピオイド受容体(KOR))に置き換え、KORのICL3を特異的に認識する抗体フラグメント(Nb6)との複合体構造解析である。BRIL挿入型緑視物質改変体は、X線結晶構造解析でも使用したMG18およびMG19を対象とし、また、緑視物質と

KORとのキメラ受容体のコンストラクトは図3のように6種類設計した。今回、antiBRIL-FabおよびNb6との複合体形成の有無は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により検証した。その結果、MG18およびMG19はいずれもantiBRIL-Fabと複合体を形成することが確認できた(図4左)。また、緑視物質キメラ受容体については、発現・精製まで行ったMG20~MG23に対するNb6との複合体形成実験を行い、MG23がNb6と良好な複合体を形成することが分かった(図4右)。

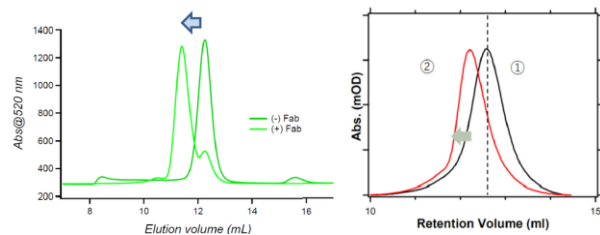


図4. (左) MG19-antiBRIL-FabのSECの結果 (右) MG23-Nb6のSECの結果

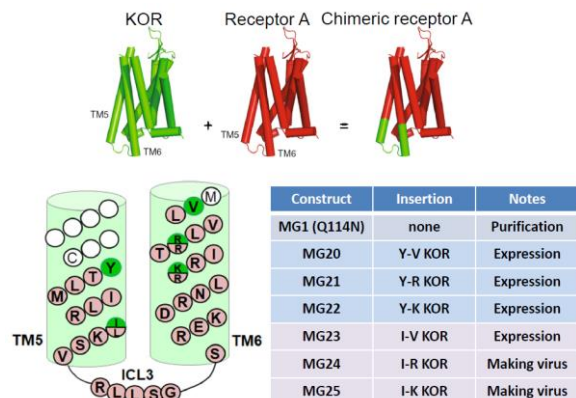


図3. MG1とKORのICL3挿入コンストラクト

MG19 および MG23 がそれぞれ antiBRIL-Fab、Nb6 と複合体を形成することが分かったため、Sf9 による大量培養・精製を行い、MG19 と antiBRIL-Fab との複合体は 15 mg/mL、MG23 と Nb6 との複合体は 5 mg/mL に調製した試料を用いて、暗赤色灯下にてグリッド作製を行った (図 5)。そして、Glacios 2 (200 keV) を用いて測定を行った結果、いずれの複合体も良好な単粒子画像を得ることができた。それぞれおよそ 4000 ムービーから自動で 300 万から 600 万粒子をコンピューターソフト上で拾い、2D classification を行った結果、150 万程度の 2 次元粒子画像を得た (図 6)。切り出した単粒子画像から 3D classification を実施し、5~10 万程度の粒子像からなる MG19-antiBRIL-Fab および MG23-Nb6 複合体の 3 次元構造モデルを取得することができた (図 6)。尚、それぞれの分解能は 9.6 Å と 6.9 Å であった。MG19 と antiBRIL-Fab との複合体の分解能が上がらなかった原因として、BRIL の挿入位置が最適化でないことで、antiBRIL-Fab が固定されなかったことが考えられる。今後は、他の BRIL 改変体を用いて構造解析に取り組む。一方、MG23-Nb6 はグリッド作製時の蛋白質濃度が薄かったことで粒子数が少なく、分解能が上がらなかったことが考えられる。今後は 10~20 mg/mL まで濃度を上げて再度構造解析を試みる。

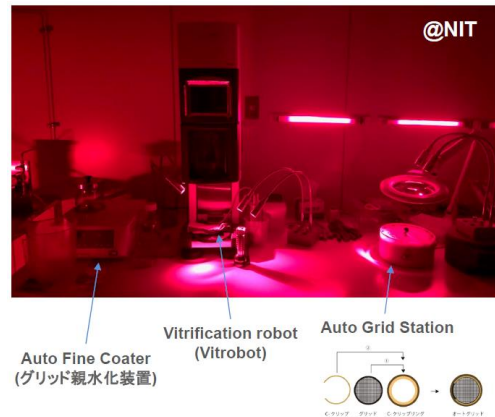


図 5. 暗赤色灯下でのグリッド作製部屋

2. 色覚視物質の低温光誘起赤外分光解析

3 種 (青・緑・赤) 色覚視物質の波長可変赤外 QCL を用いた時間分解赤外分光解析に先立って、低温光誘起赤外分光解析により、色覚視物質の光吸収反応過程で生成する全ての中間体のスペクトル

測定の実現に取り組んだ。Sf9 により発現・精製・脂質再構成まで行った緑視物質に対し、低温紫外可視分光測定 (UV-vis 分光測定) と液体窒素による温度制御、さらに光照射条件の最適化を行い、各中間体が蓄積する条件を確立した後、赤外分光測定を実施した。その結果、200 K での光照射により初期中間体バソの次に生成するルミ中間体のスペクトル測定に成功した (図 7)。バソ中間体のスペクトルと比較した結果、レチナールのねじれの緩和に伴う、 α -ヘリックスの大きな構造変化やプロトン化カルボン酸、そして内部結合水の水素結合変化を観

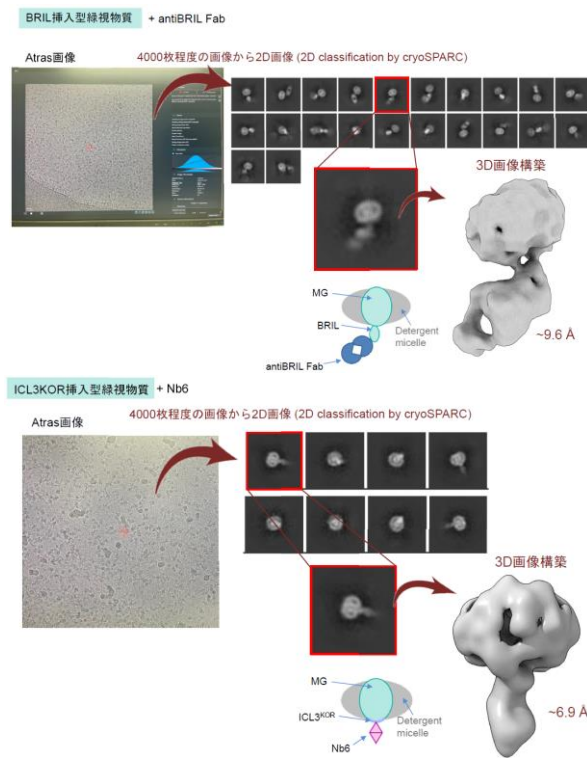


図 6. (上) MG19-antiBRIL-Fab 単粒子構造解析。(下) MG23-Nb6 単粒子構造解析

測することができた。さらに、カルボン酸の変異体測定を行うことで、プロトン化カルボン酸の振動バンドの帰属に成功、興味深いことに、帰属したカルボン酸はロドプシン（明暗視を担う視物質）には保存されておらず、色覚視物質に特異的な活性化経路の存在を示唆した。

一方、全反射赤外分光装置に光照射ユニットを取り付けた測定系を構築することで、活性中間体メタ II の高精度スペクトル測定を実現した（図 7）。さらに、同測定系によりメタ II 中間体と G 蛋白質との複合体の構造解析も実現した。GPCR は共通して、リガンド結合により活性化すると膜貫通ヘリックス 6 番目が大きく傾くことが知られている。またロドプシンのメタ II 中間体の赤外差スペクトルには大きなアミド I バンド（ α -ヘリックスの C=O 伸縮振動）が観測され、このバンドがヘリックス 6 の構造変化に対応することが示唆されている。今回、緑視物質のメタ II 中間体のスペクトルにも大きなアミド I バンドが観測されたが、ロドプシンとは異なる形状、振動数を与えた。また、ルミ中間体において観測されたプロトン化カルボン酸（Glu102）がメタ II 中間体形成に伴い脱プロトン化する変化を捉えた。これらの結果は、ロドプシンとは異なる活性化機構の存在を示している。

青視物質に対しても同様の方法により、163 K で BL 中間体、223 K でルミ中間体のスペクトルを取得することができた。興味深いことに、BL 中間体はロドプシンや緑視物質では観測されておらず、青視物質に特異的な光反応ダイナミクスの存在が示唆された。さらに興味深い点は、これまでロドプシンを含めた視物質は 77 K で生成するバソ中間体のみ可逆的な光反応（フォトクロミズム）を示し、後続する中間体はフォトクロミックな光反応特性を示さないと考えられてきた。しかし、今回観測したバソ以降の 2 種類の間mediateはフォトクロミズムを示すことが明らかになった（図 8）。これは、とりわけ青視物質におけるレチナール周辺のタンパク質環境や構造ダイナミクスが他の視物質とは異なることを示唆している。また、ルミ中間体の形成には、レチナールシッフ塩基の脱プロトン化反応が伴うことも明らかにした。今後、青視物質が示す特異的な光反応ダイナミクスの理解を深めるため、後続するメタ I、メタ II 中間体のスペクトル測定、さらに QCL を用いた時間分解赤外分光測定を実行する。尚、緑視物質の赤外分光測定

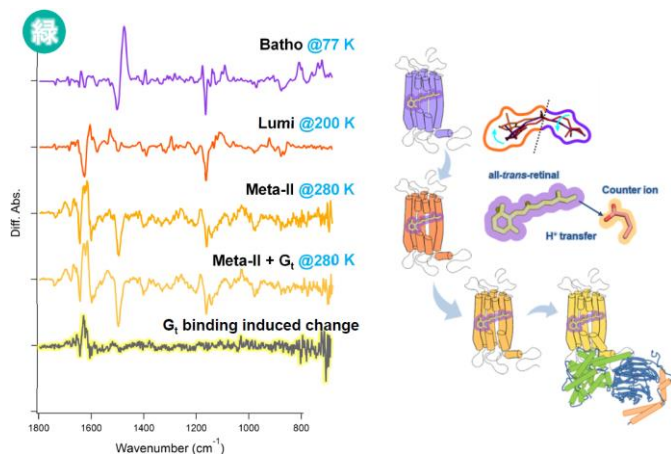


図 7. 低温光誘起赤外分光解析により捉えた緑視物質の光反応ダイナミクス

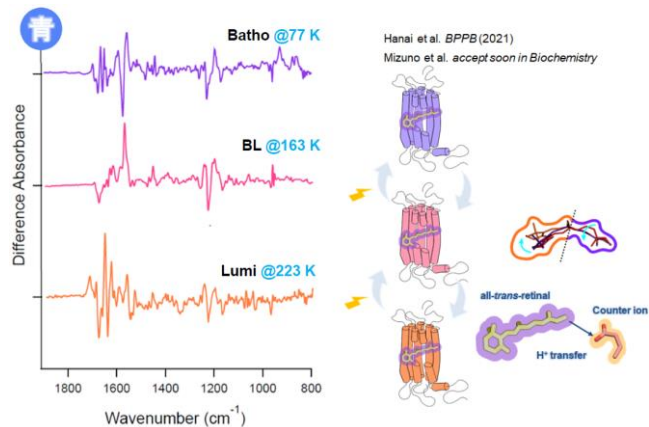


図 8. 低温光誘起赤外分光解析により捉えた青視物質の光反応ダイナミクス

の成果は現在論文を作成しており、また青視物質の成果は 2 報の論文 (S. Hanai, K. Katayama, H. Imai, H. Kandori *BPPB*, 2021 (第 2 著者), Y. Mizuno, K. Katayama, H. Imai, H. Kandori *Biochemistry*, 2022 (共責任著者、第 2 著者)) として発表することができた。

このように、私は本さがけ研究期間に、ヒトの「色覚」を担う光受容タンパク質の作動メカニズム解明に向けた構造機能相関解析を行ってきたが、色覚視物質を含めた動物ロドプシンの進化起源に迫る構造基盤を明らかにするための構造解析を並行して行い、無脊椎動物であるクモロドプシンの双安定型光反応特性を支える構造的要因を赤外分光により明らかにした。さらに、原始的な無脊椎動物であるハコクラゲが持つロドプシン (クラゲロドプシン) の光反応特性を調べることで、クラゲロドプシンの光吸収・反応特性が哺乳類などの脊椎動物と類似していることを明らかにした。そして、クラゲロドプシンが示す、脊椎動物ロドプシンと類似の光反応特性は、光吸収・反応機能に重要なアミノ酸残基の特異な位置によるものであることを、赤外分光と AI を活用した構造解析から明らかにした。これらの研究により、ヒトを含めた動物に視覚機能をもたらす、最初の機能性タンパク質であるロドプシンの進化の謎に迫る新たな知見を得ることができた。尚、クモロドプシン及びクラゲロドプシンの成果は 2 報の論文 (S. Hanai, T. Nagai, K. Katayama, S. Inukai, M. Koyanagi, K. Inoue, A. Terakita, H. Kandori *Biochemistry*, 2023 (第 3 著者), S. Inukai, K. Katayama, M. Koyanagi, A. Terakita, H. Kandori *JBC*, 2023 (共責任著者、第 2 著者、JST との共同プレスリリース発表 (2023 年 5 月 26 日付))) として発表することができた。

3. 今後の展開

構造基盤に立脚した色覚視物質の波長制御および光情報伝達機構を解明するため、色覚視物質の高分解能構造解析の実現および光吸収反応過程での色覚視物質の光反応ダイナミクスを実時間で捉える必要がある。さがけ研究を通して、X 線結晶構造解析に向けて熱安定化変異および BRIL 挿入型改変体をいくつか作製、さらに精製条件を確立したことで、収量・精製度・単分散性の良好な試料を再現性良く獲得することに成功した。これにより、現在までに X 線結晶構造解析は達成できていないが、CryoEM 単粒子構造解析への適用により、緑視物質改変体と抗体フラグメントとの複合体の低分解能 3 次元構造モデルを得ることに成功した。この成果は、2000 年に GPCR として初めて明暗視を担うロドプシンの構造決定が実現して以降、多くの構造生物学者が挑み続けた色覚視物質の構造解析が大きく前進したことを示している。さらに、暗赤色灯下での CryoEM 単粒子構造解析を実現できれば、中間体の構造解析への展開や、他の光受容蛋白質の中間体構造解析への応用も期待でき、オプトジェネティクスツール開発への貢献も期待できる。

一方、色覚視物質の低温光誘起赤外分光解析により、光反応過程で生成する中間体のスペクトルを捉えることに成功した。これにより、低温下で中間体をトラップすることで得たスナップショットの構造変化であるが、緑視物質ならびに青視物質において、光反応過程で重要なアミノ酸の構造変化を抽出しており、今後 QCL を用いた実時間でのこれら蛋白質内部の構造変化を追跡することで、異なる波長の光吸収信号がどのようにして細胞内に伝達されていくのか、光情報伝達機構の詳細が明らかにできる。

4. 自己評価

私は色認識機構に深い興味を抱き、2008 年から一貫して色覚視物質の構造解析を行ってきた。試料調製が困難であることや、熱安定性が低い問題から色覚視物質の構造生物学的研究が全く行われていなかった現状下、低温光誘起赤外分光法を活用することで、世界に先駆けて波長制御に重要な構造要因を明らかにしてきた。一方で、波長制御および光情報伝達に関する分子機構を完全に理解するためには、色覚視物質の電子構造が必要不可欠と考え、3 年半本さきがけ研究に取り組んできた。すでに、さきがけ研究開始当初に構造解析のボトルネックである熱安定性を向上させるアミノ酸変異を発見していたことや、GPCR 全般において水溶性蛋白質を融合したコンストラクトに対する LCP 法を用いた結晶構造解析の技術が確立していたこともあり、色覚視物質の構造決定は夢物語ではないと期待していたが、現状実現には至っていない。その大きな要因として、水溶性蛋白質 BRIL の挿入位置の検討が、すでに構造決定がなされている他の GPCR と比較して圧倒的に少ない点が挙げられる。今回、20 種類程度の異なる挿入位置のコンストラクトを作製してきたが、成功例によっては 100 種類を超えるコンストラクトが試されており、構造決定に向けてさらなる挿入位置の検討が必要と考える。一方で、結晶構造解析に取り組む過程で、発現・精製方法を確立したことで、スムーズに CryoEM 単粒子構造解析に移行できた点は高く評価できる。すでに、低分解能ではあるが、色覚視物質の 3 次元構造モデルを構築するところまで到達できており、今後、さらなるグリッド作製での条件検討を重ねることで、構造決定の実現を目指す。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:17件

<p>1. <u>Kota Katayama</u>, Kohei Suzuki, Ryoji Suno, Ryoji Kise, Hirokazu Tsujimoto, So Iwata, Asuka Inoue, Takuya Kobayashi, Hideki Kandori (共責任著者・第一著者) “Vibrational spectroscopy analysis of ligand efficacy in human M₂ muscarinic acetylcholine receptor (M₂R)” <i>Commun. Biol.</i> Vol. 4 pp.1-12 (2021.11) (査読有)</p>
<p>独自に開発した全反射赤外分光法と 2 液交換系を組み合わせた測定手法を用いて、GPCR の一つ、ムスカリン性アセチルコリン受容体 M₂R に対する、異なるリガンド効能 (efficacy) を有する各種リガンド結合に伴う構造変化を捉えることに成功した。その結果、得られた各種リガンド結合誘起赤外差スペクトルにおける、α-ヘリックスの C=O 伸縮振動バンドに対応するアミド-I バンドの変化が、各種リガンド間で分類できる可能性を見出した。</p>
<p>2. Yosuke Mizuno, <u>Kota Katayama</u>, Hiroo Imai, Hideki Kandori (共責任著者・第二著者) “Early proton transfer reaction in a primate blue-sensitive visual pigment” <i>Biochemistry</i> Vol. 61 pp.2698-2708 (2022) (査読有)</p>
<p>視物質に対する低温光誘起赤外分光解析により、223 K での光照射により、レチナールシッフ塩基の脱プロトン化に伴いルミ中間体が形成することを発見した。これまで、視物質の光反応の常識は、活性中間体メタ II で初めてレチナールシッフ塩基が脱プロトン化することが知られていたが、青視物質は光反応早期の段階で脱プロトン化する特異な光反応を示すことが分かった。</p>

3. Shino Inukai, Kota Katayama, Mitsumasa Koyanagi, Akihisa Terakita, Hideki Kandori
(共責任著者・第二著者)

“Investigating the mechanism of photoisomerization in jellyfish rhodopsin with the counterion at an atypical position” *J. Biol. Chem.* Vol. 299, pp. 104726 (2023) (査読有)

高度に発達した目をもつハコクラゲが、進化の過程でロドプシン(クラゲロドプシン)中の特異な位置にカウンターイオンを移動させた結果、脊椎動物ロドプシンとよく似た光反応特性を示すようになったことを明らかにした。そして、カウンターイオンの位置が異なる3種(クラゲ:原始的な無脊椎動物(刺胞動物)、ウシ:脊椎動物、イカ:発達した無脊椎動物(軟体動物))のロドプシンで比較解析を行うことにより、クラゲロドプシンが辿った分子進化を裏付ける構造変化情報を取得することに成功した。

(2)特許出願

研究期間全出願件数:0件(特許公開前のものも含む)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 第13回(2020年度)分子科学会奨励賞
2. 代表論文1の成果について1紙の新聞にて紹介
「振動分光法を駆使した薬剤効能測定法の開発 ~アセチルコリン受容体を標的とした神経疾患の治療薬開発への期待~」
3. 代表論文3の成果について、JSTとの共同プレスリリースを行い、1紙の新聞にて紹介
「哺乳類とクラゲの視覚機能を担うタンパク質の光センシング機能の類似性を解明 ~赤外分光とAIを駆使し、目の中で光を受容するタンパク質の進化を追う~」
4. ○Kota Katayama “Spectroscopic study of photoactivation dynamics of cone opsin”
19th International Conference on Retinal Proteins, Sapporo, Japan, October 30-November 4, 2022. (Invited talk)
5. ○Kota Katayama “Spectroscopic basis for elucidating spectral tuning mechanism of cone pigments”
Pacificchem2021, Online, December 17, 2021. (Invited talk)
6. ○Kota Katayama “Structural biological study based on spectroscopic analysis of cone pigment”
第15回分子科学討論会2021, Online, September 19, 2021. (Invited talk)