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

## 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<sup>1)</sup>. 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<sup>2)</sup>. 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<sup>+</sup>輸送に代表される分子機能が発 現する<sup>5)</sup>.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(CF)を内向きに 輸送するロドプシンを,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<sup>6-9</sup>.

# 井上 圭一

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<sup>10)</sup>.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)<sup>11)</sup>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<sup>12,13)</sup>.

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<sup>+</sup>やNa<sup>+</sup>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<sup>14,15)</sup>. 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<sup>16)</sup>. 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<sup>24)</sup>.一方、細胞内はNa<sup>+</sup>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<sup>+</sup>輸送とほぼ同程度の効率の、K<sup>+</sup>の輸送が見られた. さらにN61P変異を加えることで、Na<sup>+</sup>よりもK<sup>+</sup>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<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンが初めて 実現された<sup>24)</sup>. 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<sup>+</sup>) までが輸送可能となり,初めてのCs<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシ ンとして報告された<sup>25)</sup>. これら構造情報をもとにデザイ ンされたK<sup>+</sup>ポンプおよびCs<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>26)</sup>. 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<sup>+</sup>輸送に重要であることが明らかとなった<sup>27)</sup>. 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<sup>+</sup>輸送能が向上された<sup>12)</sup>. 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 (λ<sub>max</sub>)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)<sup>36</sup>.



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<sup>37)</sup>.

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<sup>40)</sup>. 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).
- 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).
- Matsuno-Yagi, A. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 78, 237 (1977).
- 7) Schobert, B. et al.: J. Biol. Chem., 257, 10306 (1982).
- Bogomolni, R. A. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6250 (1982).
- 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).
- 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).