

無脊椎動物視物質の X 線結晶構造解析

Crystallographic Study of Invertebrate Rhodopsin

名古屋大学	村上 緑
派遣期間	2016 年 4 月 3 日～2017 年 3 月 23 日
研究機関	Laboratory of Biomolecular Research, Paul Scherrer Institut Villigen PSI, 5232 Villigen, Switzerland
研究指導者	Prof. Gebhard F. X. Schertler

The extraordinary properties of a new X-ray source using a Free-Electron Laser with a brilliance three orders of magnitude higher than what is achieved at synchrotrons, a very short pulse duration and a high spatial coherence in combination with a pump probe laser make it possible to perform time-resolved serial femtosecond crystallography which will allow us to make a 3-D movie of photo-sensitive protein conformational changes upon photo-activation. Upon absorption of light the photo-cycle of squid rhodopsin proceeds Rhodopsin \rightarrow Batho \rightarrow Lumi \rightarrow LM, and then its photo-product Acid Meta form has an absorption maximum in visible light with protonated retinylidene Schiff base and can be hit back to the initial state by absorbing a photon again. In addition, in contrast to vertebrate rhodopsins, which have developed evolutionally as an ultimate photo-sensor, other rhodopsins have developed to obtain functional diversity as well as vision. In this study we have tried to crystallization of squid rhodopsin in the dark and photo-activated acid-meta states, which are suitable for SFX experiments. It promises to elucidate some common structural features in the activation mechanism of rhodopsins and GPCRs, and some distinct components contributing for their divergent functions.

研究目的

視物質ロドプシンは網膜視細胞に存在する光受容膜蛋白質で、7 本膜貫通 α ヘリックス構造を特徴とする G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) のメンバーである。膜内に含まれる発色団レチナールが光を吸収すると、蛋白質全体の構造が変化し細胞質側表面に結合した G 蛋白質へと光情報が伝えられ、視細胞を興奮へと導く。ロドプシンは網膜から大量調製可能であることから、世界中でウシロドプシンを標準試料として徹底的に構造機能解析がなされている。一方、無脊椎動物のロドプシンの光活性化メタ状態は生理的条件下で安定であり、さらに光子を吸収し基底状態へと戻る双安定性を示す (図 1)。これは活性化過程を追跡する上で大変有利であるにもかかわらず、大量培養系が確立されていないこともあり無脊椎動物ロドプシンを用いた構造機能連関研究はあまり進展していなかった。最近になってゲノム科学の進展によりさまざまな生物で新機能を持った

ロドプシンが多数発見されつつあり、また、ウシロドプシンの Gt 蛋白質 (トランスデューシン) の活性化効率は極めて高いのに対し、無脊椎動物のロドプシンが共役する Gq 蛋白質は多くの一般 GPCR が共役し、また活性化効率も同程度に高くない。これらのことから、無脊椎動物ロドプシンの光活性化にともなう構造変化や情報伝達の様式が多種多様な脊椎動物視物質以外のロドプシン群および一般 GPCR と共通であると考えられ、注目が高まっている。

われわれはイカロドプシンを脊椎動物視物質以外の多くのロドプシントタンパク質のモデルとして捉え、構造生物学的観点からロドプシンの光活性化機構を解明することを目標に X 線結晶構造解析に取り組んできた。これまでに暗順応状態の構造を決定し、低温トラップ法にて反応中間体を捕捉し構造解析に取り組んだ結果バソ中間体、ルミ中間体およびイソロドプシン状態の構造を求めている。それらの結果

から示されたイカロドプシンの暗順応状態から熱緩和した LM 状態に至るまでの光反応過程における構造変化はレチナルや周辺残基を含む活性部位近傍の変化にとどまっていた。

近年 X 線自由レーザー (XFEL) の開発に伴い、放射線損傷のない構造解析手法としてシリアルフェムト秒結晶構造解析 (SFX) が本格的に運用されている。本課題では、ウシロドプシンおよび GPCR の構造研究で世界的権威であるスイスポールシェラー研究所のシャートラー教授と共同研究を行い、先行しているウシロドプシンの技術をイカロドプシンにも導入し、SFX 実験に適した結晶を得ることを目指した。

研究経過

1. イカロドプシン暗順応状態および光活性化状態の微結晶化

SFX 実験では多数の結晶を高粘度媒体に懸濁しインジェクターから連続的に流したものに XFEL のパルス光を照射する。結晶はインジェクターのノズル部分から離散的に押し出されるため、その大きさにおよそ 50 μm 以下に制限される必要がある。また、結晶が高密度であればパルス光が結晶を照射するヒット確率も高くなるが、高密度すぎるとインジェクターのノズルが詰まりやすいために、ヒット確率を犠牲にしても適切な密度に調整する必要がある。したがって、SFX 実験には均質で高分解能の微結晶が多数必要となる。

イカロドプシンは双安定性の光反応サイクルを示すので、暗順応型、光活性型の 2 つを始状態として SFX 実験を行えば光反応サイクル全体の構造変化を

追跡できるはずである。したがってこの 2 種を用いて微結晶化を行った。

サンプルには従来用いてきた天然のイカ眼球から単離した微絨毛膜より亜鉛存在下で界面活性剤により抽出したロドプシン溶液、および微絨毛膜を可溶化し陰イオン交換カラムにより精製し濃縮したロドプシン溶液を用いた。アシッドメタ状態は暗順応ロドプシンにアルカリ性条件 (pH10) 下で青色光を照射しアルカリメタ状態を 100% 生成させた後、アシッドメタ状態の生成率が 100% となる pH7 以下で結晶化を行った。

これらの溶液を市販の結晶化スクリーニングキットを用いて蒸気拡散法にて結晶化したところ、複数の条件において 1 週間程で多数の結晶を得ることができた。これらの溶液条件は主に PEG を沈殿剤に用いたものであり、高濃度硫酸アンモニウム溶液を用いた従来のイカロドプシンの結晶化条件とは異なるものであった。高塩濃度溶液を用いたウシロドプシン結晶は SFX 実験に適さないため PEG を用いて微結晶化しており、本課題で見出した条件もこれに近いものであった。均質化を図るためにこれらの条件に基づいてバッチ法を適用し結晶化を行った結果、いくつかの条件で適切な大きさ、数の微結晶を得ることができた (Figure 1)。

2. イカロドプシンの大量発現系の構築

従来用いている天然試料では生育条件の違い、つまり捕獲した海域や月齢の違い、あるいは個体差などが原因で試料が不均一となることは避けきれず結晶化の成功率は低かった。SFX 実験においては結晶

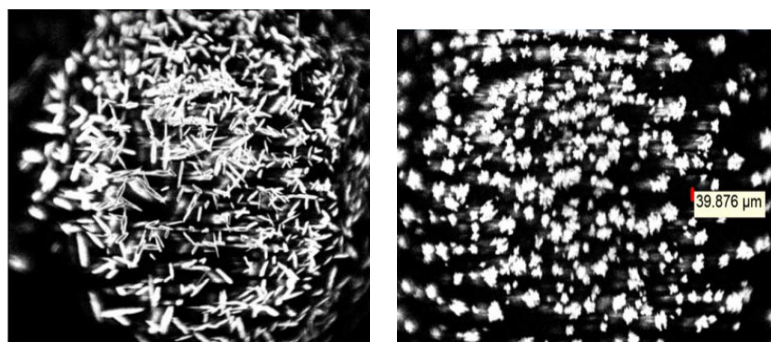


Figure 1 SONICC images of squid rhodopsin crystals
Left) Acid-Meta state Right) Dark state

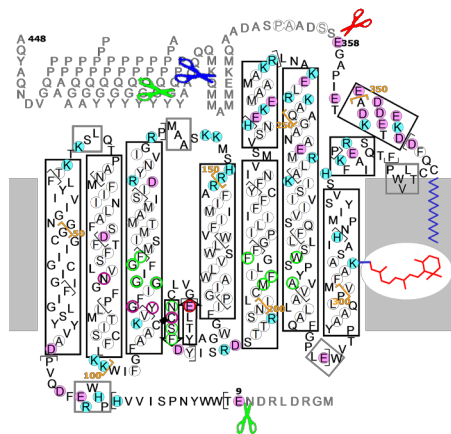


Figure 2 Design of Constructs

の均質化は必須であり、培養細胞に組換え蛋白質を発現させることを試みた。

イカロドプシンはこれまでに発現系が構築されていないので、他の無脊椎動物ロドプシンの発現系を参考にして実験を計画した。野生型イカロドプシンの全長クローンは京大の七田先生より譲渡を受け、われわれが発表したイカロドプシンの立体構造モデルを参考に遺伝子配列を設計した。揺らぎが大きいために電子密度マップが見えなかった N、C 末端のループ領域を削除し、N 末端に翻訳を促進するとされるコザック配列を、さらに C 末端には後のロドプシンの精製のためにロドプシン抗体の 1D4 タグ (ETSQVAPA) を付加し PCR により増幅、制限酵素 KpnI および NotI により哺乳類発現ベクター pcDNA3.1+ に組み込んだ (Figure 2)。XL1-Blue 株に導入し培養した後、目的遺伝子が十分に発現していることを確認した。

それぞれのコンストラクトを用いて HEK293 株に導入し発現を試みたが、滞在中にはうまくいかなかった。帰国後異なる培養系を用いて発現を試みている。

考察

最近報告された好塩菌の光駆動プロトンポンプバクテリオロドプシンの SFX 実験では光活性化により M 中間体での膜貫通ヘリックスの動きが観測されている。視物質ではヘリックスの再配置が惹起されると予想されるので、暗順応状態からメタ状態までの反応を結晶中で進行させるのは結晶性が損なわれる

可能性がある。また、結晶中の分子間接触により生理的な構造変化が観測される保証もない。無脊椎動物の視物質は光反応過程が双安定性を示すことから、本課題ではイカロドプシンの暗順応状態に加えてアシッドメタ結晶を用いることで光反応サイクルの構造変化を明らかにすることを試み、微結晶を得ることができた。今後、各ステップでの条件検討を行い結晶の分解能を向上させ、新たに運用を開始する SwissFEL で回折実験を行う予定である。

研究の発表

口頭発表

1. Murakami M, "Crystallography of squid rhodopsin towards characterizing structural dynamics and bistability", IGER International Symposium on Physics of Life, Nagoya, March 25-26, 2017
2. Murakami M, "Another world of Rhodopsin; Structure and Function of squid rhodopsin", jLBR Seminar, Villigen, March 22, 2017
3. Murakami M, " Crystal structure of the LM intermediate of squid rhodopsin", 16th International Conference on Retinal Proteins, Potsdam, October 2 - 7, 2016
4. Murakami M, " Crystallographic studies of squid rhodopsin", Membrane Protein Meeting, Villigen, September 29, 2016

誌上発表

なし