# 光駆動タンパク質ロドプシンの分子機能エンジニアリング

井上 圭一

# 微生物の光受容膜タンパク質微生物ロドプシン

我々ヒトを含む動物の視覚や、植物の光合成に代表さ れるように、数多くの生物が自身の生存のために、太陽 光を情報やエネルギー源として用いている.一方で、細 菌や古細菌などの単純な原核生物は、シアノバクテリア などが行う光合成以外に、そのような光利用は行わない と長年考えられていた.しかし.1971年に古細菌の一種 である Halobacterium salinarum より、動物の光受容体で あるロドプシンに似た、光受容型膜タンパク質の存在が 報告され、細菌や古細菌なども光エネルギーを利用して いることが見いだされた1). そして、この古細菌由来の 分子はバクテリオロドプシン(BR)と名付けられ、その 後の研究により、光エネルギーを用いて、細胞外側へ水 素イオン (H<sup>+</sup>) を能動的に輸送する、光駆動型の外向き  $H^+$ ポンプであることが明らかとなった $^{2)}$ . H. salinarum はBRが作り出したH<sup>+</sup>濃度勾配を利用して、酸素のな い環境下でもアデノシン三リン酸 (ATP) を作ることが できると考えられている<sup>3)</sup>. さらに、2000年には海洋に 広く存在する細菌の一種である Gammaproteobacteriaか らも、BRと同様にH<sup>+</sup>を輸送するロドプシンが見いださ れ、現在では光の透過する水深(有光層)の海洋に棲息 する50-70%の細菌類が同様のタンパク質を有してい ると考えられている<sup>4</sup>. これら微生物の持つロドプシン は、動物の視覚に関わるGタンパク質共役型受容体の一 種である動物ロドプシンとは進化的に異なる分子であ り、総称して「微生物ロドプシン」と呼ばれている.

微生物ロドプシンはすべて7本の膜貫通へリックスからなる基本構造を持ち、発色団としてビタミンAのアルデヒド誘導体である all-trans型レチナール色素が、7本目のヘリックス(TM7)上に保存されたリジン残基へSchiff塩基結合を介して結合している(図1). そしてレチナールが光を吸収すると 13-cis型へと光異性化し、それに応じてダイナミックなタンパク質の構造変化が誘起されることで、BRの $H^+$ 輸送に代表される分子機能が発現する  $^5$ ). BRを持つH. salinarum のさらなる研究によって、この種はBRの他に、塩化物イオン( $CI^-$ )を内向きに輸送するロドプシンや、細胞の走光性のセンサーとしてはたらくロドプシンを持つことが明らかとなっている  $^{6-9}$ ).

また、次世代シーケンサーの登場に代表される、ゲノム・メタゲノム解析技術の発展に伴い、近年多様な生物種から微生物ロドプシン様遺伝子が見いだされ、それらを大腸菌やホ乳類細胞、アフリカツメガエル卵母細胞を用いて異種発現することにより、新たな機能を持つ分子が続々と明らかとなっている。これらには遺伝子の発現制御や細胞内信号伝達物質の産生や分解に関わる酵素機能を光依存的に変化させるロドプシンなど、イオン輸送以外の機能を持つ分子も含まれる100、一方で、筆者らも海洋性の細菌などから外向きナトリウムイオン(Na<sup>+</sup>)ポンプ型ロドプシン(NaR)11)や内向きにH<sup>+</sup>をポンプするロドプシンを見いだしている12,13)。

その中で特に大きな注目を集めているのが Chlamydomonas reinhardtiiなど、真核微生物が持つチャネルロドプシン (ChR) である。ChRは $H^+$ や $Na^+$ などの陽イオンを電気化学ポテンシャルに従って、双方向に輸送する  $^{14,15)}$ . それまで知られていたイオンポンプ型のロドプシンは、すべて細胞内から陽イオンを汲み出す、もしくは陰イオンを汲み入れるものであり、外界に対する細胞内の膜電位を負に過分極させるはたらきを持つが、それとは逆にChRは膜電位を脱分極させる。したがって、動物の神経細胞へChRを異種発現し、光を照射することで、脱分極に伴う活動電位の誘発を起こし、神経興奮を人為的に制御することが可能となった  $^{16}$ . そして ChR 遺伝子を神経細胞種特異的なプロモーターと組み

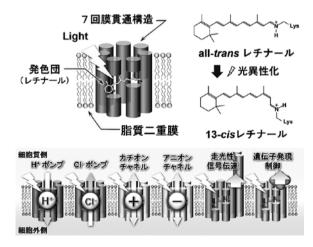


図1. 微生物ロドプシンの基本構造と発色団レチナールの光異性化(上). 主な微生物ロドプシンの分子機能(下).

合わせることで、脳神経ネットワークにおける個々の神経細胞のはたらきや、神経細胞間のつながりを光で調べる、オプトジェネティクス(光遺伝学)が実現され、神経生理学分野で数多くの新たな発見をもたらしている<sup>17-19</sup>. 一方、神経活動を光で抑制する過分極型ロドプシンについて、従来のイオンポンプ型ロドプシンよりも輸送能が大きな陰イオンチャネル型のロドプシン(ACR)が見いだされ、これによりきわめて弱い光での神経発火抑制が可能となっている<sup>20-22</sup>.

### K<sup>+</sup>. Cs<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシン

従来の抑制型のオプトジェネティクスツールにおいて は、H<sup>+</sup>輸送に伴う細胞内pHの変化や、Cl<sup>-</sup>イオンの蓄 積が問題となっている<sup>23)</sup>. これに対し、筆者らはNaR を用いることで、これらの副作用を起こさずに、神経抑 制が可能なことを示した $^{24)}$ . 一方、細胞内は $Na^+$ よりカ リウムイオン (K<sup>+</sup>) が豊富であることから、後者を輸送 した方がより効率的に膜電位を過分極させることができ ると期待される.しかし、野生型のNaRのイオン選択 性は厳密であり、Na<sup>+</sup>に対して0.4 Åしか大きさの変わ らないK<sup>+</sup>はまったく輸送されない<sup>11)</sup>. この高いイオン 選択性をもたらす構造要素を明らかにするため、NaR の結晶構造を調べたところ、イオンの取込側にあたる細 胞質側表面に、溶媒からタンパク質内部へと伸びる空隙 が存在することがわかった (図2). さらに、この空隙は Asp61およびGly263からなる,幅が狭まったボトルネッ ク構造を持ち、この部分で輸送するイオンサイズの上限 が決められているのではないかと仮説が立てられた.

そこで、Asn61 および Gly263 を別のアミノ酸へと変異したところ、G263W変異体において、野生型の NaR の $Na^{\dagger}$ 輸送とほぼ同程度の効率の、 $K^{\dagger}$ の輸送が見られた。 さらに N61P変異を加えることで、 $Na^{\dagger}$ よりも  $K^{\dagger}$ に高い選択性を示す分子が得られた。これらの結果から、細胞質側のこれら 2 残基によって、NaR のイオン選択性は決定されており、その構造をもとにアミノ酸変異を行うこ

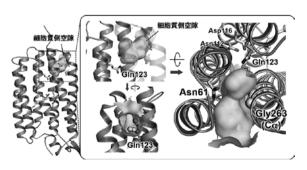


図2. NaRのイオン取込口としてはたらく細胞質側空隙

とで、自然界にはない $K^+$ ポンプ型ロドプシンが初めて実現された $^{24}$ )。そして、さらなるアミノ酸変異をスクリーニングすることで、N61L/G263Fにおいて、もっとも大きなアルカリ金属イオンであるセシウムイオン( $Cs^+$ )までが輸送可能となり、初めての $Cs^+$ ポンプ型ロドプシンとして報告された $^{25}$ )。これら構造情報をもとにデザインされた $K^+$ ポンプおよび $Cs^+$ ポンプ型ロドプシンは、今後より高精度なオプトジェネティクスツールや、光エネルギーを使って環境中から $Cs^+$ を回収するための分子ツールとしての応用が期待される。

## 内向き H<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシン

上で述べたように、イオンポンプ型の微生物ロドプシン はすべて膜電位を過分極させる方向へ、陽イオンや陰イオ ンを輸送するもののみであった. しかし. 筆者らは深海 800 mで採取された、深海性のAlphaproteobacteriaの一 種であるParvularcula oceaniが、ゼノロドプシン(XeR) と呼ばれる新しいタイプのロドプシンを持つことに着目 した $^{26}$ . そしてこの分子 (PoXeR) を大腸菌に発現させ、 イオン輸送能を測定したところ、細胞内へH<sup>+</sup>を能動輸 送する内向きH<sup>+</sup>ポンプ機能を持つことが明らかとなっ た<sup>12)</sup>. これはイオンポンプ型ロドプシンとしては初めて の、膜電位を脱分極させる方向にイオンを輸送する分子 であり、ATP合成のためのH<sup>+</sup>駆動力を打ち消すことに も相当することから、このようなタンパク質が自然界に あることは非常に大きな驚きであった. また. 内向き H<sup>+</sup>輸送を持つPoXeRを動物の神経細胞のシナプス小胞 やミトコンドリアなどに発現させることで、これらの細 胞小器官内のpHを光で制御することが可能な、新たな オプトジェネティクスツールとしての応用が期待され る. しかし、野生型のPoXeRのイオン輸送能はそれほ ど高くないことから、まず輸送経路を構成するアミノ酸 の性質について研究を行った.

その結果、PoXeRやそれに近縁な内向きH<sup>+</sup>ポンプ型



図3. PoXeR のタンパク質内部における H<sup>+</sup>輸送経路<sup>27)</sup>

ロドプシンにのみ、特徴的に保存された7番目のヘリックスの細胞質側にあるアスパラギン酸(図3中のAsp216)が内向き $H^+$ 輸送に重要であることが明らかとなった $^{27}$ )、そしてこのアスパラギン酸をグルタミン酸に変異したところ、3倍以上 $H^+$ 輸送能が向上された $^{12}$ )。今後実際に細胞小器官へこの分子を導入することで、小器官内のpHの光操作が可能になると期待される.

## ロドプシンの吸収波長の長波長化

一般に生体組織は可視光を強く散乱する.したがって. オプトジェネティクスによる生体操作において、操作光 が散乱されることによって、深部組織まで光が到達せず、 広い脳領域の操作が困難となることが問題となってい る. これについては、組織による散乱が少ない長波長光 に吸収を持つロドプシンを用いることで解決できると期 待され、新奇遺伝子スクリーニング<sup>28,29)</sup>や既存分子のア ミノ酸改変による長波長化<sup>30,31)</sup>. π電子共役系を拡張し たレチナールアナログの使用<sup>32-34)</sup>などが試みられてい るが、いまだ完全な問題の解決には至っていない、その 中で筆者らはNa<sup>+</sup>選択性の高いNaRの吸収波長を従来 のものより長波長化することを試みた. その際に参考と したのが、最近明らかとなった長波長吸収型チャネルロ ドプシンChrimsonの分子構造である<sup>35)</sup>. Chrimsonは 一般的なChRよりもかなり長波長の590 nmに極大吸収 波長 ( $\lambda_{max}$ ) を持つが、その構造を見るとレチナールの 頭部分に当たるβ-ionone環周辺に、ヒドロキシ基を持 つセリンやチロシンなどの残基が多く存在し、これらの 持つ双極子モーメントが、レチナールのπ電子のエネル ギー準位に影響を与えることが示唆された.

そこでこの知見を参考に、東京湾に棲息する海洋性細菌  $Krokinobacter\ eikastus$  より発見された、NaRの一種である KR2のレチナールの $\beta$ -ionone 環近傍にある複数の残基を、それぞれヒドロキシ基を持つ残基に変異したところ、6番目のヘリックス(TM6)上の Pro219 をスレオニンに変異することで、野生型よりも  $17\ nm$ の $\lambda_{max}$ の長波長化が見られた(図4) $^{36}$ .

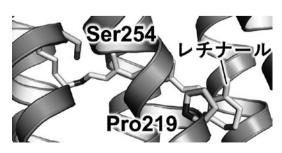


図4. KR2 Pro219 および Ser254

そしてさらにレチナールのSchiff塩基結合付近にある Ser254 をアラニンに変異した二重変異体 (KR2 P219T/ S254A)では、野生型と比べ40 nmの長波長化が達成さ れた. しかし、オプトジェネティクスツールとしての応 用を目指すうえでは、これらの変異によってイオン輸送 能の低下が起こってしまうと問題となる。そこで変異体 の輸送活性を評価したところ、野生型のKR2と変わら ないレベルのNa<sup>+</sup>輸送能が保持されていることが確認さ れた. したがって、KR2 P219T/S254Aは野生型KR2よ り、優れたオプトジェネティクスツールとなることが期 待される. この2つの変異によってレチナールの吸収が 長波長化した分子的メカニズムについて理解を得るた め、シエナ大学 Massimo Olivucci 教授らに量子化学計 算を行っていただいたところ、やはり変異したアミノ酸 の双極子モーメントの変化によって、レチナールのπ電 子のエネルギー準位が変化したことが原因であることが 理論的にも示された.

一方、KR2のPro219は微生物ロドプシン全体でも96%以上の分子に幅広く保存されており、同様の変異で他のロドプシンについても系統的に長波長化シフトできると期待される。実際に、PoXeRやオプトジェネティクス分野でよく用いられている内向きCl-ポンプであるNpHRについてもそれぞれ6-7 nmとKR2ほど顕著でないながらも、長波長シフトが確認された。したがって本手法を用いることで、今後ツールとして期待される他のロドプシンについても、同様に長波長化が行えると期待される³¹).

一方で筆者らは、より効率的に長波長吸収型のロドプ シンをデザインする手法の開発に取り組んでいる. その ような方法としてOM/MM計算に代表される量子化学 計算法による、新規分子の吸収波長計算とそれに基づい た分子デザインがあげられるが、計算コストが大きく, また、専門家でなければ計算の実施が難しいという側面 がある. これに対し筆者らは、より低コストで、誰にで も実施が容易な機械学習法の開発に取り組んでいる. そ のため過去40年以上の微生物ロドプシン研究で発表さ れた文献中に記載されている、500種類を超える微生物 ロドプシンとその変異体に加え、未発表のものとして独 自に有していた277種類の分子のアミノ酸配列と吸収波 長のデータベースを構築した. それに対して機械学習を 行い、7回膜貫通型構造の各位置において、20種類のア ミノ酸がどのように波長シフトに寄与するかを再現する 線型モデルを構築した<sup>38)</sup>. これにより新規な分子であっ ても、アミノ酸配列のみから、±7.8 nmの精度でその吸 収波長が予測可能となることが示された. また. 7回膜

貫通構造上で波長に影響を与える残基位置と、そこに 20種類の各アミノ酸が存在するときの吸収波長シフト の幅について知見が得られた. 今後はこの機械学習法に よる波長予測を行うことで、自然界から見いだされる新 奇遺伝子やアミノ酸改変体のスクリーニングにおいて求 められるコストを下げ、より効率的に長波長吸収型の分子デザインにつながることが期待される.

#### おわりに

かつて微生物ロドプシンは、微生物のさまざまな光生物学的生理現象を担う分子として、その分子機能や構造、物性が詳細に調べられた。また、7回膜貫通構造と発色団レチナールを共有し、多様な機能を発現することから、タンパク質の構造 - 機能相関を調べるためのモデル系としての研究が盛んに行われてきた。しかし、オプトジェネティクスの登場以降は、神経活動やその他の生理現象を操作する分子ツールとしての側面も着目されるようになり、より応用に向け理想的な性質を持つ分子の探索・開発が進められており、そこでは長年蓄積された分子メカニズムについての知見が大きな貢献を果たしている。

オプトジェネティクス分野においては、今のところ チャネルやポンプといった、イオン輸送型ロドプシンを 用いた研究がほとんどであるが、動物ロドプシンを用い たヘテロ三量体Gタンパク質シグナル経路の光操作<sup>39)</sup> や、近年見いだされた酵素型微生物ロドプシンによる細 胞内セカンドメッセンジャーの産生・分解の制御が新た な技術として注目されている<sup>10)</sup>. また、2018年に筆者 らは既存の微生物ロドプシン、動物ロドプシンのいずれ とも異なった。第3のロドプシンのファミリーであるへ リオロドプシン (HeR) があることを見いだし $^{40}$ . その 構造についても報告を行った<sup>41)</sup>. HeRの分子機能はい まだ未解明であるが、何らかのシグナル伝達系を制御す るための光センサーもしくは、 光依存的な酵素であると 考えられており、その機能が解明されれば、これまでと は異なった生理現象を操作するためのオプトジェネティ クスツールとなることが期待される.

また、これまでにロドプシンの構造をもとに機能の向上を試みた研究は、筆者らのものを含め数多くの例が存在するが、理想的なオプトジェネティクスツールの実現には、いまだ道半ばである。特にイオン輸送量や選択性は活性化状態にある分子の構造が重要となるため、それを明らかにする方法が必要とされる。これまでにも低温でロドプシンの結晶に光を照射し、特定の中間体を安定的に捉え、その構造を解析する低温トラップ法などが用いられ、数多くの重要な知見をもたらしてきた<sup>42,43)</sup>。さ

らに、近年登場したX線自由電子レーザー(XFEL)を用いることで、フェムト秒からミリ上以上の幅広い時間スケールにおける分子の構造変化を実時間計測することが可能となっており<sup>44,45)</sup>、また一般的なsynchrotron放射を用いる場合でも、ミリ秒オーダーの時間分解能であれば実時間計測が行える技術も報告されている<sup>46)</sup>、今後はこれらの技術を用い、機能状態にある分子の構造を明らかにすることで、より高機能の分子ツール開発へとつながると期待される.

#### 謝辞

本稿で紹介した筆者の関わる研究のほとんどは、前職において所属していた名古屋工業大学の神取秀樹教授ならびに神取研究室のスタッフや学生の方々とともに行ったものであり、その多大なるご尽力と、新たに筆者が東京大学物性研究所において主宰する研究室のメンバー、その他数多くの共同研究者の方々のご協力によって達成されたものである。これらすべての方々に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Oesterhelt, D. et al.: Nat. New Biol., 233, 149 (1971).
- 2) Oesterhelt, D. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 2853 (1973).
- 3) Pitard, B. et al.: Eur. J. Biochem., 235, 769 (1996).
- 4) Gómez-Consarnau, L. et al.: Sci. Adv., 5, eaaw8855 (2019).
- 5) Ernst, O. P. et al.: Chem. Rev., 114, 126 (2014).
- 6) Matsuno-Yagi, A. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 78, 237 (1977).
- 7) Schobert, B. et al.: J. Biol. Chem., 257, 10306 (1982).
- 8) Bogomolni, R. A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6250 (1982).
- 9) Takahashi, T. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 127, 99 (1985).
- 10) Mukherjee, S. et al.: Curr. Opin. Struct. Biol., 57, 118 (2019).
- 11) Inoue, K. et al.: Nat. Commun., 4, 1678 (2013).
- 12) Inoue, K. et al.: Nat. Commun., 7, 13415 (2016).
- 13) Inoue, K. et al.: Sci. Adv., 6, eaaz2441 (2020).
- 14) Nagel, G. et al.: Science, 296, 2395 (2002).
- 15) Nagel, G. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 13940 (2003).
- 16) Boyden, E. S. et al.: Nat. Neurosci., 8, 1263 (2005).
- 17) Liu, X. et al.: Nature, 484, 381 (2012).
- 18) Deisseroth, K.: Nat. Neurosci., 18, 1213 (2015).
- 19) Marshel, J. H. et al.: Science, 365, eaaw5202 (2019).
- 20) Wietek, J. et al.: Science, 344, 409 (2014).
- 21) Berndt, A. et al.: Science, 344, 420 (2014).
- 22) Govorunova, E. G. et al.: Science, 349, 647 (2015).
- 23) Mahn, M. et al.: Nat. Neurosci., 19, 554 (2016).
- 24) Kato, H. E. et al.: Nature, 521, 48 (2015).
- 25) Konno, M. et al.: J. Phys. Chem. Lett., 7, 51 (2016).
- 26) Tang, K. et al.: Mar. Genomics, 24, 211 (2015).
- 27) Inoue, K. et al.: J. Phys. Chem. B, 122, 6453 (2018).
- 28) Schneider, F. et al.: Annu. Rev. Biophys., 44, 167 (2015).

- 29) Govorunova, E. G. et al.: MBio., 2, e00115 (2011).
- 30) Prigge, M. et al.: J. Biol. Chem., 287, 31804 (2012).
- 31) Wen, L. et al.: PLOS ONE, 5, e12893 (2010).
- 32) Ganapathy, S. et al.: J. Am. Chem. Soc., 139, 2338 (2017).
- 33) Takayama, R. et al.: J. Phys. Chem. Lett., 9, 2857 (2018).
- 34) Herwig, L. et al.: Cell Chem. Biol., 24, 415 (2017).
- 35) Oda, K. et al.: Nat. Commun., 9, 3949 (2018).
- 36) Inoue, K. et al.: Nat. Commun., 10, 1993 (2019).
- 37) Kojima, K. et al.: J. Phys. Chem. Lett., 11, 6214 (2020).

- 38) Karasuyama, M. et al.: Sci. Rep., 8, 15580 (2018).
- 39) Airan, R. D. et al.: Nature, 458, 1025 (2009).
- 40) Pushkarev, A. et al.: Nature, 558, 595 (2018).
- 41) Shihoya, W. et al.: Nature, 574, 132 (2019).
- 42) Kouyama, T. et al.: Biophys. J., 108, 2680 (2015).
- 43) Kovalev, K. et al.: Nat. Commun., 11, 2137 (2020).
- 44) Nango, E. et al.: Science, 354, 1552 (2016).
- 45) Nogly, P. et al.: Science, 361, eaat0094 (2018).
- 46) Weinert, T. et al.: Science, 365, 61 (2019).