

論文審査の結果の要旨

氏名 加藤英明

本論文は4章からなる。序章はイントロダクションにあたり、本論文中で扱う光駆動性イオン輸送体についての概略および論文の概要、研究目的等が記述されている。第1章は、現在オプトジェネティクス技術において最も広く利用されている光駆動性陽イオンチャネル、チャネルロドプシン (ChR) の結晶構造解析について述べられている。ChR は青色の光を吸収すると一価や二価の陽イオンを非選択的に透過する陽イオンチャネルである。このタンパク質は、現在までに発見されている唯一の光駆動性イオンチャネルであり、オプトジェネティクスツールとして神経科学分野で広く用いられていることから高い注目を集めている。しかし、その分子機構に対する理解は遅れており、イオンの選択性や輸送機構のメカニズムはおろか、陽イオンの透過経路位置すら不明であった。本研究で論文提出者は、昆虫細胞を用いて ChRs のキメラタンパク質を多数発現させ、膜貫通ヘリックス (TM)1-5 までが *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 ChR1, TM6-7 が *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 ChR2 からなるキメラ C1C2 について、タンパク質を脂質中に再構成後結晶化を行う脂質キュービック相法(LCP 法)を用いることによって、構造決定に耐え得る結晶を得ることに成功した。そして、最終的に塩化メチル水銀を用いた多波長異常分散(MAD)法による位相決定を行なうことで、分解能 2.3 Å で構造を決定することに成功した。また、この過程において、LCP 法に最適化した結晶化キットをデザイン、作製することに成功している(Molecular Dimensions 社より MemMeso の名前でキットを販売中)。得られた構造は N 末端の細胞外ドメイン、TM3-4 同士の相互作用によって特徴的な二量体構造を形成していた。また、得られた構造情報と電気生理学的解析を組み合わせることにより、C1C2 のイオン透過経路の位置が、従来考えられていたように多量体の中心に存在するのではなく、単量体のシッフ塩基近傍に存在することを明らかにした。また、光サイクル中でシッフ塩基からプロトンを受け取るアミノ酸残基を同定するとともに、このイオン透過経路中には二つの狭窄部位が存在しており、狭窄部位中に存在するグルタミン酸が光サイクルの中間体状態において脱プロトン化することによりチャネル孔が広がるというモデルを提唱することに成功した。これらの結果は、ChR の発見以降 10 年間議論的になっていた ChR のイオン透過経路を同定し、長年の議論に決着を付けたのみならず、ChR の輸送機構を部分的に明らかにした点、ツールとして有用な ChR 変異体を設計する足がかりとしての構造情報を提供した点で、意義あるものと評価できる。

第2章では、1章で得られた構造情報を元に、ChR の短波長励起型変異体を合理的に設計する試みについて述べられている。発色団としてレチナールを結合するロドプシンの場合、吸収波長を決定する要因としては主に (1) レチナール周辺のアミノ酸残基の電荷 (2) 特にシッフ塩基と相互作用するカウンターイオンの電荷と距離 (3) レチナールの平面性(π 共

役系の長さ) の 3 要因が存在するが、そのうち(1) (2)については周辺のアミノ酸残基の電荷状態を変えるような変異を導入することで、波長シフト変異体が作製された前例が複数存在した。一方で、レチナールの平面性を乱すような変異体の合理的設計が行われた報告は殆ど存在しなかったため、本研究で論文提出者らは、C1C2 の立体構造を元に、特にレチナールのβイオン環結合部位の形状を変化させるような変異を合理的にデザインし、実際にその変異体(GA 変異体)の作製、活性評価、吸収スペクトル評価を行った。また、同変異体の構造解析を行うことで、実際にβイオン環が回転することによって吸収スペクトルが変化していることを実証した。更に、近年海洋性緑藻類から単離された短波長励起型 ChR である PsChR の配列を GA 変異体と比較することで、PsChR においてもβイオン環が回転していることを明らかにした。このことは、PsChR が微生物型ロドプシンとしては初の 6s-cys 型レチナールを結合するロドプシンであることを強く示唆していたばかりか、βイオン環結合部位の形状を変化させることで短波長励起型ロドプシンを作製するという戦略が進化的に見ても無理の無い物であることを示していた。そして実際、同戦略をオプトジェネティクスツールとして用いられているアーキロドプシン 3 (AR3)や、他の光駆動性プロトンポンプである HwBR, GR に適用したところ、それぞれ 50-100 nm 近い波長シフトを引き起こすことに成功した。以上の点から、同戦略はこれまで知られている微生物型ロドプシンに対して、そして今後発見されオプトジェネティクスへの適用可能性が検討されるであろう未だ見ぬ微生物型ロドプシンに対して適用可能な普遍的戦略であることが予想されており、ロドプシンの吸収波長決定メカニズムの理解を進展させた点、吸収波長シフト変異体を合理的に設計する際の新たなスキームを提供した点で、意義あるものと評価できる。

第 3 章では、2013 年に発見されたばかりの新しい微生物型ロドプシンである *Krokinobacter rhodopsin 2 (KR2)* の結晶構造解析について述べられている。KR2 はチャンネルロドプシンや他の微生物型ロドプシンとは異なり、初のナトリウムポンプ型ロドプシンである。現在までに知られているあらゆる微生物型ロドプシンは、イオン輸送経路の中央にシッフ塩基プロトンに由来する正電荷を持っているため、古くより、微生物型ロドプシンがプロトンポンプ以外の陽イオンポンプ能を獲得することは難しいだろうと考えられていた。そのため、KR2 がシッフ塩基の正電荷と輸送基質であるナトリウムイオンの電氣的反発をどのように克服しているのかという問題については、その発見当初より議論が行われており、実際の構造情報が待ち望まれていた。本研究で論文提出者らは、海洋性細菌 *Krokinobacter eikastus* 由来 KR2 を大腸菌組換えタンパク質として発現させ、LCP 法を用いて精製タンパク質の結晶化を行い、酸性条件において構造決定に耐え得る結晶を得ることに成功した。そして、最終的に他の微生物型ロドプシンであるキサントロドプシンの立体構造をサーチモデルとした分子置換法による位相決定を行なうことで、分解能 2.2 Å で構造を決定することに成功した。また、酸性条件で得られた結晶を中性条件の結晶化溶液に浸すことで、中性条件の立体構造を分解能 2.3 Å で決定することに成功した。これらの結

晶構造と分光学的解析を組み合わせることで、イオン輸送経路の新しい排出口を見出すとともに、”シッフ塩基近傍に位置するカルボン酸が光サイクル中でシッフ塩基よりプロトンを受け取り、その配向を変化させることで輸送経路中心から正電荷を遠ざけ、ナトリウムイオンの輸送を促進する”というモデルを提唱することに成功している。これは、微生物型ロドプシンにおいて今まで実現困難と考えられて来たナトリウムポンプという機能を **KR2** がどのように実現出来たのかという問いに答えを与える結果であり、ロドプシントタンパク質の進化にまで言及する重要な研究であると評価できる。

なお、本論文第1章は、Feng Zhang・Ofer Yizhar・Charu Ramakrishnan・西澤知宏・平田邦生・伊藤淳平・會田祐輔・塚崎智也・林重彦・Peter Hegemann・Andrés Daniel Maturana・石谷純一郎・Karl Deisseroth・濡木理との共同研究、第2章は神谷基司・伊藤淳平・Andrés Daniel Maturana・須藤雄気・石谷純一郎・林重彦・濡木理との共同研究、第3章は井上圭一・大野光・加藤善隆・吉住玲・吉澤晋・木暮一啓・石谷隆一郎・神取秀樹・濡木理との共同研究だが、論文提出者が主体となって、ChR, **KR2** の構造解析及び機能解析を行なったものであるため、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上の点から、論文提出者に対し、博士（理学）の学位を授与できるものと認める。