

報道関係 各位

平成28年5月12日
岡山大学
千葉大学

温泉微生物の光受容体タンパク質の構造を決定 —安定化原理の解明と光遺伝学への応用—

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（薬）の塚本卓助教、須藤雄気教授、千葉大学大学院理学研究科の水谷健二助教、村田武士教授らの共同研究グループは、高温の温泉にすむ微生物から初めて発見された、光受容体レチナールタンパク質「サーモフィリックロドプシン（TR）」の立体構造を解明しました。さらに、高い安定性をもたらす分子メカニズムの解明と、高い安定性を生かした神経活動の光制御にも世界で初めて成功しました。本研究成果は4月18日、アメリカ生化学・分子生物学会誌『*The Journal of Biological Chemistry*』電子版に掲載されました。

本研究成果は、タンパク質の熱耐性メカニズムの理解や、光による脳神経活動の制御技術の発展につながります。今後は、本タンパク質の熱耐性メカニズムを応用することで、不安定で研究の難しいタンパク質を安定化する技術の開発が期待されます。

<研究の背景と経緯>

植物の光合成や動物の視覚機能のように、地球上にすむ生物のほとんどは、光を利用して生きています。その中心的な役割を担うのが、光受容体と呼ばれるタンパク質群で、光受容体にはさまざまな種類があります。本研究グループでは、アルデヒド型ビタミンAの「レチナール」を発色団^(解説1)として持つ光受容体タンパク質「レチナールタンパク質」（図1）に着目して研究を続けてきました。

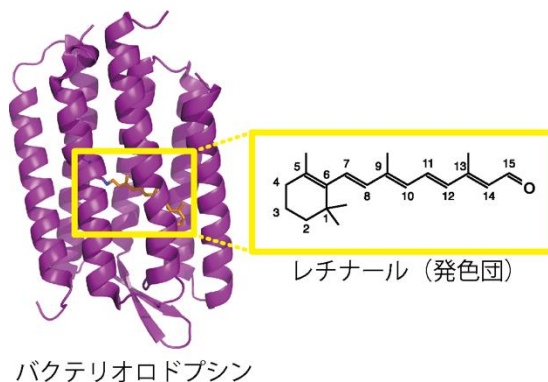


図1. レチナールタンパク質.

光受容体のレチナールタンパク質は、分子の内部に発色団としてビタミンAのアルデヒド型分子レチナールを結合。これにより、可視光を受容できる。

遺伝子解析手法の発展により、地球上のさまざまな生物にレチナールタンパク質の遺伝子が見つかっています。そのほとんどは、中低温環境にすむ生物に由来するものでした。一方、50℃以上の高温環境にすむ生物からは、レチナールタンパク質の遺伝子は見つかりませんでした。発色団のレチナールが50℃以上で速やかに分解してしまうため、高温



PRESS RELEASE

環境にすむ生物にはレチナールタンパク質が存在しないと考えられてきました。

本研究グループは2013年、75°Cの温泉にすむバクテリア *Thermus thermophilus* JL-18 株 (解説2) から TR を発見。これまでに発見されたレチナールタンパク質の中で、熱に対して最も安定であることを突き止めました (図2)。

今回、本研究グループは、TR の熱耐性メカニズムを詳しく調べるために、X線結晶構造解析法 (解説3) と呼ばれる手法を用いて、立体構造の解明を試みました。

また、レチナールタンパク質は、神経活動を光で操作する技術 (オプトジェネティクス (光遺伝学)) に用いられており、近年注目を集めています。本研究では、TR を線虫 (解説4) の神経細胞に発現させ、光で線虫の行動を抑制することも試みました。

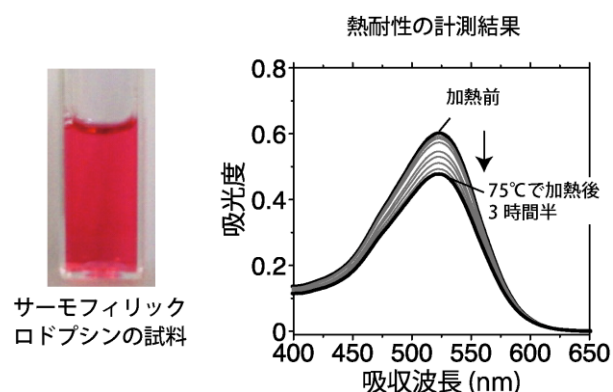


図2. TR の熱耐性.

2013年、温泉にすむバクテリアから発見したTRは、530 nmの緑色光を最もよく吸収する性質を示す (左図、写真)。サーモフィリックロドプシンは、75°Cで3時間半加熱を続けてもおおよそ80%の活性を保持する、最も熱に安定なレチナールタンパク質である (右図, Tsukamoto et al. (2013) *J. Biol. Chem.* 288, 21581-21592 より)。

<研究の内容>

TR の立体構造と熱耐性メカニズム

本研究グループは、大腸菌を用いて TR を大量生産し、脂質キュービックフェーズ法 (解説5) で結晶化を行いました。得られた結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設 (Photon Factory)、理化学研究所大型放射光施設 (SPring-8) において X線回折データを収集し、2.8 Å 分解能で立体構造を決定しました (図3)。

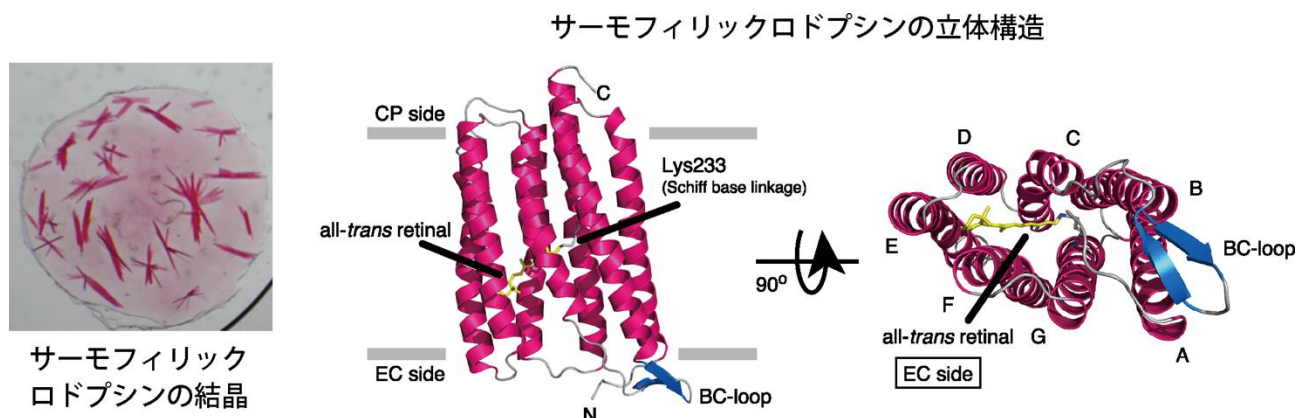


図3. TR の立体構造.

TR の結晶 (左図、写真) を作成し、X線回折データを解析することによって、TR の立体構造を明らかにした (中央、右図)。



PRESS RELEASE

次に、TRの熱耐性メカニズムを詳しく調べるために、TRと類縁のレチナールタンパク質とのアミノ酸配列^(解説6)を比較。TRは、類縁タンパク質に比べて、タンパク質の構造を安定化する疎水性相互作用^(解説7)に関与するアミノ酸を多く含んでいることがわかりました。さらに、コンピューターを用いて分子動力学シミュレーション^(解説8)を実施したところ、高温条件下において、疎水性相互作用を強くする構造変化が起こることがわかりました(図4(a))。

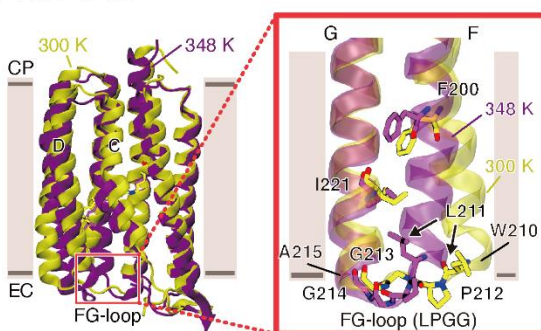
また、本研究グループが構造変化に関与する部位を削除したTRを人工的に作成し、熱耐性を計測した結果、構造変化に関与する部位を削除する前に比べて、熱耐性が20分の1以下に低下することがわかりました(図4(b))。

オプトジェネティクスへの応用可能性

本研究グループは、近年注目されているオプトジェネティクスへの応用の可能性を探るため、顕微鏡観察下においてTRの遺伝子を線虫の卵巣に注入。TRを線虫の神経細胞に発現させる遺伝子組み換えを行いました。(図5(a))

TRは緑色の光を最もよく吸収することから、遺伝子を組み換えた線虫に緑色の光を照射し、線虫の行動の変化を観察。緑色光の照射によって線虫の体が麻痺し、行動が止まることわかりました。これは、光照射によってTRが線虫の神経細胞膜を隔てて水素イオンを輸送し、神経細胞の活動が抑制されたことによるものです(図5(b))。さらに、TRは、オプトジェネティクスでこれまでに最もよく利用されていた光活性分子よりも、活性が大きく、かつ安定に利用できることがわかりました。

(a) 分子動力学シミュレーション



(b) 構造変化に関与する部位(LPGG配列, 上図(a))を削除したサーモフィリックロドプシンの熱耐性

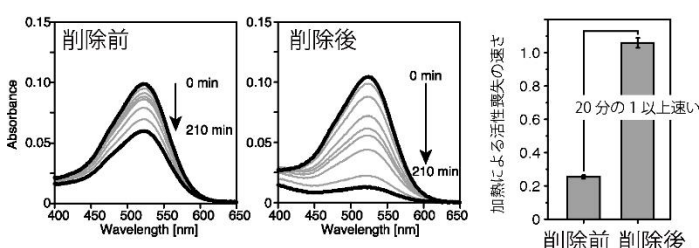


図4. 熱耐性メカニズム.

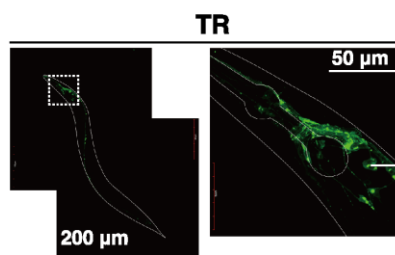
(a) 疎水性相互作用を多く持つTRは、室温条件(黄色、300 K (27°C))に比べて、高温条件下(紫色、348 K (75°C))において構造が変化し、疎水性相互作用が強くなることで、分子動力学シミュレーションによって示唆された。

(b) 構造変化に関与する部位を削除したTRを作成し、熱耐性を調べたところ、削除前に比べて20分の1程度熱安定性が低下した。

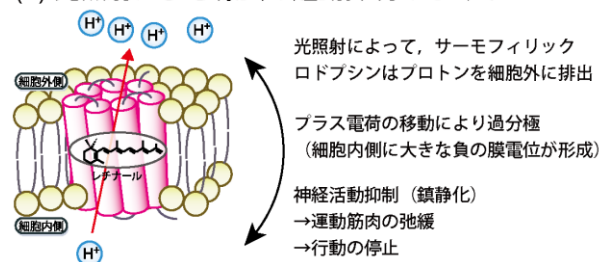


PRESS RELEASE

(a) 線虫に発現したサーモフィリックロドプシン



(b) 光照射による線虫の運動抑制のしくみ



(c) 既存のオプトジェネティクスツール AR3 との活性比較

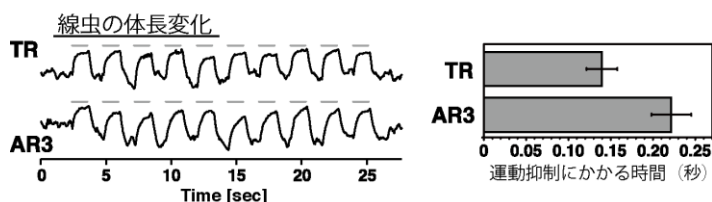


図 5. オプトジェネティクスへの応用。

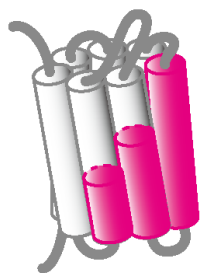
(a) 線虫の神経細胞に TR を発現させた（緑色蛍光タンパク質との共発現により、緑色に呈色している）。(b) 光照射による神経活動抑制の仕組み。(c) 既存のオプトジェネティクスツール AR3 との活性比較。

<今後の展開>

本研究により、TR は、他のレチナルタンパク質に比べて、より多くの疎水性相互作用によって熱耐性を獲得していることがわかりました。本研究で得られた知見をもとに、TR の熱耐性メカニズムを応用することで、不安定で研究の難しいタンパク質を安定化する技術の開発が期待されます。

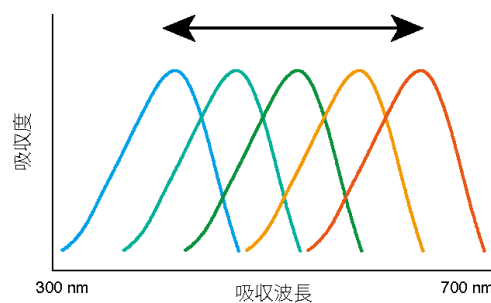
さらに、TR はこれまでに最もよく利用されていた光活性分子よりも、活性が大きく安定に利用できるため、オプトジェネティクス研究において極めて有用な分子ツールであることがわかりました。今後、光による脳神経活動の制御技術の発展につながると期待されま

す（図 6）。



構造安定化法の確立

・不安定な膜タンパク質の研究の進展に貢献する。



オプトジェネティクスツールの高度化

・弱い光で効率よく、様々な波長で制御可能な分子の開発

図 6. 今後の展望。

不安定で研究の難しいタンパク質の構造安定化法の開発や、オプトジェネティクスツールの高度化を目指す。



岡山大学
OKAYAMA UNIVERSITY



CHIBA
UNIVERSITY

PRESS RELEASE

<論文情報>

タイトル : “X-ray Crystallographic Structure of Thermophilic Rhodopsin: Implications for High Thermal Stability and Optogenetic Function”

(サーモフィリックロドプシンの X 線結晶構造 : 熱耐性メカニズムとオプトジェネティクスへの応用可能性の示唆)

論文 : *The Journal of Biological Chemistry*, doi:10.1074/jbc.M116.719815.

著者 : Takashi Tsukamoto, Kenji Mizutani, Taisuke Hasegawa, Megumi Takahashi, Naoya Honda, Naoki Hashimoto, Kazumi Shimono, Keitaro Yamashita, Masaki Yamamoto, Seiji Miyauchi, Shin Takagi, Shigehiko Hayashi, Takeshi Murata and Yuki Sudo.

<研究費>

本研究成果は、文部科学省科学研究費補助金（KAKENHI）（若手研究 B、基盤研究 B、新学術領域研究）、創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業の援助を受けて行われたものです。

<お問い合わせ>

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科（薬）

教授 須藤 雄気（すどう ゆうき）

（電話番号）086-251-7980

（FAX番号）086-251-7926

千葉大学 大学院理学研究科

教授 村田 武士（むらた たけし）

（電話番号）043-290-2794

（FAX番号）043-290-2794



PRESS RELEASE

<用語解説>

1. 発色団：通常、タンパク質は可視光を吸収する性質を持たないが、可視光を吸収する補助分子がタンパク質の内部に存在すると、可視光を吸収できるようになる。この補助分子を発色団という。レチナールタンパク質の場合、レチナールがこれに相当する。
2. *Thermus thermophilus* JL-18 株：高度好熱性真正細菌サーマス・サーモフィルス。JL-18 株は、アメリカ合衆国のグレートベイスン（Great Basin）と呼ばれる地域にある、およそ 75°C の温泉（Great Boiling Spring）で採集された株。
3. X 線結晶構造解析法：解析対象のタンパク質の結晶を作成し、X 線照射によって得られる回折データから、結晶内部で原子がどのように配列しているかを決定する方法。
4. 線虫：学名 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)。遺伝子情報、神経ネットワークがすべて明らかになっており、最も汎用されるモデル動物のうちのひとつ。
5. 脂質キュービックフェーズ法：細胞膜に存在する「膜タンパク質」と呼ばれるタンパク質の結晶を作る方法。
6. アミノ酸配列：タンパク質は、複数のアミノ酸が直鎖状一列につながってできている。タンパク質を構成するアミノ酸は 20 種類あり、その並び方を比較することで、類縁タンパク質との機能や構造の違いを見いだす手がかりになる。
7. 疎水性相互作用：水分子と親和性の低い疎水性の官能基が、水溶液中で互いに集まろうとする相互作用。タンパク質の場合、疎水性の官能基を持つ疎水性アミノ酸は互いに疎水性相互作用によって分子の内側に、親水性の官能基を持つアミノ酸は外部の水分子との相互作用によって分子表面に位置することによって、タンパク質の立体構造の形成に重要な役割を果たしている。
8. 分子動力学シミュレーション：コンピューターを用いて分子運動の模擬実験を行い、分子の動的構造や物性を研究する方法。