

論文の内容の要旨

論文題目 光駆動性イオン輸送体の構造機能解析と
オプトジェネティクスへの展開
(Structural and functional analyses of light-gated ion transporters,
and the perspective of the development of new optogenetics tools)

氏 名 加藤 英明

微生物からヒトを始めとする高等真核生物まで、殆どあらゆる生物は光情報を利用して行動しているが、この光情報の受容は、多くの場合発色団としてレチナールと呼ばれる低分子を結合したロドプシンファミリータンパク質によって担われている。ロドプシンタンパク質はその立体構造の違いによって様々な機能を発揮するが、この中でも近年特に、イオン輸送体として働くロドプシンが、光によって細胞の膜電位を操作出来るツールとして注目を集めている(オプトジェネティクス)。本研究では、現在までに唯一の光駆動性イオンチャネルとして知られ、またオプトジェネティクスツールとしてもその地位を確立しているチャネルロドプシン(ChR)について、X線構造解析を用いてその立体構造を明らかにし、光駆動性イオンチャネルの分子機構に迫ろうと考えた。また、ChRの結晶構造からその性質、特に吸収波長特性を変化させた変異型 ChR を合理的に設計しようと試みた。更に、数ヶ月前に発見された初の光駆動性 Na⁺ポンプである KR2 についても、その立体構造を明らかにし、光駆動性 Na⁺ポンプの分子機構への理解を深めるとともに、そのオプトジェネティクスツールへの適用可能性について模索した。

光駆動性陽イオンチャネルである ChR の構造機能解析

ChR は 2002 年に Hegemann 博士らによって発見された光駆動性陽イオンチャネルであり、オプトジェネティクスの強力なツールとして、その発見以来注目を集め続けている。ChR は他の微生物型ロドプシンと同様、シッフ塩基を介して共有結合した *all-trans* レチナール (ATR) を発色団として持っている。光を吸収すると、この ATR が *13-cis* 型に異性化され、シッフ塩基の脱プロトン化、再プロトン化を経た後チャネルが開くことが知られていたが、その分子機構は勿論、イオン透過経路の位置すら不明であった。そこで本研究では、ChR の立体構造を X 線結晶構造解析の手法を用いて明らかにし、その分子機構に迫ることを試みた。はじめに、既知の ChR やその変異体、キメラを含む複数種の ChR について発現スクリーニングを行い、X 線結晶構造解析に適した *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 ChR1, ChR2 のキメラ(C1C2)を見出した。この C1C2 を発現精製し、近年注目を浴びている脂質キュービック相(LCP)法を用いて結晶化を行うことで、

C1C2 の閉状態(暗状態)における立体構造を 2.3 Å 分解能で決定した。位相決定は水銀原子の異常分散を利用した多波長異常分散法によって行うことが出来たが、これは LCP から得られた結晶について、新規に位相決定を行うことが出来た初の例であった。またこの過程で、副産物として LCP 法に最適化された結晶化スクリーニングキットのデザイン、開発を行うことが出来た (Molecular Dimensions 社より製品化中)。

得られた構造から、C1C2 は他の微生物型ロドプシンと同様 7 回膜貫通ヘリックス(TM)を持っているが、それに加えて細胞外、細胞内に特有のドメイン構造を有していることが分かった(図

1)。また ChR は、他の微生物型ロドプシンが 3 量体や 5, 6 量体を形成するのとは対照的に、細胞外ドメイン間の相互作用を介して 2 量体構造を形成していることが判明した。得られた構造を更に詳細に解析するため、現在までに最も研究が進んでいる微生物型ロドプシン、すなわち光駆動性 H⁺ポンプであるバクテリオロドプシン(BR)の結晶構造と比較したところ、C1C2 と BR では一次構造における相同性が 15%程度と低い

にも関わらず、両者の構造は ATR の結合位置を含めて、非常に良く一致していることが判明した。しかし、(先述したように)C1C2 には BR に存在しない細胞内外のドメインが存在していた点、C1C2 の TM1, 2 が BR と比較して外側に傾いていた点などいくつかの差異が見られた(図 2)。また、ChR や BR を含めたあらゆる微生物型ロドプシンでは、光を吸収するとまず

ATR の異性化反応が起こり、次いでシッフ塩基の窒素原子に結合していた H⁺が、カウンターイオンとして働く酸性アミノ酸に受け渡されることが知られていたが、今回得られた立体構造と電気生理学的解析を組み合わせることで、C1C2 では H⁺化シッフ塩基のカウンターイオンとして働いている Glu162, Asp292 のうち、Asp292 が主たる H⁺受容基として働いていることを明らかにすることが出来た。これは、BR において Asp292 に相当する Asp212 では無く、Glu162 に相当する Asp85 が主たる H⁺受容基として働いているのとは対照的であり(図 3), ChR2 において E123T 変異体 (E162T in C1C2)が機能を損なわずにオプトジェネティクスのツールとして用いることが出来ていることの説

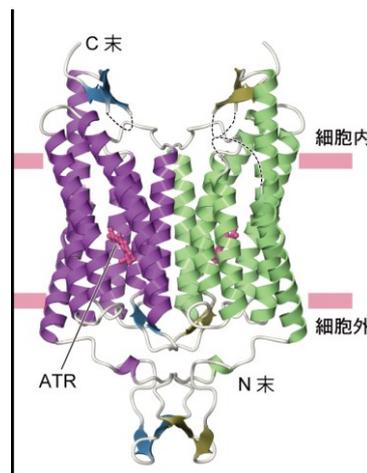


図 1 C1C2 の全体構造

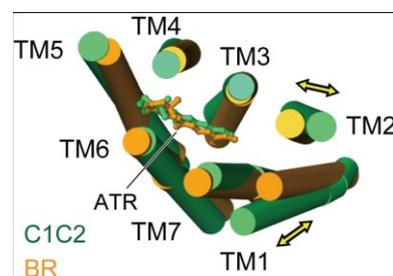


図 2 C1C2 と BR の全体構造比較

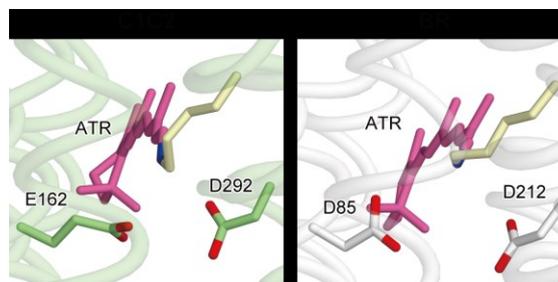


図 3 C1C2 と BR のシッフ塩基周辺の構造比較

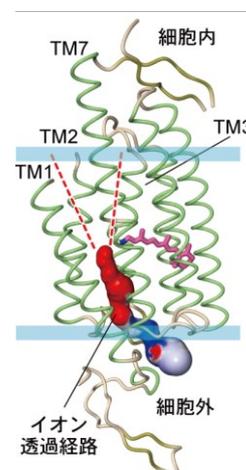


図 4 C1C2 のイオン透過経路

明にもなっていた。

更に、C1C2 の立体構造を元にその表面電荷を計算したところ、C1C2 の TM1, 2, 3, 7 によって囲まれた領域には、強い負電荷を帯びた空間が存在していることが分かった (図 4)。この空間は、先述した、BR と比較して外側に傾いている TM1, 2 によって形成された空間であったため、この空間は C1C2 特有のものであり、イオンの透過に重要である可能性が高いと考えられた。そこで、この経路上に存在するアミノ酸残基の変異体を複数作製し、そのチャネル活性を測定した。その結果、変異体のチャネル活性はどれも低下しており、また変異体によってはイオンの選択性まで変化することが判明した。これは ChR のイオン透過経路が TM1, 2, 3, 7 によって囲まれた領域に存在しているという考えを強くサポートするものであり、ChR のイオン透過経路が単量体の中に存在するか多量体の中心に存在するかという 10 年近くに渡って続けられてきた議論に事実上の決着をつけるものであった。以上の結果は、ChR の作動メカニズムについての理解を深めただけでなく、立体構造を元に、ツールとしてより有用な変異型 ChR を設計するための大きな助けとなることが期待される。

結晶構造を元に設計した短波長励起型 ChR の構造機能解析

ChR はオプトジェネティクスツールとして注目を集めているが、吸収波長、コンダクタンス、キネティクスなど、その性質面で改善すべき点は多い。本研究では、ChR の諸性質の中でも、特にその吸収波長に着目した。ChR の長波長シフト変異体としては、現在までに ReaChR, CIV1, Crimson など多数の報告がある一方、短波長シフト変異体については殆ど報告がない。そこで本研究では、前項で得られた C1C2 の結晶構造を元に、短波長励起型 ChR の合理的設計を試みた。

ロドプシンタンパク質の吸収波長は一般に 3 つの要因、すなわち、(1) シッフ塩基のカウンターイオンと H⁺化シッフ塩基との距離、(2) レチナール分子の平面性、(3) レチナール分子周辺の極性アミノ酸とレチナール分子間の静電相互作用、によって決定されてくると考えられている。(1), (3)のパラメータを変化させることで微生物型ロドプシンの吸収波長をシフトさせる試みは何例も報告されているが、(2)のパラメータを変化させる試みは殆ど行われていない。そこで、吸収波長シフト変異体の設計コンセプトとして新しい枠組みを提供するためにも、本研究では特に ATR の平面性を変化させるような変異を導入することによって短波長励起型 ChR のデザインを行うことにした。

前項で得られた立体構造を用いて ATR の結合ポケットを解析し、特に Thr198, Gly202 の側鎖の大きさと形状が、ATR のβイオン環の向きを決定していると考えた。そこで、βイオン環の向きを大きく回転させる狙いで、この 2 残基に変異を導入し、変異体のチャネル活性と作動スペクトルを測定した。その結果、この変異体はチャネル活性を保持しながらも作動スペクトルが 20 nm 程度短波長シフトしていることが判明した。そこで、この変異体を発現精製し、精製タンパクを用いて吸収スペクトルの測定と

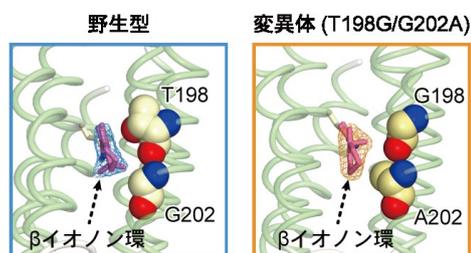


図 5 C1C2 と短波長励起型 C1C2 の比較

その結果、この変異体はチャネル活性を保持しながらも作動スペクトルが 20 nm 程度短波長シフトしていることが判明した。そこで、この変異体を発現精製し、精製タンパクを用いて吸収スペクトルの測定と

結晶化を試みた。結果、この変異体は吸収スペクトルにおいても 20 nm 程度の短波長シフトを実現しており、結晶構造においても確かに ATR のβイオン環が 140° 程度回転していることが明らかになった(図 5)。以上の結果は、ChR の吸収波長決定メカニズムの理解に繋がるだけでなく、既に存在する長波長シフト変異体と組み合わせることで、将来的には”異なる神経集団を任意のタイミングでそれぞれ興奮させる”という新しい実験デザインを可能にしてくれることが期待される。現在この変異体について、マウス神経細胞を用いてツール評価を行っている。

光駆動性 Na⁺ポンプである KR2 の構造機能解析

KR2 は、2013 年に海洋微生物 *Krokinobacter eikastus* から発見されたばかりの光駆動性 Na⁺ポンプであり、海洋微生物から単離された光駆動性 Na⁺ポンプとして生態学的な視点から、また初の Na⁺ポンプ型ロドプシンとしてロドプシンの進化的な視点からも着目されている。分光学的解析から、KR2 が ATR の異性化や H⁺シッフ塩基の脱プロトン化を伴う中間体状態を通じて Na⁺を輸送することや、高いイオン選択性を有していること(K⁺や Cs⁺といった他の一価陽イオンを輸送しない)が予想されているが、そのゲーティングやイオン選択性のメカニズムについては不明である。また、KR2 はこうした基礎研究面のみならず、外向き Na⁺ポンプとして、神経抑制ツールへの期待も持たれている。神経活動の抑制ツールとしては、主に内向き Cl⁻ポンプであるハロロドプシン (hR)、外向き H⁺ポンプであるアーキロドプシン 3 (Arch-3)が用いられているが、Cl⁻や H⁺と比較して毒性が低い Na⁺を輸送する KR2 は、hR や Arch-3 に変わる第 3 の抑制性ツールとして使用出来る可能性がある。そこで、本研究では光駆動性 Na⁺ポンプの作動メカニズムについての理解を深めるため、KR2 の結晶構造解析を試みた。KR2 の N、C 末端の配列を最適化した上でこれを培養精製し、LCP 法を用いて結晶化を試みたところ、2.2 Å という高分解能で暗状態における KR2 の立体構造を決定することに成功した(図 6)。得られた構造から KR2 は特徴的な 7TM ドメインの N 末端側に、他の微生物型ロドプシンには存在しないヘリックス構造を有していること、第 1 細胞外ループに特徴的な配向のβシート構造を有していることが判明した。先行研究において提唱されていた Na⁺の輸送経路は、細胞外側がこの N 末端のヘリックスによって塞がれており、また Na⁺の結合部位として報告されていた Asp98/Asp102 は、提唱されていた輸送経路から逸れる位置に存在していたことから、Na⁺はシッフ塩基近傍を通過した後、タンパクの中心部分を通って細胞外側に排出されるのでは無く、TM1 と TM2 の間を抜ける形で細胞外側に排出されるという新しい経路を提唱することに成功した。また、KR2 においてシッフ塩基からの H⁺受容基として働くと考えられていた Asp116 に関しても、結晶構造解析の結果からプロトン化状態の変化に伴い側鎖の向きが変化し、Na⁺の透過を促進する可能性が考えられた。今後は結晶構造を元に変異を導入した KR2 の機能解析を行うとともに、KR2 のツールとしての有用性を評価、検証していく。

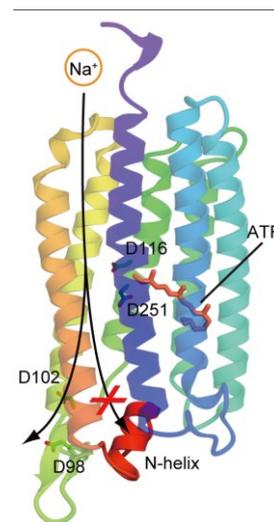


図 6 KR2 の全体構造と予測されるイオン透過経路