

研究助成

動物ロドプシンの分子進化から探るヒト視覚の理解と応用

片山耕大

名古屋工業大学 大学院工学研究科

本研究は、視覚の初発分子であるロドプシンに着目し、動物ロドプシンの分子進化と構造・機能の相関を明らかにすることで、ヒト視覚特性の成立機構および視覚異常の分子基盤を解明することを目的とする。近年、多様な動物ロドプシンが同定されているが、特にレチナール周辺のカウンターイオンの違いが光応答特性に与える影響と、その進化的意義は十分に理解されていない。そこで本研究では、ロドプシンの構造解析および分光学的解析を通じて、分子進化に伴う機能変化を体系的に解明し、ヒト視覚機能の獲得過程との関連を明らかにする。さらに、得られた知見を基盤として、視覚再生に資する光操作ツールの開発へと展開する。

1) 動物ロドプシンの多様性を生み出す分子機構の構造学的解明

本課題では、動物ロドプシンの分子多様性の起源を明らかにするため、特異な分子特性を有するクラゲロドプシンおよびサンゴロドプシンを対象に、分光学的手法を用いた構造機能解析を行った。

1)-1 クラゲロドプシンの光反応機構の解明

クラゲロドプシンは、脊椎動物型および無脊椎動物型ロドプシンとは異なる位置にカウンターイオンを有し、さらに動物ロドプシンとして唯一Gsタンパク質と共役するという特異な分子特性を持つ。しかし、その構造変化と機能発現の関係はこれまでほとんど明らかにされていなかった。そこで本研究では、光反応過程で生成する中間体に着目し、分光学的手法を用いた構造解析を実施した。その結果、光反応初期においては脊椎動物ロドプシンと類似した構造変化が観測された一方で、後続の中間体では脊椎・無脊椎いずれとも異なる独自の構造変化が検出された。これにより、クラゲロドプシンは既知のロドプシンとは異なる光反応経路を持ち、その分子進化に対応した新たな構造ダイナミクスを有することが示唆された。本成果は、動物ロドプシンにおける光反応機構の多様性を直接的に示すものであり、現在論文として取りまとめている (図1)。

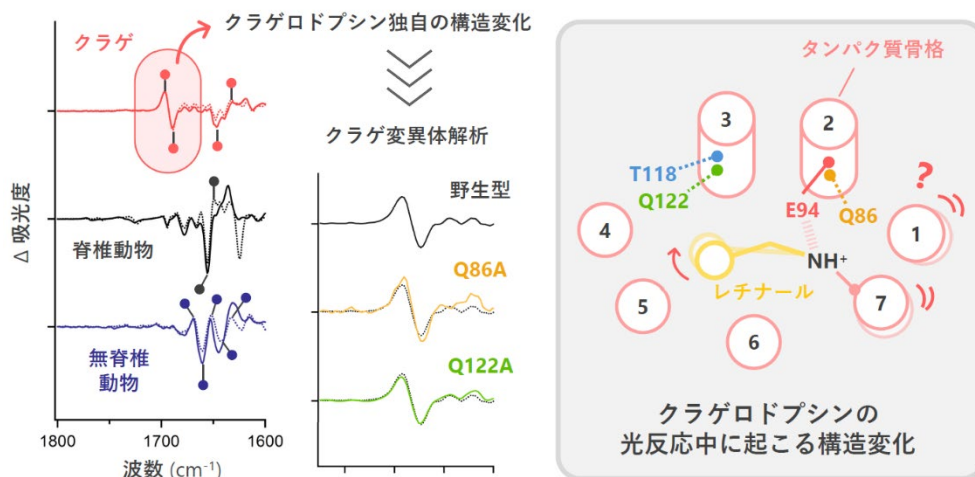


図 1. 赤外分光測定から明らかになったクラゲロドプシンの光反応過程での構造変化の特異性

1)-2 サンゴオプシンにおける Cl⁻ 依存的機能の分子基盤

サンゴオプシンは、動物ロドプシンとして初めて、光刺激後に自発的に基底状態へ戻る光サイクル反応を示すことが報告された分子である (現在、私を共著者として *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 誌に投稿中)。さらに、カウンターイオンとして従来の酸性アミノ酸ではなく塩化物イオン (Cl⁻) を利用する点でも極めて特異である。しかし、その結合様式や光反応における役割は未解明であった。本研究では、Cl⁻ 依存的機能の分子基盤を明らかにするため、紫外可視吸収分光および全反射赤外分光 (ATR-FTIR) を用いた構造解析を行った。その結果、吸収極大はイオン半径の増加に伴い長波長側へシフトし (Cl⁻ 存在下で 446 nm)、カウンターイオンが発色団周辺環境を直接制御していることが示された。さらに ATR-FTIR 測定により、イオン交換に伴う α ヘリックス構造や側鎖官能基の変化が検出され、Cl⁻ の結合様式に関する構造的知見が得られた。加えて、Cl⁻ 濃度依存的な解析から解離定数 (Kd) は 0.3 mM と求められ、生理条件下においてカウンターイオンとして機能することが裏付けられた。これらの成果は現在、論文として投稿準備中である

また、低温トラップ分光により光反応中間体の同定にも成功した。さらに、光反応過程におけるイオンの動態を解析するため、Cl⁻ を赤外活性なアジドイオンに置換して時間分解 FTIR 測定を行った結果、レチナールの異性化 (11-*cis* から *all-trans*) に伴いアニオンが一過的にタンパク質から離れ、その後の再異性化に伴って再結合することが示唆された。これは、光反応に伴う構造変化と連動した動的なイオン結合機構の存在を示すものである。

1)-3 錐体視物質の立体構造解析による色覚機構の解明

本研究の一環として、霊長類の赤および緑錐体視物質の立体構造をクライオ

電子顕微鏡単粒子解析により決定し、色覚の分子基盤の解明に取り組んだ。錐体視物質は極めて不安定であるため、これまで原子レベルでの構造決定は達成されておらず、色覚の波長選択機構は長年未解明の課題であった。本研究では、赤および緑視物質の暗状態構造を原子レベルで決定することに成功し、両者で共通のレチナール構造を持ちながらも、わずか3つのアミノ酸残基が形成する局所的な静電環境の違いが吸収波長差(約30 nm)を生み出す主要因であることを明らかにした。さらに、錐体視物質特有の構造的空隙(横穴構造)を見出し、レチナールの取り込みと放出に関わる新たな分子機構を提唱した。

これらの成果は、色覚の分子機構を構造基盤から初めて統一的に説明するものであり、視覚科学における長年の課題に対する重要な進展である。本成果は、国際共同研究として実施され、*Science* 誌に受理された(図2)^[1]。

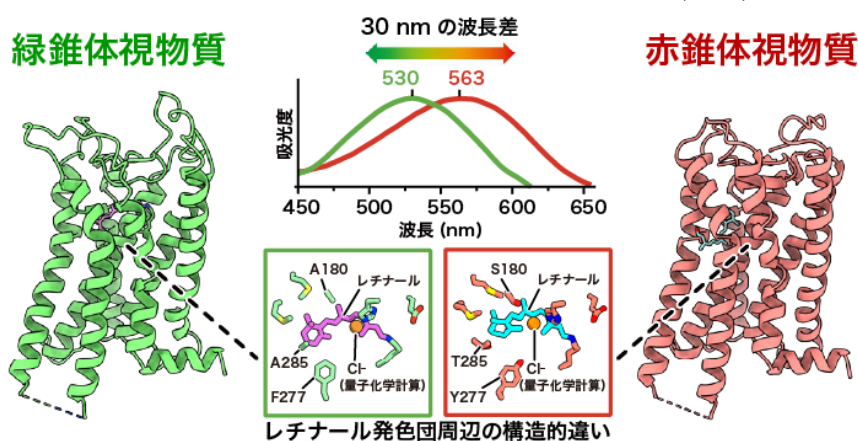


図2. 錐体視物質の立体構造決定から明らかになった、赤と緑の波長差を生み出す分子構造の違い

2) ヒトロドプシンの機能異常と視覚異常の関連解析

ヒトロドプシンの機能異常は、夜盲症や網膜変性などの視覚疾患を引き起こすことが知られている。これらの疾患の多くは、タンパク質構造の不安定化や異常活性化に起因すると考えられているが、その分子機構の理解は依然として限定的である。そこで本研究では、視覚異常の分子基盤を理解するため、視物質における熱異性化反応とタンパク質構造ダイナミクスとの関係に着目した解析を行った。

視物質におけるレチナールの熱異性化は、光刺激が存在しない条件下でも自発的に活性化状態を生じる現象であり、視覚ノイズの発生源として知られている。特に、桿体視物質(ロドプシン)は極めて低い熱異性化頻度を示す一方、錐体視物質ではその頻度が著しく高いことが知られている。しかし、その違いを生み出す分子機構は十分に理解されていなかった。

本研究では、1)-3)で述べた錐体視物質の立体構造解析成果を基盤として、視覚異常の分子機構解明に向けた研究を展開した。ロドプシンと錐体視物質の構造

比較から、両者は全体として高い構造類似性を示すにもかかわらず、熱異性化頻度には大きな差が存在することが明らかとなった。このことは、熱異性化頻度の違いが静的な立体構造のみでは説明できず、タンパク質の動的性質に着目する必要があることを示している。

そこで本研究では、タンパク質の熱揺らぎを定量的に評価するため、溶媒エントロピーに基づく統計熱力学計算手法を導入した。本手法は、タンパク質構造から揺らぎの大きさをエネルギー指標として評価できる特徴を持ち、多数の構造に対して高速な比較解析が可能である。実際に、野生型ロドプシン、熱異性化頻度の増加が知られている先天性夜盲症関連変異体、および緑錐体視物質に適用したところ、算出された揺らぎ指標と熱異性化頻度との間に相関が認められた。これは、熱揺らぎが視物質の熱異性化反応を規定する重要な因子である可能性を示す結果である。

さらに、全アミノ酸置換変異体を対象とした *in silico* スクリーニングを実施し、ロドプシンと錐体視物質の揺らぎ特性を相互に変換し得る候補残基の抽出にも成功した。これらの成果は、視覚異常の発症機構を構造ダイナミクスの観点から理解するための新たな枠組みを提供するとともに、熱異性化頻度を制御する分子設計指針としても重要な知見を与えるものである。現在、本成果を基盤として実験的検証を進めており、視覚ノイズ発生機構の統合的理解に向けた研究を展開している。

3) 視覚再生に資する動物ロドプシンを標的とした光操作ツールの開発

本研究では、光サイクル型サンゴオプシンを基盤とした新規光操作ツールの開発を最終目標として計画していた。特に、サンゴオプシンが示す光サイクル反応および塩化物イオン (Cl⁻) 依存的な機能を活用し、GPCR 機能とイオン輸送機能を併せ持つ新たな光操作ツールの創出を構想していた。しかし、本研究期間中に実施したサンゴオプシンの分光学的解析から、光サイクル反応やカウンターイオンの動態に関して予想以上に複雑な分子機構が存在することが明らかとなった。特に、光反応に伴う Cl⁻の動的挙動や光サイクル中間体の構造変化は、光操作ツール開発の根幹となる重要な知見であり、その詳細な理解が不可欠であることが判明した。

このため、本研究期間においては光操作ツールの開発そのものには着手せず、まずはサンゴオプシンの機能発現機構の解明を優先して研究を進めた。その結果、1)-2) で述べたように、Cl⁻結合機構や光サイクル反応におけるイオン動態に関する新たな知見を得ることができた。これらの成果は、今後の光操作ツール開発に向けた重要な基盤情報になると考えられる。

今後は、得られた分子機構の知見を基に、網羅的変異導入や機能解析を進めることで、動物ロドプシンを利用した新規オプトジェネティクスツールの開発へと展開していく予定である。

本研究では、動物ロドプシンの分子進化に着目し、構造生物学、分光学および計算科学を融合した解析を通じて、視覚機能の多様性や視覚異常の分子基盤に関する新たな知見を得ることができた。特に、クラゲロドプシンおよびサンゴロドプシンの特異な分子機構の解明に加え、霊長類錐体視物質の立体構造決定に成功したことで、色覚や視覚ノイズの発生機構を構造基盤から理解するための研究基盤を大きく前進させることができた。

本助成により得られた成果は、視覚機能の進化的理解のみならず、視覚疾患の発症機構解明や新規光操作ツールの開発へとつながる重要な基盤情報となる。今後は、本研究で得られた知見をさらに発展させることで、ヒト視覚の理解とその医療応用に貢献していきたい。

最後に、本研究の遂行にあたり多大なるご支援を賜りました公益財団法人中山人間科学振興財団に深く感謝申し上げます。

[1] Sayaka Ohashi, Kota Katayama*, Asato Kojima, Xuchun Yang, Masahiro Fukuda, Filippo Sacchetta, Ryoji Suno, Yukihiro Sugita, Nipawan Nuemket, Suhyang Kim, Kazuhiro Kobayashi, Hiroo Imai, So Iwata, Eriko Nango, Takuya Kobayashi, Takeshi Noda, Massimo Olivucci*, Hideaki E. Kato*, Hideki Kandori*

“Structural insights into spectral tuning and retinal exchange in cone visual pigments”
Science in press (2026)