

平成 30 年 4 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04363

研究課題名(和文) レチナルタンパク質を「知る・変える・役立てる」

研究課題名(英文) Investigation, modification and utilization of the retinal proteins

研究代表者

須藤 雄気 (Sudo, Yuki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10452202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンAのアルデヒド型であるレチナルを発色団とするタンパク質は、総称してレチナルタンパク質と呼ばれる。生物の三大ドメイン(動物・細菌・古細菌)に万を越える分子が広く分布し、様々な光依存性機能を担っている。このような生物学的興味に加え、近年レチナルタンパク質を利用し、細胞や個体の機能を光で操作する技術(光遺伝学)が確立してきた。本研究では、これまでの研究を礎に、レチナルタンパク質を様々な手法により根源的に理解し(知る)、その知見に基づいた分子機能の改変・創成を行い(変える)、さらには様々な生命科学研究に利用できる光操作ツールを開発する(役立てる)ことを目的とした研究を行い成果を挙げた。

研究成果の概要(英文)：Retinal protein, also called "rhodopsin", has a vitamin-A aldehyde as a chromophore. It is widely distributed in the three biological domains (animals, bacteria, archaea), and is responsible for various light-dependent functions. In addition to such biological interests, recently, the new technology called "optogenetics" which is a method for controlling biological activities by light, has been established as a collaborative work with the retinal proteins. In this research, based on the background, we investigated the retinal proteins fundamentally by using various methods. Then we modified the molecular properties to develop the novel optogenetics tools that can be widely utilized for scientific research.

研究分野：生物物理学

キーワード：生物物理学
膜タンパク質
ロドプシン レチナル 光遺伝学 オプトジェネティクス 生体分子 分子機械

1. 研究開始当初の背景

レチナルタンパク質は、7回膜貫通ヘリックスの中央に発色団レチナル(ビタミンAアルデヒド)を共有結合する光受容タンパク質で、動物の視覚や、微生物の走性・エネルギー産生など幅広い機能を司っている。このような機能を解明する生物学における基礎的興味に加えて、2005年に、レチナルタンパク質の光依存的イオン輸送能を利用した光脳神経活動制御法(オプトジェネティクス:光遺伝学)が開発され、応用面でも注目を集めている。

レチナルタンパク質は、遺伝子にコードされた分子であるため、任意の場所や時間で発現させることが可能で、非侵襲的かつ高い時空間分解能での制御が可能である。そのため、これまでの技術(薬剤、遺伝子破壊、遺伝子導入など)では難しかった解析が可能となった。世界的には、開発者を含む米国グループを中心に、哺乳動物における睡眠・学習・行動・記憶などの『高次生命現象への適用と解明』に主眼がおかれている。すなわち、世界の潮流は目的指向型(トップダウン的)研究と言える。

一方、代表者は、分子探索を通じ、世界で最も多種多様なレチナルタンパク質を持つ研究者である。また、様々な手法により機能発現機構の詳細を明らかにしており、レチナルタンパク質の多様性と可能性を深く理解してきた(知る)。また、『知る』ことにより、改変分子の作成や、天然には存在しない青色光受容分子の作成など、機能の改変・創成を実現してきた(変える)。加えて、『知る・変える』ことで、生体運動を光で操作するツールの開発にも成功している(役立てる)。これにより、ロドプシン研究の世界的トップランナーの一人として認められている。

2. 研究の目的

このような背景のもと、本研究では、ロドプシン分子の根源的理解に立脚し、様々な特性を持った分子を開発するボトムアップ的研究により、広く生命科学者全般が利用できるツールの開発を行うことを目的とした。具体的には、以下に示す3つの目的を設定した。

(1)「知る」:レチナルタンパク質を様々な手法により根源的に理解する。

(2)「変える」:上記(1)で得られた知見に基づいた分子機能の改変・創成を行う。

(3)「役立てる」:上記(1)(2)に立脚し、様々な生命科学者に利用できる光操作ツールを開発する。

3. 研究の方法

本研究は、レチナルタンパク質分子を知る・変える・役立てることで、基礎から応用を目指すボトムアップ型研究である。具体的

には、自然界から新しいレチナルタンパク質を探索し、様々な手法により分子機構を解析することで根源的に理解する(知る)。次に、得られた知見、およびこれまでの成功例に基づき、合理的な分子機能の改変・創成を行う(変える)。さらに、これらを礎に生体内の様々な反応を光により可逆的に操作する(役立てる)。このようなボトムアップ的なツール開発を通じ、生物物理学、神経科学を含む幅広い生命科学研究に貢献することを計画した。以下、3つの研究項目に分けて方法を記載する。

(1)「知る」:新しい生物種から新しい性質を持った分子の単離を行った。具体的には、好酸環境、高温環境、特殊溶液環境から、それぞれ耐酸性、耐熱性、特異なイオン輸送性を持った分子をゲノムデータ上もしくは研究協力者が持つ未公開遺伝子情報を駆使して抽出した。それらを、大腸菌や動物細胞、酵母などで組み換え体として発現させ、光依存的な機能・性質解析を行った。

また、得られた分子を含む様々なロドプシンを対象に、分光学的手法を中心に機能と構造を徹底的に解析した。具体的には、時間分解測定を、吸収・蛍光・振動分光法により行い、空間分解測定は、X線結晶構造解析、溶液/固体NMR分光法により行った。これらは、研究協力者の助力を得て行った。

(2)「変える」:はじめに色(吸収極大波長)の改変を行った。代表者が豊富に保持する様々なロドプシンのアミノ酸配列比較を行い、高次構造情報も参照しながら、カラーチューニングに寄与すると思われるアミノ酸残基を絞り込んだ。これらの部位について、遺伝子工学的手法を用いて変異体を作製し、可視吸収スペクトルの測定から色変化を確認した。

次に、イオン透過機能に着目した改変を試みた。具体的には、ロドプシンには、イオンを濃度勾配に逆らって輸送する「ポンプ」と濃度勾配に従って輸送する「チャネル」の機能を持つ分子が存在することに注目し、それぞれの活性をスイッチさせると考えられる部位を、様々なロドプシンのアミノ酸配列比較と高次構造情報から絞り込んだ。これらの部位について、遺伝子工学的手法を用いて変異体を作製し、発現細胞を用いて光依存的pH変化測定と電気生理学的実験により、ポンプ能あるいはチャネル能を解析した。

また、タンパク質側のみならず、発色団レチナルに着目した改変も試みた。具体的には、共役長を伸ばしたアナログを合成し、大腸菌や動物細胞等に取り込ませ、その光依存的性質変化を様々な手法により解析した。

得られた結果は、研究協力者の助力を得て、理論計算をもとに考察した。

(3)「役立てる」:生体機能を「操る」ことで、

様々な分野で利用できるツールの開発を目指して研究を行った。微生物細胞や動物細胞 (HEK293) に加え、動物個体のモデルとして線虫を用いた解析を行った。

具体的には、(1) で知り、(2) で変えた分子のうち、色変異体を導入し、光依存的神経抑制と神経興奮を測定した。また、人工的に創成したイオンチャネルやレチナールアナログを導入し、生化学的ならびに細胞生物学的解析を行うことで、光依存的な細胞・個体の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) 「知る」: 様々な新規分子の同定に成功するとともに、精密な解析により、分子機能の詳細を明らかにすることができた (主に論文文化された成果を記載)。

カチオンチャネル型ロドプシン (ChR) の大腸菌発現系の構築に成功し、欠変異体解析から、水溶性の N および C 末端ドメインがイオン透過活性に重要であることを明らかにした [Photochem. Photobiol. Sci., 2015]。

植物と共生する真正細菌より、外向きプロトンポンプ型ロドプシンを発見し、PvR と命名した。PvR は緑色光で生物のエネルギー通貨である ATP を合成することが可能であり、青色光・赤色光で ATP や糖を合成する植物と共存していることが明らかとなった [Photochem. Photobiol., 2016]。

海洋性の真正細菌より見つかったクロライドポンプについて、そのイオン輸送メカニズムを提案した [J. Phys. Chem. B, 2017]。

イギリスのカーペット工場の熱水廃液から発見された真正細菌由来のロドプシンを RxR と命名した。RxR は外向きのプロトンポンプとして機能することを明らかにするとともに、これまで見出されたロドプシンの中で最も熱に対して安定なものであることを明らかにした [Sci. Rep., 2017b]。

硫酸濃度の高い (数百 mM) スイスの岩場に生息するシアノバクテリアから、新奇ロドプシンを見出し SyHR と命名した。SyHR は二価アニオンである硫酸イオンを輸送するロドプシンであることを明らかにした。これまで、ロドプシンの基質イオンは一価かつ小型のものに限られており、これまでの常識を覆す発見となった [J. Am. Chem. Soc., 2017]。

日本海の表層に生息する真正細菌から内向き (細胞外→細胞内) プロトンポンプ型ロドプシンを見出し RmXeR と命名した。また、種々の分光学的解析からその輸送メカニズムを提案した [Phys. Chem. Chem. Phys., 2018]。

(2) 「変える」: 機能や性質の改変体の創成に成功した (主に論文文化された成果を記載)。

アニオンチャネル型ロドプシン (ACR) を見出し、大腸菌における機能的発現系の構築に成功した。さらに、塩基性アミノ酸への網羅的変異導入により、保存された Lys 残基 (R84) を酸性アミノ酸 (E) に置換することで、そのアニオン透過活性を大きく (10 倍程度) 上昇させることに成功した [Sci. Rep., 2017a]。

ロドプシンの網羅的比較解析から、種々の物理化学的安定性を決める部位の抽出に成功し、ロドプシンの人工的な安定化に道筋を付けた [Chem. Phys. Lett., 2017]。

実験と理論を融合することで、レチナールのイオン環回転による共役系の短縮によるロドプシンの大幅な青色化 (短波長化) に成功した [Nat. Commun., 2015]。

(3) 「役立てる」: 神経活性制御や新奇材料開発などに成功した (主に論文文化された成果を記載)。

光反応の速く、安定なロドプシン (TR) を用いてこれまでより 1.5 倍速い神経抑制を実現した [J. Biol. Chem., 2015]。

開発したカラーバリエーションを用いて、青色光での神経抑制ならびに神経興奮を実現した [Nat. Commun., 2015]。

生体分子を使った工学利用として、ロドプシンを材料としたフォトディテクターの開発に成功した [Langmuir, 2015, Chem. Commun., 2015]。

有機的なボトムアップ型研究による光操作研究の新展開

七色を呈するレチナールタンパク質を

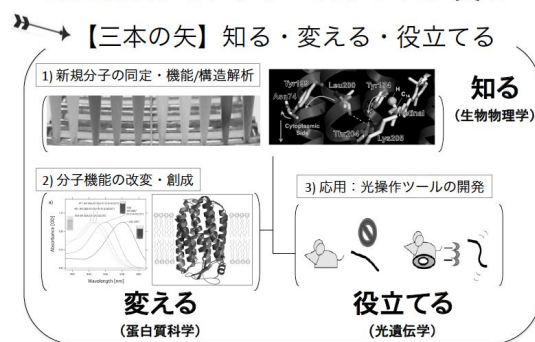


図 1. 本研究で取り組んだ 3 つの課題と成果

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計20件)

Inoue S, Yoshizawa S, Nakajima Y, Kojima K, Tsukamoto T, Kikukawa T, & Sudo Y. "Spectroscopic characteristics of *Rubricoccus marinus* xenorhodopsin (*RmXeR*) and a putative model for its inward H⁺ transport mechanism" (2018) Phys. Chem. Chem. Phys. 20, 3172-3183. 査読有.
DOI : 10.1039/c7cp05033j.

Niho A, Yoshizawa S, Tsukamoto T, Kurihara M, Tahara S, Nakajima Y, Mizuno M, Kuramochi H, Tahara T, Mizutani Y, & Sudo Y. "Demonstration of a light-driven SO₄²⁻ transporter and its spectroscopic characteristics" (2017) J. Am. Chem. Soc. 139, 4376-4389. 査読有.
DOI : 10.1021/jacs.6b12139.

Kanehara K, Yoshizawa S, Tsukamoto T, & Sudo Y. "A phylogenetically distinctive and extremely heat stable light-driven proton pump from the eubacterium *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941^T" (2017) Sci. Rep. 7, 44427. 査読有.
DOI : 10.1038/srep44427.

Doi S, Tsukamoto T, Yoshizawa S, & Sudo Y. "An inhibitory role of Arg-84 in anion channelrhodopsin-2 expressed in *Escherichia coli*" (2017) Sci. Rep. 7, 41879. 査読有.
DOI : 10.1038/srep41879.

Tsukamoto T, Mizutani K, Hasegawa T, Takahashi M, Honda N, Hashimoto N, Shimono K, Yamashita K, Yamamoto M, Miyauchi S, Takagi S, Hayashi S, Murata T, & Sudo Y. "X-ray crystallographic structure of thermophilic rhodopsin: implications for high thermal stability and optogenetic function" (2016) J. Biol. Chem. 291, 12223-12232. 査読有.
DOI : 10.1074/jbc.M116.719815.

〔学会発表〕(計22件)

須藤雄気 "光受容タンパク質ロドプシンの機能多様性とそれに基づく生命機能の人工光操作" 日本化学会第98春季年会, 日本大学理工学部船橋キャンパス(千葉県船橋市), 2018年3月20日.

須藤雄気 "Diversity of microbial rhodopsins and their applicability for optogenetics" 比較生理生化学会, 福岡大学(福岡県福岡市), 2017年11月25日.

Sudo Y. "Diversity and applicability of microbial rhodopsins" The 8th Asia and Oceania Conference for Photobiology

(AOCP), Nov 15, 2017, Seoul, Korea.

須藤雄気 "レチナールタンパク質を基盤とした光遺伝学ツール開発" 日本薬学会第135年会シンポジウム「生命現象の時空間的操作・観察のための光スイッチ分子の大拡張」, 仙台国際センター(宮城県仙台市), 2017年3月27日.

須藤雄気 "Towards production of retinal protein-based optogenetic tools" 第54回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場(茨城県つくば市), 2016年11月26日.

須藤雄気 "発色団に着目したロドプシンの機能変換による光操作ツールの開発" 第8回光操作研究会, 慶応大学(東京都港区), 2016年9月30日.

Sudo Y. "A rich diversity of microbial photoactive retinal proteins with a wide variety of biological functions" The 7th Asia and Oceania Conference for Photobiology (AOCP), Nov 18, 2015, Taipei, Taiwan.

須藤雄気 "微生物光受容レチナールタンパク質の多様性と可能性を探る" 光化学討論会・光生物関係シンポジウム, 大阪市立大学(大阪府大阪市), 2015年9月9日.

〔図書〕(計3件)

須藤雄気 "オプトジェネティクス" (2016) 光と生命の事典, 日本光生物学協会編 [朝倉書店], 372-373.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/bukkka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 雄気 (SUDO, Yuki)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科 (薬学系)・教授

研究者番号：10452202

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

塚本 卓 (TSUKAMOTO, Takashi)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科 (薬学系)・助教

研究者番号：30744271

(4) 研究協力者

なし