

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06109

研究課題名(和文) 今までにない高時間レベルでイオンポンプ型ロドプシンのイオン輸送を測る

研究課題名(英文) Investigation of ion-pumping rhodopsins with a high-time resolution

研究代表者

角田 聡 (Tsunoda, Satoshi)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00598857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：光駆動型イオンポンプであるロドプシン分子によるイオン輸送を、今までにないマイクロ秒オーダーの時間分解で測定するため、本研究では電気生理学的手法にナノ秒フラッシュレーザーを組み合わせた。これにより、サブマイクロ秒オーダーの高い時間分解能で、かつ電気化学ポテンシャル差を正確に制御し、ロドプシンの光反応を1回のみ誘起した際のイオン輸送を測定することに成功した。そして輸送速度、輸送量を定量的に解析することで、光反応サイクルにおける水素イオンや、ナトリウムイオン輸送機構の解析を行った。そして、そのイオン輸送活性に対する細胞のpH環境やナトリウムイオンの影響を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高い時間分解能におけるイオン輸送計測から、イオン輸送の詳細な機構が明らかになった。また、合計9種類のイオンポンプロドプシンによるイオン輸送を初めて体系的に同条件で計測することで、イオン輸送に対する細胞環境の効果を検証し、ポンプ間での特性の違いを見出すことに成功した。これらの知見は光遺伝学等における光受容体を利用した生命の光操作技術や医療応用を技術応用への基盤となると期待される。

研究成果の概要(英文)：Ion transport properties of various microbial rhodopsin were investigated under a high-time resolved condition by combining electrophysiology with a flash laser. Single turnover reaction of sodium ion transport by KR2, a sodium pumping rhodopsin was recorded. Kinetic analysis revealed that the turnover rate was 10 times faster than reported value obtained under multiple turnover conditions, suggesting two distinct reaction pathways in the KR2 photocycle. Moreover, ion transport of 9 different proton pumping rhodopsins were systematically tested in conventional patch-clamp recording. The pumping activity of those are pH- and membrane-voltage dependent. Data revealed that the pH at the proton exclusion side largely affect the proton transport.

研究分野：生物物理学

キーワード：ロドプシン 電気生理学 光遺伝学 イオンポンプ 光受容体 イオンチャネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体膜に存在するイオンポンプ分子は化学エネルギー等を消費して膜内外のイオン濃度勾配に逆らって一方向にイオンを能動輸送することで電気化学ポテンシャル差を作り出す。その中でも光駆動型イオンポンプである微生物ロドプシンは、7回膜貫通型の膜タンパク分子で発色団として all-*trans* 型レチナールを分子内に結合している。光吸収に伴った一連の光サイクル反応によってイオンを能動輸送する。つまり光エネルギーを電気化学ポテンシャルに変換する。これらポンプ型ロドプシンには、プロトンを輸送するバクテリオロドプシン(以下 BR)や塩化物イオンを輸送するハ口ロドプシン、近年発見されたナトリウムイオンを輸送する KR2 等が知られている。

このようなポンプ型ロドプシン分子のイオン輸送駆動力(電気化学ポテンシャル差に対抗してイオン輸送する力)はどの程度か? BR やハ口ロドプシンの長年にわたる研究においてもこの疑問に明確に答える研究は限られていた。

また、生体膜内外の電気化学ポテンシャル差は、膜電位差とイオン濃度勾配の二成分から構成され、これらは熱力学的には等価である。しかし、ポンプ型ロドプシンにとってこれら2成分は実際に等価なのか不明であった。

2. 研究の目的

そこで上記課題を解決する事を目的に、本研究では、細胞内外イオン環境を正確にコントロールし、かつ膜電位固定により細胞膜電位も自在に制御した条件で、ポンプ型ロドプシンの1サイクル当たりのイオン輸送測定を行うことで、エネルギー変換メカニズムの理解に迫る。

3. 研究の方法

イオンポンプ輸送活性測定には pH 指示薬やイオン指示薬等を用いたアッセイが簡便であった。しかしこの系は時間分解能が秒~分オーダーと非常に低い。従って、数十ミリ秒で1反応サイクルが完結するようなイオン輸送過程を精度よく観察する手法としては歯が立たない。

一方、既に試みられている電気生理学的手法を用いると、ミリ秒程度の比較的高い時間分解能での輸送測定が可能であり、かつ膜電位も正確に固定可能であるため電気化学ポテンシャル差の制御も可能である。申請者本人がすでに報告した先行研究においては、数百ミリ秒~数秒程度のパルス光に応答するイオン輸送電流を測定することに成功している (Tsunoda et al. 2006, Biophys. J.)。しかしこの系の問題点は、細胞内のイオン濃度等の溶液環境が不確実なことである。これはアフリカツメガエル卵母細胞の用いた2電極電位固定法を用いたためであった。

本研究では哺乳類細胞での電気生理学計測を行った。これにより、細胞内外のイオン環境、膜電位を正確に制御した条件でのイオン輸送測定が可能となる。さらにナノ秒フラ

パルスレーザーをロドプシン分子の励起用光源として用いることで光反応 1 サイクルのみの活性化を試みた。イオンポンプ測定においてこのような計測はいまだ行われていない。

4 . 研究成果

系統的なイオンポンプ輸送の理解を目指し、外向きプロトンポンプ 6 種と内向きプロトンポンプ 3 種の電気生理学によるイオン輸送測定を試みた。各分子には輸送活性の pH 依存性、膜電位依存性等に顕著な差が存在した。このことから、同じ外向きプロトンポンプであったとしてもその輸送機構は異なり、タンパク質内部のプロトン移動の様式には多様性があることが示唆された。さらに各ロドプシン分子のアミノ酸配列比較から、pH 依存性に寄与するアミノ酸残基を予測し、変異体の活性計測から重要アミノ酸を同定した。本研究の一部は Science Advances 誌に報告した(Inoue et al. Sci. Adv. 6(15):eaaz2441, 2020)

一方、ナトリウムポンプロドプシン KR2 のシングルターンオーバーあたりの輸送測定を行ったが、その結果をもとにイオンポンプとしてのポンプの駆動力を見積り、さらに速度論的解析を試みた。ナトリウムイオン輸送の速度定数はナノ秒パルスレーザー光照射と定常光照射とでは 10 倍程度異なり、前者の方が速い反応をとらえていた。本研究により、KR2 のナトリウム輸送反応サイクルには、2 種の経路が存在することが示唆された。この成果は本年度 PlosOne 誌に発表した(Hososhima et al. **PLoS One**. 16(9):e0256728. 2021)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Tashiro R, Sushmita K, Hososhima S, Sharma S, Kateriya S, Kandori H, Tsunoda SP.	4. 巻 4
2. 論文標題 Specific residues in the cytoplasmic domain modulate photocurrent kinetics of channelrhodopsin from <i>Klebsormidium nitens</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01755-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Keiichi Inoue, Satoshi P. Tsunoda, Manish Singh, Sahoko Tomida, Shoko Hososhima, Masae Konno, Ryoko Nakamura, Hiroki Watanabe, Paul-Adrian Bulzu, Horia L. Banciu, Adrian Andrei, Takayuki Uchihashi, Rohit Ghai, Oded Beja, Hideki Kandori	4. 巻 6
2. 論文標題 Schizorhodopsins: A novel family of rhodopsins from Asgard archaea that function as light-driven inward H ⁺ pumps	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaaz2441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aaz2441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 H. Kandori, K Inoue, S. P. Tsunoda	4. 巻 118
2. 論文標題 Light-Driven Sodium-Pumping Rhodopsin: A New Concept of Active Transport.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem Rev.	6. 最初と最後の頁 10646-10658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrev.7b00548	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 R. Takayama, A. Kaneko, T. Okitsu, S. P. Tsunoda, K. Shimono, M. Mizuno, K. Kojima, T. Tsukamoto, H. Kandori, Y. Mizutani, A. Wada, Y. Sudo	4. 巻 9
2. 論文標題 Production of a Light-Gated Proton Channel by Replacing the Retinal Chromophore with Its Synthetic Vinylene Derivative.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Phys Chem Lett	6. 最初と最後の頁 2857-2862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.8b00879	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 A.Pushkarev, K. Inoue, S. Larom, J. Flores-Uribe, M. Singh, M. Konno, S. Tomida, S. Ito, R. Nakamura, S. P. Tsunoda, A. Filosof, I. Sharon, N. Yutin, E. V. Koonin, H. Kandori, O. Béacute;jà	4. 巻 558
2. 論文標題 A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 595-599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-018-0225-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hososhima S, Kandori H, Tsunoda SP.	4. 巻 16
2. 論文標題 Ion transport activity and optogenetics capability of light-driven Na ⁺ -pump KR2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0256728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0256728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 奥山あかり、細島頌子、角田聡、神取秀樹
2. 発表標題 Electrophysiological analysis of various proton pump rhodopsins
3. 学会等名 日本生物物理学会第59回年会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥山あかり、細島頌子、角田聡、神取秀樹
2. 発表標題 様々な内向きおよび外向きプロトンポンプロドプシンへの電気化学ポテンシャル勾配の影響
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第47回討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoshi Tsunoda
2. 発表標題 Molecular function and structural properties of Rh-PDE
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rintaro Tashiro, Kumari Sushmita, Suneel Kateriya, Hideki Kandori, Satoshi Tsunoda
2. 発表標題 Importance of the C-terminal region in cation channelrhodopsin Ts_Rh3
3. 学会等名 日本生物物理学会第58回年会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川和季、細島頌子、角田聡、神取秀樹
2. 発表標題 CNGチャネルを用いた高時間分解での酵素ロドプシンの機能計測系の確立
3. 学会等名 日本生物物理学会中部支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥山あかり、細島頌子、角田聡、神取秀樹
2. 発表標題 プロトンポンプロドプシンの駆動力の比較
3. 学会等名 日本生物物理学会中部支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉浦雅大、角田聡、日比正彦、神取秀樹
2. 発表標題 ロドプシンフォスホジエステラーゼ (Rh P D E) の非対称的 pH 効果
3. 学会等名 日本科学会 CSJ フェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角田聡、細島頌子、神取秀樹
2. 発表標題 Electrophysiological study and Optogenetics application of inward-directed proton-pumping rhodopsin, NsXeR
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角田聡
2. 発表標題 酵素型ロドプシンの分子機構と光遺伝学への応用
3. 学会等名 物性研ワークショップ「レチナルタンパク質の光機能発現の物理と科学」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角田聡
2. 発表標題 「酵素型ロドプシン：細胞内シグナル伝達を光で操る」
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角田聡
2. 発表標題 「光駆動型イオンポンプとイオンチャネルがイオンを輸送する仕組み」
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー「構造情報に基づいた膜イオン輸送タンパク質の生理機能の解明に向けて」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角田聡 神取秀樹
2. 発表標題 「生体エネルギーを浪費する光駆動内向きプロトンポンプロドプシン」
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第45回討論会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 細島頌子, 角田聡, 神取秀樹	4. 発行年 2022年
2. 出版社 NTS社	5. 総ページ数 印刷中
3. 書名 オプトジェネティクス 医用工学HB_2編_1章-6	

1. 著者名 Tsunoda SP, Sugiura M, Kandori H	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 153-165
3. 書名 Optogenetics “ Chapter 9 Molecular properties and optogenetics application of enzymehodopsins ”	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
インド	Jawaharlal Nehru大学			
イスラエル	Technion-Israel Institute of Technology			