

講演題目・霊長類青感受性視物質の短波長シフトを実現する構造基盤

¹名工大院工, ²京大霊長研

○片山耕大¹, 野中祐貴¹, 筒井圭², 今井啓雄², 神取秀樹¹

Structural basis of primate blue-sensitive visual pigment achieving spectral blue-shift in λ_{\max}

○Kota Katayama¹, Yuki Nonaka¹, Kei Tsutsui², Hiroo Imai², Hideki Kandori¹

¹Department of Life Science and Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology, Japan

²Primate Research Institute, Kyoto University, Japan

【Abstract】

Protein-bound waters are essential for the structure and function of many membrane proteins. Our prior work focused on studying the primate green- (MG) and red- (MR) sensitive pigments using FTIR spectroscopy, which revealed protein-bound waters in both visual pigments. Although the internal waters are located in the vicinity of both the retinal Schiff base and β -ionone ring, only the latter showed differences between MG and MR, which suggests their role in color tuning. Here, we report FTIR spectra of primate blue-sensitive pigment (MB), which reveal the presence of internal waters that possess unique water vibrational signals that are reminiscent of a water cluster. These water signals are influenced by mutations at position Glu113 and Trp265 in Rh. Because Tyr265 is the key residue for achieving the spectral blue-shift in λ_{\max} of MB, we propose that these waters are responsible for the increase in polarity toward the retinal Schiff base, which leads to the localization of the positive charge in the Schiff base and consequently causes the blue-shift of λ_{\max} .

【序】我々の眼の中には青・緑・赤の「光の三原色」に対応した光センサータンパク質が存在する。これらは 11 シス型レチナルという全く同一の分子を使って異なる色の光を吸収しており (図 1)、タンパク質場との特異的な相互作用によって実現されると考えられている。しかしながら、1) 試料調製が困難、2) 限られた試料に対する構造解析手法が存在しない、3) 実験操作のすべてを暗室で行わないといけないことから X 線結晶構造解析を含め構造生物学的な研究は皆無であり、我々が色を見分けるという当たり前のことを、分子レベルで説明できなかったのである。そのような状況の中、我々は 10 年前に赤外分光法を用いたサル色覚視物質の構造研究を開始した。ヒトガン細胞を用いたタンパク質の大量発現と高精度低温赤外分光法を組み合わせることで、2010 年に初めて霊長類赤・緑センサータンパク質の構造解析に成功し、2012 年、2015 年の論文により我々が赤と緑を見分ける分子機構の解明に成功した[1-3]。

今回、我々は残る青センサータンパク質の赤外差スペクトル分光測定に成功し、青センサータンパク質が短波長の光を吸収する構造基盤を明らかにしたので報告する[4]。特に波長制御に

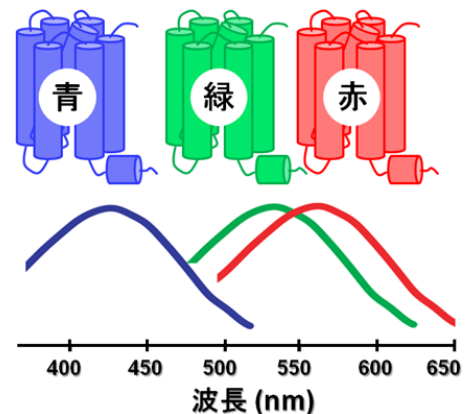


Fig. 1. UV-visible spectra of monkey red (λ_{\max} =563 nm), green (λ_{\max} =530 nm) and blue (λ_{\max} =417 nm).

重要なアミノ酸の変異タンパク質に対するスペクトルと比較することで、疎水的なレチナール近傍に複数の水分子が集合体を形成することを発見し、この水分子の集合体構造がもたらす極性が短波長シフトの一役を担っていると考えている。

【方法 (実験・理論)】 青センサータンパク質は、過去の文献によれば、赤・緑センサータンパク質よりも一桁近く発現量が少ないことが知られている。今回、我々は青センサータンパク質の構造解析に向けて霊長類間での種の選択を行い、3種類の色覚視物質を有するヒトとは異なり、2種類の色覚しかもたない夜行性のサルの1種であるマーモセット青センサータンパク質が多種と比較して発現量が多いことを発見した。そこで HEK293T 細胞株により大量発現を行い、さらに可溶化・精製条件の再検討を行うことで、赤外スペクトルを測定するのに十分量の精製試料を得ることに成功した。PC リポソームへ再構成後、30 μL を BaF₂ 製の赤外窓板に滴下し乾燥フィルムを作製した。D₂O、D₂¹⁸O で水和後、77 K での光照射前後の赤外差スペクトルを測定した。

【結果・考察】 得られた赤外差スペクトルは、赤・緑センサータンパク質および我々の明暗を認識するロドプシンとは大きく異なり、この結果からレチナールの分子構造やタンパク質の骨格構造に大きな違いがあることが分かった。さらに重水によって置換されるタンパク質内部の親水環境下に位置するアミノ酸や水分子の分子振動が現れる X-D 伸縮振動領域において、青センサータンパク質に特異的な内部結合水の信号が観測された。

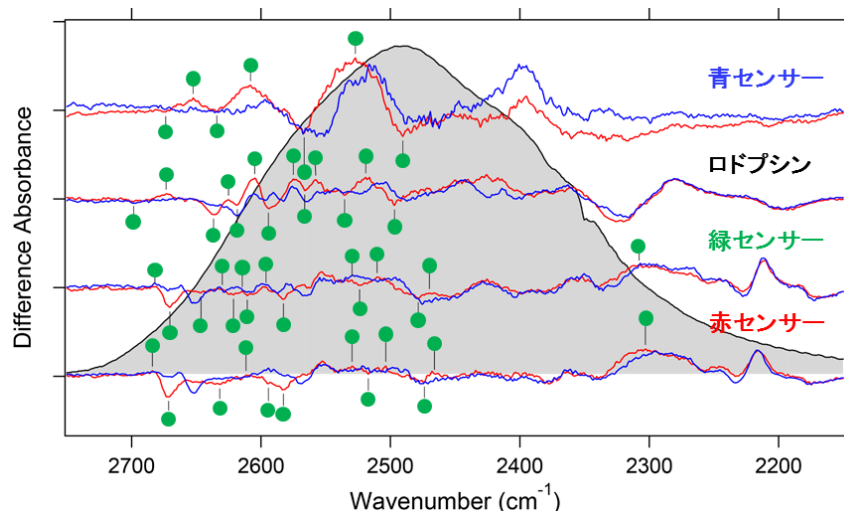


Fig. 2. Spectral comparison of the X-D stretching vibrations of MB, MRh, MG and MR at 77 K. Red and blue lines represent the spectra in D₂O and D₂¹⁸O, respectively, and green labeled frequencies correspond to those identified as water-stretching vibrations. The grey curve represents the O-D stretching vibration of D₂O.

なロドプシンの内部結合水解析においても観測されておらず、青センサータンパク質中において、疎水的なレチナール分子の近傍に複数の水分子が集合体を形成していると解釈した。さらに、青センサータンパク質における波長制御に重要な役割を及ぼす Glu113 と Tyr265 の部位特異的な変異タンパク質に対する測定でブロードな水の信号が減少したことから、水分子の集合体構造がレチナールのポリエーテル鎖上の π 電子の局在化を引き起こすことで青色光吸収をもたらすものと考えている。

【参考文献】

- [1] K. Katayama *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 891 (2010).
- [2] K. Katayama *et al.* *Biochemistry* **51**, 1126 (2012).
- [3] K. Katayama *et al.* *J. Phys. Chem. Lett.* **6**, 1130 (2015).
- [4] K. Katayama *et al.* *Sci. Rep.* **7**, 4904 (2017).

が観測された。赤・緑センサータンパク質には6~8個の水のO-D伸縮振動がシャープなピークとして観察されていたのに対し[2]、青センサータンパク質の場合、始状態(光照射前)には4個、レチナールの異性化中間体(光照射後)に3個と数は少なかったものの、2500 cm^{-1} 付近に半値幅が40 cm^{-1} を超えるブロードで強度の大きな水の振動バンドが観測された(図2)[4]。このようなバンドは、我々のグループが系統的に行ってきた様々