

86. レチナールタンパク質によるボトムアップ型生体光操作

須藤 雄気

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 生体物理化学講座

Key words：レチナール，光，膜輸送体，オプトジェネティクス

緒 言

光は生命体にとって欠かすことができない重要なエネルギー源であり情報源である。レチナールタンパク質は、7回膜貫通 α ヘリックス構造の中にビタミン A のアルデヒド型であるレチナールを発色団として持つ光受容タンパク質の総称で、動物の視覚・色覚や、微生物の走性・エネルギー産生など幅広い光依存性機能を司っている。これらタンパク質は、比較的最近まで、動物と古細菌に数個程度存在する希少な分子と考えられていたが、私たちは、地球上の様々な環境（温泉、塩湖、海洋、河川など）に住む様々な生物から、新しい分子を次々と発見しその常識を打ち破ってきた。また、これら分子の機能や構造を多様な時間領域（フェムト秒～秒）・空間領域（0.01 nm～0.01 m）で、詳細かつ精密な解析を行ってきた。これと並行して、新しい光応答性を示す改変分子の作製や創成を行い、光で生命機能を人為的に操作し理解する技術（オプトジェネティクス：光遺伝学）に応用してきた。このように、私たちの研究スタンスは、レチナールタンパク質の根源的理解（基礎）に立脚したボトムアップ的分子創成と光操作への展開（応用）を行うものであり、私たちのグループが世界的にもトップランナーの1つであると自負している。

方法、結果および考察

ここでは、分子「探索と解析」から「操作」へとつなげるボトムアップ型研究を意識し、下記に示す3つの研究を同時並行的に行った。

1. 新規分子の探索¹⁻³⁾

新規に配列決定した生物種やデータベースに登録されているゲノム情報から、推定レチナールタンパク質遺伝子を見出し、化学合成により得た遺伝子を得た。これらを発現ベクターに載せ替え、推定レチナールタンパク質を組換え体として大腸菌、古細菌、線形動物（線虫）などの生物種に発現させた。これらを用いて、植物着生細菌、熱水環境由来細菌、硫酸を豊富に含む水棲細菌から、新規レチナールタンパク質を発見し、それぞれ PvR¹⁾、RxR²⁾、SyHR³⁾と命名した（図1）。

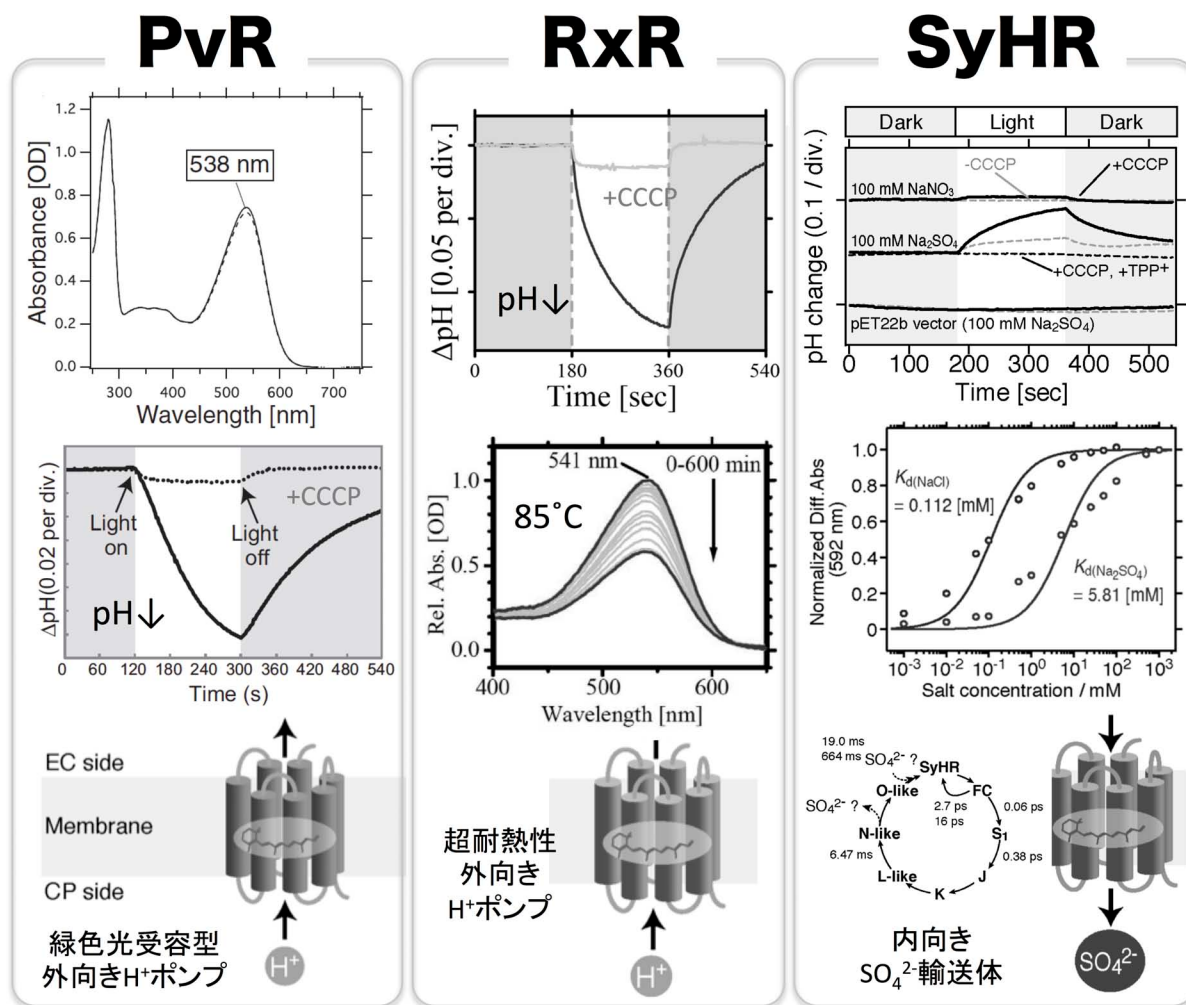


図1. 新規レチナルタンパク質の探索および機能・構造解析

3種類の新しいレチナルタンパク質 (PvR, RxR, SyHR) を発見し、その機能や機能発現メカニズムを明らかにした。

2. 分子機能・構造の解析¹⁻⁶⁾

得られた新規レチナルタンパク質の機能を既存の分子と比較しながら様々な手法により解析した (図1)。その結果、PvR の機能は細胞内から細胞外への光駆動 H⁺ポンプタンパク質であり、緑色光を吸収し ATP を合成していることが明らかになった。植物はクロロフィルを利用し青・赤色光で ATP を合成しているため、PvR を持つ細菌が植物とは異なる色の光を利用し、共存していることが示唆された¹⁾。また、RxR も同じく細胞内から細胞外への光駆動 H⁺ポンプタンパク質であり、これまでのレチナルタンパク質の常識を覆す極めて安定なタンパク質であることが明らかとなった²⁾。SyHR の機能は、硫酸イオンを細胞の外から内に取り込むイオン輸送体であることが明らかとなり、これまでに自然界および人工的にも例の無い、光で二価多原子アニオンを運ぶ機能を有することが明らかとなった³⁾。また、フェムト秒からミリ秒で起こる SyHR の構造変化とそれに伴うイオン輸送を様々な分光法を用いて解析し、イオンの結合部位および輸送のメカニズムを明らかにした³⁾。

これら新規分子の解析に加え、2013年に報告した耐熱性レチナルタンパク質 (TR) の耐熱化機構の解明を行った。具体的には、2.8Å 分解能の結晶構造 (PDB ID: 5AZD) を明らかにし、構造をもとにした分子動力学計算から6番目と7番目のヘリックスをつなぐ細胞外ループ上に位置する LPGG 配列が耐熱化に寄与することを明らかにした⁴⁾。また、非断熱的なレチナルの光異性化反応が起こることを、フェムト秒の超高速分光法により明らかにした⁵⁾。加えて、塩化物イオン輸送体・NmR-3 のイオン輸送メカニズムを種々の分光法により明らかにした⁶⁾。

3. 光操作ツールの開発^{4,7)}

最後に、上記基礎的研究結果に基づく光操作ツールの開発を試みた(図2)。具体的には、耐熱性レチナルタンパク質・TRが、これまでのレチナルタンパク質に比べて、速い神経抑制応答活性を示すことを線形動物(線虫)を用いて明らかにした⁴⁾。また、新たに見出したアニオン輸送型イオンチャネル(ACR2)が、これまでのレチナルタンパク質に比べて、1000倍以上の極めて高い神経抑制活性を示すこと、細胞外ループに保存された塩基性アミノ酸であるArg84をGluに置換することでさらに10倍の活性上昇が見られることを明らかにした⁷⁾。このように分子の探索と解析という基礎に立脚した新しい光操作ツールの開発を行うことができた。

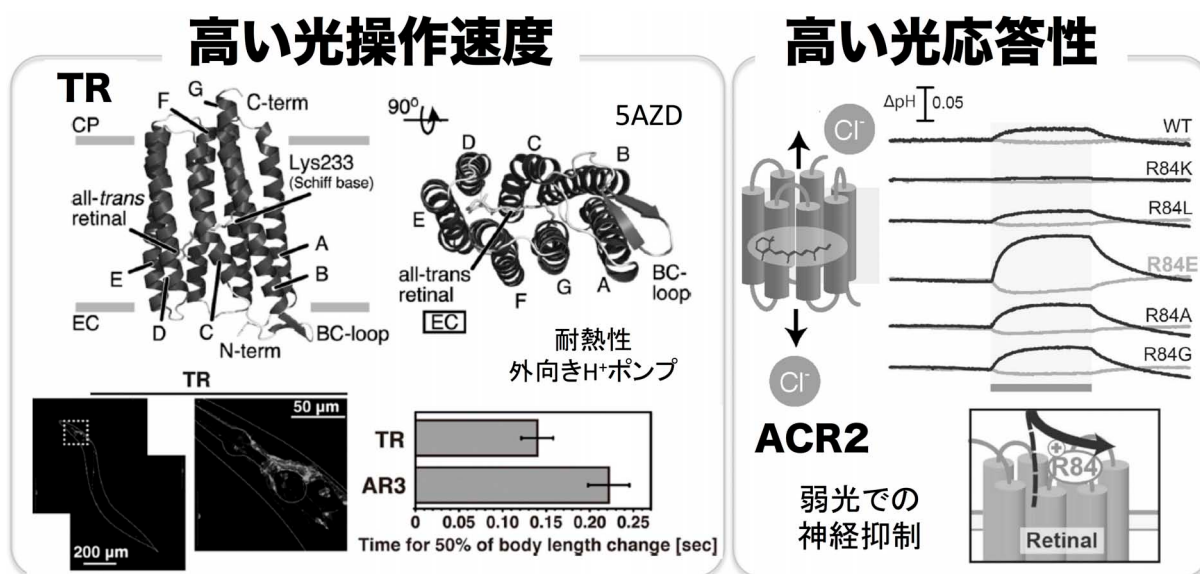


図2. レチナルタンパク質による光操作ツール開発

耐熱性レチナルタンパク質(TR)を用いた高い光神経抑制の実現(左)と、アニオンチャネル型レチナルタンパク質(ACR2)の変異体における高い光応答性(右)の実現。

以上、助成を頂いた1年間の間に、研究題目として掲げた「レチナルタンパク質によるボトムアップ型生体光操作」について、文献にあげた7報の原著論文を發表することができた。これにより、レチナルタンパク質の研究において世界と渡り合うための基盤をさらに強固なものにすることができた。

共同研究者

本研究の共同研究者は、文献中の研究室所属メンバーに加え、千葉大学の村田武士教授、京都大学の林重彦教授、神戸薬科大学の和田昭盛教授である。最後に研究室立ち上げの大事な時期に、本研究をご支援頂いた上原記念生命科学財団に深く感謝したい。

文 献

- 1) Sudo Y, Yoshizawa S. Functional and photochemical characterization of a light-driven proton pump from the gammaproteobacterium *Pantoea vagans*. *Photochem. Photobiol.* 2016;92(3):420-7. doi:10.1111/php.12585.
- 2) Kanehara K, Yoshizawa S, Tsukamoto T, Sudo Y. A phylogenetically distinctive and extremely heat stable light-driven proton pump from the eubacterium *Rubrobacter xylophilus* DSM 9941T. *Sci. Rep.* 2017;7:44427. doi: 10.1038/srep44427.
- 3) Niho A, Yoshizawa S, Tsukamoto T, Kurihara M, Tahara S, Nakajima Y, Mizuno M, Kuramochi H, Tahara T, Mizutani Y, Sudo Y. Demonstration of a light-driven SO₄²⁻ transporter and its spectroscopic characteristics. *J. Am. Chem. Soc.* 2017; 139(12):4376-89. doi: 10.1021/jacs.6b12139.

- 4) Tsukamoto T, Mizutani K, Hasegawa T, Takahashi M, Honda N, Hashimoto N, Shimono K, Yamashita K, Yamamoto M, Miyauchi S, Takagi S, Hayashi S, Murata T, Sudo Y. J. Biol. Chem. 2016;291(23):12223-32. doi: 10.1074/jbc.M116.719815.
- 5) Iyer ES, Misra R, Maity A, Liubashevski O, Sudo Y, Sheves M, Ruhman S. Temperature independence of ultrafast photoisomerization in thermophilic rhodopsin: assessment versus other microbial proton pumps. J. Am. Chem. Soc. 2016;138(38):12401-7. doi: 10.1021/jacs.6b05002.
- 6) Tsukamoto T, Yoshizawa S, Kikukawa T, Demura M, Sudo Y. Implications for the light-driven chloride ion transport mechanism of *Nonlabens marinus* rhodopsin 3 by Its photochemical characteristics. J. Phys. Chem. B. 2017;121(9):2027-2038. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b11101.
- 7) Doi S, Tsukamoto T, Yoshizawa S, Sudo Y. An inhibitory role of Arg-84 in anion channelrhodopsin-2 expressed in *Escherichia coli*. Sci. Rep. 2017;7:41879. doi: 10.1038/srep41879.