

電子—電子二重共鳴（DEER）法を用いた 酵素ロドプシンの活性化メカニズム解明

Elucidation of Activation Mechanism of Enzymerhodopsins using Double Electron-Electron Resonance (DEER)

トロント大学	杉浦 雅大
研究期間	2024 年 4 月 1 日～2026 年 3 月 31 日
滞在研究機関	Department of Biochemistry, University of Toronto, 1 King's College Circle, Toronto, Ontario, M5S 1A8, Canada
共同研究者等	Prof. Oliver P. Ernst
区分	区分 B

Rhodopsin research has been developed exponentially by the birth of the optogenetics research field. Recently, a new family called enzymerhodopsin is expected as a next-generation optogenetic tool that can regulate the concentration of intracellular second messengers with light irradiation.

Enzymerhodopsin has an intramembrane domain and an enzyme domain, it is totally different from other rhodopsins, which only work with the intramembrane domain. Thus, its photoactivation mechanism is intriguing. On the other hand, the detailed photoactivation mechanism has remained in the realm of speculation because of the difficulty of preparing purified protein. Therefore, we apply the Double Electron–Electron Resonance (DEER) electron spin resonance spectroscopy, which can measure the distance between two points in a protein. DEER spectroscopy is a structural biology analysis technique that can obtain distance information of 20 - 80 Å using two spin labels. In addition, this technique can be used to analyze samples with structural diversity.

Using this method, we can obtain distance information between amino acids derived from structural changes in the protein. Finally, we can get closer to the question of how the light-receiving membrane domain moves and activates the enzyme domain.

海外研究活動概要

ここ十数年における世界のロドプシン研究は、指数関数的な発展を見せている。特にチャネルロドプシンの発見によって細胞膜内外のイオン透過を光操作する「光遺伝学」が誕生し、生命科学に革新をもたらした。最近では、光活性化ヒスチジンキナーゼ（Rh-HK）、光活性化グアニル酸シクラーゼ（Rh-GC, NeoR）、光活性化フォスホジエステラーゼ（Rh-PDE）など酵素ロドプシンと呼ばれる新たなファミリーが発見されている。Rh-GC や Rh-PDE は、細胞内シグナル伝達物質である環状ヌクレオチド分子（cAMP, cGMP）の産生／分解を光で制御できるため、既存のイオン透過型ロドプシンを用いたツールとは異なる

る次世代光遺伝学ツールとして期待されている。

酵素ロドプシンは膜内ドメインが直接、酵素ドメインの反応を制御している点が他のロドプシンとは大きく異なるため、その光活性化メカニズムが興味深い。一方、世界中で行われている酵素ロドプシン研究は、「より良い光遺伝学ツールの開発」という「応用」に重きを置いた研究が多い。加えて、酵素ロドプシンは精製タンパク質の調製が困難であり、詳細な光活性化機構は推測の域にとどまっていた。

このような現状のもと、私はタンパク質中の 2 点間距離を測定可能な Double Electron-Electron Resonance (DEER) 電子スピン共鳴分光法を用いた実験を着想した。DEER 分光法はタンパク質に 2 つ

のスピララベル体を結合させることで ~20 - 80 Å 程度の距離情報を取得可能な構造生物学的解析技術であり、構造多様性を持った試料でも解析可能である。2 点間距離を測定する手法として蛍光エネルギー共鳴移動(FRET)が広く知られているが、蛍光分子が大きいために空間分解能に対する疑問がたびたび報告されている。加えて、FRET は励起光が必須であるため、光に反応するロドプシンには不向きである。一方、DEER 電子スピン共鳴分光法は FRET よりもラベル体の分子構造がコンパクトなため距離情報の精度が高い上に、磁場を用いて距離情報を検出するため、光反応をする酵素ロドプシンにとって最適の構造解析手法である。

よって DEER 分光法を用いればタンパク質の構造変化に由来するアミノ酸間の距離情報を取得することができ、光を受容した膜ドメインがどのように酵素ドメインを動かし、活性化させるのかという疑問に迫ることができる。

研究経過

当初、変異体および細胞株による影響により、酵素ロドプシンの試料調製に苦戦していたが、コンストラクトの変更によって試料調製に成功した。ただし、昨年末より測定器が故障しており、現在も装置の復旧に全力を尽くしているものの、部品の供給が追いついておらず復旧にはしばらく時間を要する。そのため、復旧後、即座に測定を開始するべく、試料調整を進めている。調整した測定試料のスピララベル化は別の電子スピン共鳴法を用いて確認しているため、装置が復旧し次第測定が可能である。

主たる目的達成に向けて実験を進める中、酵素ロドプシンの持つ金属イオンをキレート可能なアミノ酸モチーフに銅イオンを結合させることによってスピララベル標識できる可能性が見出された。

これまでの DEER 分光法では、スピララベル標識をするためにシステインとジスルフィド結合可能な SH 基を保有するスピララベル体を用いて標識する必要があるため、精製による夾雑タンパク質の除去が必須であった。一方、スピニングナルを検出可能な金属イオンのキレートによってスピララベルを行う手法を用いることで、タンパク質を精製することなく測定できる可能性がある。特に、酵素ロドプシンを含む膜タンパク質は精製時に界面活性剤による可溶化が必須であるが、一般的に界面活性剤は膜タ

ンパク質の構造を不安定化させることが知られているため、複雑で不安定なタンパク質については可溶化の段階でタンパク構造が壊れてしまうものも少なくない。よって、本手法が確立できれば酵素ロドプシンのみならず、すべての膜タンパク質、ひいてはタンパク質全般に応用可能な手法となりうる。現在は、酵素ロドプシンを含む複数の膜タンパク質試料を調製しつつ、精製を行わない膜タンパク試料に対する金属イオンによるスピララベル標識および、DEER 測定の準備を進めている。

加えて、本研究の目的である活性化メカニズムを解明するにあたり、受入研究室の強みの一つであるタンパク質の構造決定にも着手している。酵素ロドプシンの構造は膜ドメインのみおよび酵素ドメインのみを別々に構造決定した情報をもとに、全体構造の推測がなされている。しかし、酵素ロドプシンの活性化メカニズムをひも解くためには、膜ドメインと酵素ドメインをつなぐリンカーの構造情報が重要となってくる。現在、試験的に調製した別のロドプシンを用いて条件検討を進めた結果、有望な条件を確立することができた。このサンプルについては、近日中に測定を控えている。酵素ロドプシンに対しても同様のアプローチを行う予定である。

さらに、NeoR 中の発色団（レチナール）が示す 7-シス型光異性化という他の微生物ロドプシンには見られない特異な反応の理解に向けて、レチナールの光化学特性を有機溶媒中にて測定した。私たちの先行研究により、ヒドロキシルアミン反応により調製したレチナールシッフ塩基において、標準的な HPLC 条件下では全トランス型と 7-シス型は *syn* ピークでは分離できないものの、*anti* ピークを分析することで分離可能であることが明らかとなった。そこで、レチナールシッフ塩基のプロトン化および脱プロトン化状態の違いによる光異性化反応の差異を測定した結果、シッフ塩基のプロトン化状態に関係なく、溶液中での全トランス型発色団の光反応により 7-シス型がわずかながら形成されることを見出した。本研究成果は、*Photochem. Photobiol. Sci.*誌にて報告している。一方で、NeoR 中のレチナールはすべて 7-シス型へと異性化するため、上記 DEER 分光法や構造解析手法、その他さまざまな測定手法を用いた多角的視点から、そのメカニズムおよび反応ダイナミクスの解明を進めていく予定である。

今後の展望

現時点において、酵素ロドプシンの構造変化に由来する変化は捉えられていないものの、これまでタンパク質の構造解析に必須であった精製という操作を必要としない解析手法を確立することができる可能性を見出すことができた。この可能性を形にするべく引き続き研究を進めていく。また、NeoR 中で観測される特異な光異性化が、有機溶媒中でも発生することを見出した一方、タンパク質中での反応効率が圧倒的に高いため、そのメカニズムならびに反応ダイナミクス解明を目指す。最終的には、酵素ロドプシン全般における活性化メカニズムおよび反応ダイナミクス解析を進め、今後の研究の更なる発展に向けた萌芽的研究も進めていきたい。

参考文献

1. Klose et.al. PLoS One. 7(6), e39492 (2012)
2. Peter et.al. Nat. Commun. 13(1), 4396 (2022)

研究の発表

口頭発表

1. Masahiro Sugiura, Oliver Ernst, “Unique Photochemical Properties of Enzymerhodopsin”, Biochemistry Retreat Organizing Committee 2024, Toronto, Canada, October 8, 2024
2. Masahiro Sugiura, Oliver Ernst, “Biophysical and spectroscopic studies on enzymerhodopsins”, MaRS Pizza Talks 2024-2025, Toronto, Canada, October 21, 2024

誌上発表

1. Kandori, H, Sugiura, M, Katayama, K.: “Photoisomerization in rhodopsins: Shape-changing reactions of retinal at low temperatures.” Chem. Phys. Rev. 1 September 2024; 5 (3): 031304. <https://doi.org/10.1063/5.0183056>
2. Sugiura, M., Kandori, H.: “Photoisomerization pathway of the microbial rhodopsin chromophore in solution.” *Photochem. Photobiol. Sci.* **23**, 1435–1443 (2024). <https://doi.org/10.1007/s43630-024-00602-w>
3. Nakamura, T., Singh, M., Sugiura, M., Kato, S., Yamamoto, R., Kandori, H., & Furutani, Y.: “SNap bond, a crucial hydrogen bond between Ser in helix

3 and Asn in helix 4, regulates the structural dynamics of heliorhodopsin.” *Journal of molecular biology*, 168666 (2024).

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2024.168666>