

# 論文の内容の要旨

## Structural and functional analysis of the light-gated cation channel, channelrhodopsin

(光駆動型カチオンチャネルである  
チャネルロドプシンの構造機能解析)

氏名 小田 和正

### 【研究背景】

多くの生物は光受容のためのタンパク質を有し、その中でもレチナール分子を発色団とするロドプシンはバクテリアからヒトまで広く保存されている膜タンパク質である。ロドプシンは7本の膜貫通ヘリックス (TM) から構成され、TM7 に保存されているリジン残基とレチナールがシッフ塩基結合を形成している。ロドプシンは動物型ロドプシンと微生物型ロドプシンに分類され、前者は G タンパク質共役型受容体として機能し、後者は光センサーやイオン輸送などの機能を有す。また、基底状態におけるレチナールの状態に関しても両者で違いがあり、前者は 11-*cis* レチナールに対し、後者は all-*trans* レチナール (ATR) となっている。

微生物型ロドプシンの中でも藻類のもつチャネルロドプシン (ChR: channelrhodopsin) は励起光を受容することで ATR が異性化し、複数の遷移状態を経由しながら構造変化を行い、最終的にはイオン透過孔を形成してカチオンチャネルとしての機能を示す。この ChR を神経細胞に発現させることで、光照射による神経細胞のコントロールが可能になった。この技術は光遺伝学と呼ばれ、神経学や医学など、幅広い分野で主要な研究手法になりつつある。ChR が光遺伝学のツールとして使用される中で、いくつかの問題が生じていた。その一つとして、光遺伝学のメインツールとして使用されているクラミドモナス由来の ChR である CrChR2 は組織透過性の低い短波長光を励起光としており、深部の組織に発現している CrChR2 には励起光が十分に届かないという問題が生じた。そのため、組織透過性が高い長波長光を励起光とする ChR が求められた。このような状況の中、2014 年にこれまでに最も長波長側に吸収ピークを持つ ChR である Chrimson が発見され、新たな光遺伝学のツ

ルとして注目を集めている。

このように ChR を用いた応用研究が行われる一方で、その分子基盤に関する理解は進んでいなかった。ChR の構造情報は他のロドプシン類と比較しても少なく、クラミドモナス由来の ChR のキメラである C1C2 の基底状態の構造のみ報告されている。この構造情報により ChR のイオン透過経路やイオン選択性などの基礎的な情報が明らかになったものの、多くの解明すべき点が残っていた。特に、(i) 吸収する励起光の波長 (ii) 励起光照射後の構造変化に関しては、光遺伝学の新規ツール開発という観点からも非常に重要であるにも関わらず、依然としてそれらの分子機構は不明であった。

## 【方法・結果】

### (i) ChR の吸収波長シフトに関する構造解析

多くのロドプシンにおいてシッフ塩基はプロトン化しており、そのプロトンを安定化するために近傍に負電荷をもった対イオンが存在している。この対イオンは ChR で広く保存されており、シッフ塩基に存在するプロトンとの相互作用がロドプシンの吸収波長に関わっていることが先行研究によって明らかにされている。C1C2 の構造情報により対イオンとシッフ塩基の相互作用様式は明らかにされたが、Chrimson と C1C2 の配列相同性は低く、Chrimson における相互作用様式等は不明であった。

そこで、長波長光を励起光とする Chrimson の結晶構造を決定し、短波長光を励起光とする C1C2 との構造比較を通して、ChR の吸収波長に関する分子基盤を解明することを目指した。発現系やコンストラクト、精製系を検討することで Chrimson の結晶化に成功し、大型放射光施設 SPring-8 にてデータを収集した。得られたデータを解析し、2.8 Å で構造を決定することに成功した。得られた構造を比較すると、Chrimson ではシッフ塩基周辺が Phe135 により疎水的な環境になっていた。これより、Chrimson の対イオン (E165, D295) は負電荷ではなく、プロトンが結合した中性電荷であることが示唆された。このプロトン化の違いが、ChR の吸収波長シフトに関与していると考察し、対イオンに関する変異体 (E165Q, D295N) を作製した。D295N の吸収波長が短波長側に大きく変化する一方で E165Q は小さい変化に留まった。これにより、Chrimson の長波長シフトは E165 のプロトン化が原因であり、ChR の吸収波長はシッフ塩基周辺の極性環境に依存して決定されることが明らかになった。解明した分子基盤に基づき、シッフ塩基周辺の極性をより疎水的にする変異 (S169A) を導入し、Chrimson の吸収波長をより長波長側にシフトさせた変異体を作成することに成功した (ChrimsonSA)。ChrimsonSA は ChR の中で最も長波長側に吸収ピークを持ち、複数の共同研究で光遺伝学のツールとして実際に使用されている。

### (ii) ChR の構造変化に関する構造解析

近年、X 線自由電子レーザー (XFEL) と呼ばれる技術の登場によって、分子の構造変化をフェムト秒の時間分解能で明らかにできる方法が開発された。時分割シリアルフェムト秒結晶構造解析 (TR-SFX: Time-Resolved Serial Femtosecond X-ray crystallography) と呼ばれるその方法では、光など特定の刺激と同期させつつ、高輝度かつフェムト秒オーダーのパルスを持つ X 線自由電子レーザーを微小結晶に照射して回折像を収集することで、結晶中での分子の構造変化を観察することができる手法であり、直接構造を観察できる手法の中では最も優れた時間分解能をもつ。この手法を用いて ChR の励起光照射後の構造変化を捉え、ChR のイオン透過孔形成機構に関する分子基盤を解明することを目指した。TR-SFX 測定では多量の微結晶が必要なため、収量が多く、精製法が確立されている C1C2 を標的とした。

まず、結晶中の C1C2 が励起光照射によって構造変化を起こすかを確認した。結晶に対する分光測定の結果、吸収波長の変化を捉えることに成功し、結晶中の C1C2 が励起光照射に

よって構造変化をすることが示唆された。次に、TR-SFX の測定に用いる C1C2 微結晶を得るための、新たな結晶化条件を探索した。約 10,000 条件を検討し、C1C2 の微結晶を多量に得ることに成功した。大型放射光施設 SACLA にて TR-SFX 測定を行い、励起光照射後の中間体の回折データを得ることに成功した。得られた回折データを処理し、基底状態のデータとの差分を取ることで、励起光照射後 1  $\mu$ s, 50  $\mu$ s, 250  $\mu$ s, 1 ms, 4 ms の構造変化を 2.8 Å 分解能で捉えることに成功した。1  $\mu$ s, 50  $\mu$ s では ATR が捻じれ、ATR に隣接する Cys167 が ATR に押される動きが観測された。250  $\mu$ s 以降ではこれらの構造変化に加え、ATR が結合している TM7 と押された Cys167 が存在する TM3 の動きも観測された。TM3, 7 はイオンチャンネルのゲート形成に関与しているとされ、これらの TM が動くことでゲートが開き、開状態になることが予想される。

### 【考察】

吸収波長に関しては現在、進化的知見や機械学習を用いた新たな ChR の探索や改変が行われており、今回得られた知見とそれらを組み合わせることで、さらなる長波長シフトを引き起こすことができるのではないかと考えている。構造変化に関しては、TR-SFX 測定により得られた結果を基に、動きが見られた TM 上に存在するアミノ酸残基に変異を導入した複数の変異体を作成した。これらの変異体の開閉時間を測定したところ、いくつかの変異体で野生型よりも開状態が長いことが明らかになった。これらの変異体が実際に光遺伝学の新たなツールになるか、現在検討を進めている。