

脊椎動物がもつ新規光センサーOpn5L1の不活性化状態の発色団構造

¹ 阪大院理, ² 岡山大院医歯薬, ³ 京大院理, ⁴ 立命館大, ⁵ 神戸薬科大
 ○水野 操¹, 水谷 泰久¹, 佐藤 恵太², 大内 淑代², 山下 高廣³, 酒井 佳寿美³,
 今元 泰³, 七田 芳則^{3,4}, 山野 由美子⁵, 和田 昭盛⁵

Chromophore structure in an inactive state of a novel photosensor Opn5L1 of vertebrates

○Misao Mizuno¹, Yasuhisa Mizutani¹, Keita Sato², Hideyo Ohuchi², Takahiro Yamashita³, Kazumi Sakai³, Yasushi Imamoto³, Yoshinori Shichida^{3,4}, Yumiko Yamano⁵, Akimori Wada⁵
¹ Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, Japan
² Department of Cytology and Histology, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Japan
³ Department of Biophysics, Graduate School of Science, Kobe University, Japan
⁴ Research Organization for Science and Technology, Ritsumeikan University, Japan
⁵ Laboratory of Organic Chemistry for Life Science, Kobe Pharmaceutical University, Japan

【Abstract】

Opn5L1 is a newly identified vertebrate opsin that functions as a Gi-coupled retinal receptor. Unlike conventional opsins including visual pigments, it exclusively binds to all-*trans*-retinal to form an active state. Photoisomerization from the all-*trans* to the 11-*cis* structure deactivates the protein and is followed by formation of a covalent adduct between retinal and nearby cysteine, which provides an absorption band at 270 nm, resulting in thermal re-isomerization to the initial structure. Therefore, Opn5L1 acts as a reverse photoreceptor that loses its activity by light. In this study, we measured resonance Raman spectra of the covalent adduct of Opn5L1 to identify which position in the retinal is bound by cysteine. Based on both the measurements of spectra of isotope substitutes and quantum chemical calculations, we determined the unique structure of the retinal-cysteine adduct.

【序】

最近発見された Opn5L1 は、脊椎動物のオプシンの一種である。これまで発見されていた視覚オプシンを含む多くのオプシンとは異なり、11-シスレチナルとは結合せず、全トランスレチナルと結合して活性状態になるユニークさをもつ。基質であるレチナルは、発色団としても働く。レチナル発色団は光吸収により 11-シス体へ異性化し、Opn5L1 は不活性状態になる。その後、分子内のシステイン側鎖がレチナルに付加し、270 nm に吸収極大をもつ中間体（270 nm 付加体）に変化する。この中間体は、初期状態へ熱的に回復する。このことから、Opn5L1 は付加反応を利用し、11-シス体から全トランス体へ熱的に変化することが示唆されている (Fig. 1) [1]。本研究では、この付加反応を含む Opn5L1 の反応機構を明らかにするため、鍵となる 270 nm 付加体の共鳴ラマンスペクトルを観測した。同位体置換体のラマンスペクトル観測および量子化学計算に基づき、270 nm 付加体の構造を決定した。

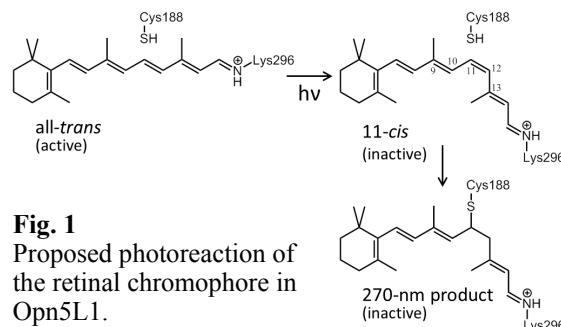


Fig. 1
 Proposed photoreaction of the retinal chromophore in Opn5L1.

【結果と考察】

ニワトリ由来 Opn5L1 は界面活性剤により可溶化した試料をもちいた。これに対して、可視光 (>500 nm) を照射し 270 nm 付加体を生成した。光反応による発色団の吸収変化は、レチナールにシステイン残基が付加し、ポリエーテル鎖の共役系が切断されることに起因すると考えられている。励起光 238 nm で観測した 270 nm 付加体における発色団の共鳴ラマンスペクトルを Fig. 2A に示す。スペクトルには、発色団に由来するバンドの他に、タンパク質中にあるトリプトファン・チロシン、およびタンパク質の発現にもちいた細胞の脂質に由来するバンドが強く現れた。野生型 Opn5L1 と付加体を形成しない C188T 変異体のスペクトルを比較すると、 1640 cm^{-1} 付近の散乱光強度が異なっていた。アミノ酸置換したタンパク質が野生型と大きく構造が変わらないと仮定すると、観測されたスペクトル形状の違いは、270 nm 付加体の発色団の C=C 伸縮振動バンドと考えられる。そこで、野生型のスペクトルから、脂質および C188T 変異体のスペクトルを差し引き、270 nm 付加体の発色団のバンドを得た結果、 1640 cm^{-1} 付近に 2 本のバンドを観測した (Fig. 2B)。これらのバンドの帰属を行うために、ポリエーテル鎖の炭素原子を同位体置換した試料のスペクトルを観測した (Fig. 2C)。9 および 10 位の置換体のスペクトルでは低波数側のバンドが、13 位の置換体では高波数側のバンドが同位体シフトを示したのに対し、12 位の置換体では明確なシフトを示さなかった。これらの結果は、低波数側のバンドはイオン環側の C=C 伸縮振動モードに、高波数側のバンドはシッフ塩基側の C=C 伸縮振動モードに帰属されること、12 位の炭素は 2 重結合を形成していないことを示しており、これまでに提案されている 11 位の炭素原子へのシステイン付加を強く支持した。

さらに、270 nm 付加体の発色団モデルについて DFT 法 (B3LYP/6-311G**) による量子化学計算を行った。シッフ塩基がプロトン化している条件では、 $\text{C}_{13}=\text{C}_{14}$ 伸縮振動の振動数が著しく低く実験結果を再現しなかったのに対して、シッフ塩基が脱プロトン化した条件では、 $\text{C}_{13}=\text{C}_{14}$ 伸縮振動の振動数がもっとも高波数側に現れることがわかり、実験結果をよく再現した。また、発色団モデル化合物である 11,12-ジヒドロレチナールシッフ塩基のラマンスペクトルにおいても、13 位の炭素原子を同位体置換した試料では、脱プロトン化状態でタンパク質と類似の同位体効果が観測された。これらの結果から、Opn5L1 のレチナール発色団は、270 nm 付加体において、11 位の炭素原子にシステインが付加し、シッフ塩基が脱プロトン化している構造をとっていることを結論した。

【参考文献】 [1] K. Sato, T. Yamashita, H. Ohuchi, A. Takeuchi, H. Gotoh, K. Ono, M. Mizuno, Y. Mizutani, S. Tomonari, K. Sakai, Y. Imamoto, A. Wada, Y. Shichida, *Nature Commun.* 9, 1255 (2018).

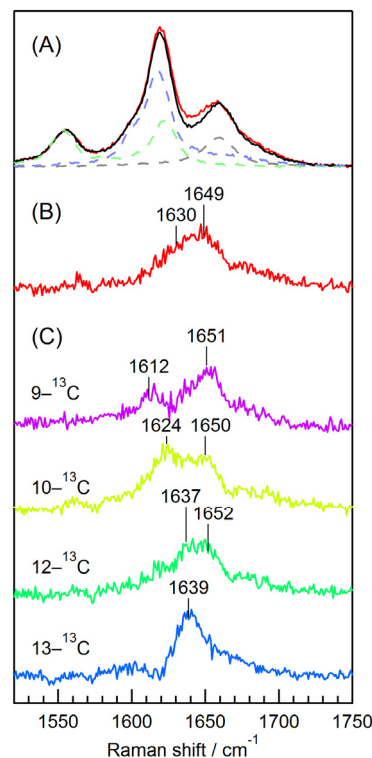


Fig. 2 (A) Resonance Raman spectra of Opn5L1 excited at 238 nm. Red and black traces are Raman spectra of the wild type and the C188T mutant. Green, blue and gray broken traces indicate Raman spectra of tryptophan, tyrosine and lipid, respectively. (B) Difference spectrum obtained by subtracting the spectrum of the C188T mutant from that of the wild type, representing the Raman spectrum of the 270-nm product of Opn5L1. (C) Raman spectra of the isotope substitutes of the 270-nm product of Opn5L1. Intensities of the spectra in panels B and C were multiplied by 4.