

令和 2 年 4 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14658

研究課題名（和文）イオン輸送型ロドプシンのアミノ酸変異による輸送方式の変換とその分子機構の解明

研究課題名（英文）Mutual conversion of ion-pump and ion-channel rhodopsins by amino acid replacement

研究代表者

塚本 卓（Tsukamoto, Takashi）

北海道大学・先端生命科学研究院・助教

研究者番号：30744271

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：微生物の光受容タンパク質・ロドプシンのうち、アニオンポンプ型およびアニオンチャンネル型ロドプシンをモデルとして、「ポンプ」と「チャンネル」という異なる輸送方式を決定する要因を解明することを目的に、研究を行った。本研究を通して、主にアニオンチャンネル型ロドプシンについて、新規分子の探索およびイオン輸送機構を詳しく調査した。これに先立ち、簡便なイオン輸送活性測定法を開発した。これにより、多数の検体を簡単に調べることができ、その中から特徴的な機能をもつ分子を発見した。また、アニオンチャンネル型ロドプシンのイオン結合性や、塩濃度によって変化する機能メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物の光受容体タンパク質・ロドプシンは、共通のタンパク質構造と活性化反応をもつにもかかわらず、『ポンプ』と『チャンネル』という全く異なる方式で基質イオンを輸送する。それぞれの輸送機構はよく理解されてきたが、輸送方式を決定する要因は明らかではない。これを解明するためには、アミノ酸変異によるポンプ・チャンネル相互機能変換が有効である。本研究は、ポンプをポンプたらしめる、チャンネルをチャンネルたらしめるロドプシンの精巧な動作原理の理解につながる。本研究成果を応用し、オプトジェネティクス（光による神経細胞活動の操作技術）に利用可能な分子開発に展開できる。

研究成果の概要（英文）：The goal of this study was to identify what the determinant factor is for the different ion transport mechanisms, pump and channel. Here, we used anion pump and anion channel rhodopsins as examples, which are a family of photoreceptor proteins in microbes. We mainly focused on the anion channel rhodopsins in this study and explored novel ones and investigated their mechanisms for the anion channel activity. We developed a simple measuring technique for the anion transport activity. Because of this, we successfully identified some anion channel rhodopsins with unique anion transport properties. In addition, we reported for the first time the anion binding in the initial state and the functional mechanism which was strongly affected by the anion concentration.

研究分野：生物物理学

キーワード：光受容体 ロドプシン イオンチャンネル イオンポンプ 構造変化 速度論的解析 機能変換

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

微生物の光受容体タンパク質であるロドプシンは、光を利用して細胞膜を隔てたイオン輸送を行う。ロドプシンは、七回膜貫通型 α ヘリックスを核とするタンパク質構造をもち、補因子レチナールの光異性化反応が引き金となって活性化される。こうした共通の構造と活性化反応をもつにもかかわらず、ロドプシンはポンプ（能動輸送）とチャネル（受動輸送）という全く異なる方式でイオンを輸送する。それぞれの輸送機構は、これまでの研究でよく理解されてきた。しかし、輸送方式を決定する要因は今なおわかっていない。ロドプシンのイオン輸送方式は分子進化の過程で分化したと考えられているため、この要因を解明するためには進化の過程をさかのぼり、アミノ酸変異によってポンプとチャネルの相互機能変換を行うことが有効である。

申請者はこれまでに、ポンプ型およびチャネル型ロドプシンの構造を比較し、レチナールの立体配置の違いを見出した。ポンプ型ロドプシンのレチナール結合部位にアミノ酸変異を導入し、チャネル型のレチナール立体配置に変化させたところ、ポンプからチャネルへの機能変換に成功した (*J. Am. Chem. Soc.* 2015)。さらに、化学的修飾を施したレチナールをポンプ型ロドプシンに導入することにより、同じくチャネルへの機能変換に成功した (Takayama et al. *J. Phys. Chem. Lett.* 2018)。これらの成果から、レチナールの立体配置が輸送方式を決定する要因である可能性が強く示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、ロドプシンのイオン輸送方式を決定する要因を解明するために、「レチナールの立体配置が機能変換に重要」という事実が、他のイオン輸送型ロドプシンにもあてはまることを検証する。これまで未達成のチャネルからポンプへの機能変換を行う。ポンプ \rightleftharpoons チャネル機能変換型分子を取得し、その輸送機構を野生型と比較することで、輸送方式を決定する要因を明らかにする。

我々は当初、①アミノ酸変異導入によるポンプ \rightleftharpoons チャネル相互機能変換型分子の作成、および②機能変換型と野生型との分子機能比較による、輸送方式を決定する要因の解明、を目指して研究したが、計画通りに進まなかったため、個々の分子、特にアニオンチャネル型ロドプシンの基礎的な分子メカニズムについて知見を蓄えることを新たな目標として設定した。さらに、多数の検体を扱うことができる簡便なイオン輸送活性測定法の開発に注力した。

3. 研究の方法

アニオンチャネル型ロドプシンの研究試料は、酵母を宿主とする組換えタンパク質発現系を用いて発現・生成したものを用いた (Tsukamoto et al. *Sci. Rep.* 2018)。イオン輸送活性測定法については、以下で説明する。

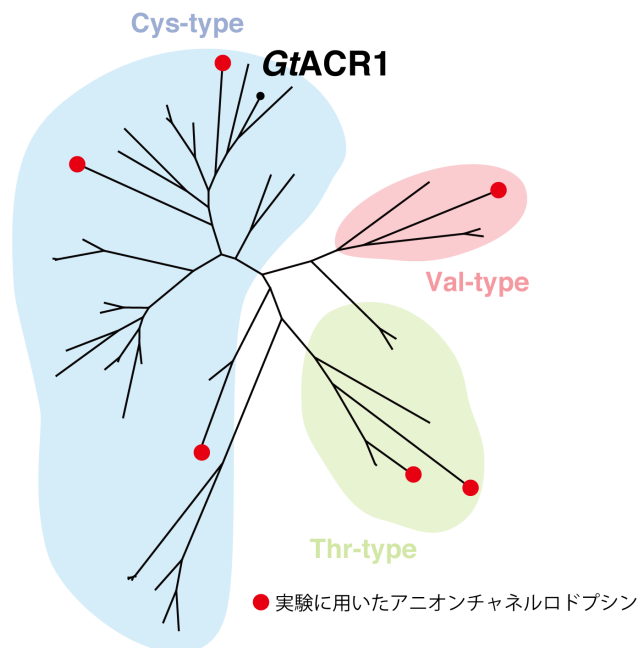
4. 研究成果

(1) アニオンチャネルロドプシンの分子機構の解明

分光学的手法により、アニオンチャネル型ロドプシンの分子機構を調査した。他の研究グループが行った先行研究と異なり、我々はアニオンチャネル型ロドプシンが、光反応前の初期状態においてすでにアニオンを結合していることを初めて明らかにした (Tsukamoto et al. *Sci. Rep.* 2018)。さらに、アニオンの濃度に依存して、チャネル開閉機能が顕著に変化することがわかった。特に、高いアニオン濃度存在下では、チャネル開口状態の寿命がおよそ 10 倍長くなることを明らかにした。これは、チャネル開口状態の構造に、アニオンが選択的に結合することで、チ

チャンネル閉口を妨げることが原因であると予想した。アニオンチャンネル型ロドプシンのチャンネル開閉が素早いという性質は、オプトジェネティクスによる正確な神経抑制作用にとって重要なものである。我々の成果によって、塩濃度の影響を受けないアニオンチャンネル型ロドプシンの設計が必要である可能性を示すことができた。

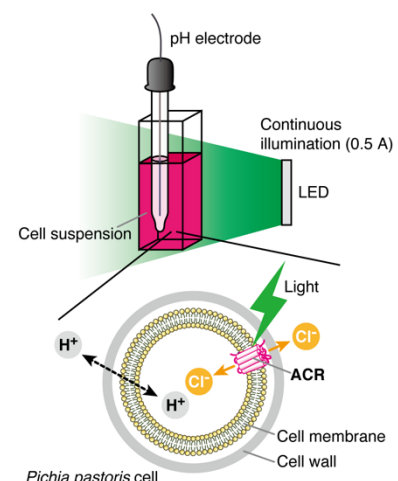
アニオンチャンネル型ロドプシンでは、チャンネル開閉のキネティクスに重要なアミノ酸がすでに明らかになっている。我々は、このアミノ酸に着目して、利用可能なデータベースに登録されている全てのアニオンチャンネル型ロドプシンを調べたところ、3つのバリエーション (Cys型、Thr型、Val型) があることを発見した (右図参照)。そこで、これら3つの型から1つ以上のアニオンチャンネル型ロドプシンを選択し、発現系の構築、精製タンパク質での分光学的測定、以下に述べるイオン輸送活性測定を行った。その結果、これまでに報告されていなかった



Val型のアニオンチャンネルロドプシンは、これまでに明らかになっている微生物型ロドプシンの中で最も長い光反応サイクル (1回の光反応に2分以上を要する) を持つことがわかった。さらに、微生物型ロドプシンは通常、all-trans型のレチナールを保持するが、我々の発見したVal型のアニオンチャンネルロドプシンは、11-cis型を40%以上も含んでいるということも明らかになった。これは、微生物型ロドプシンでありながら、動物型ロドプシンに近い性質を持っていることを意味している。極めて遅い光反応、高い割合での11-cis型レチナールの存在の生理的意義の解明は、今後の研究の大きな目的である。

(2) 簡便なアニオン輸送活性測定法の開発

アニオンチャンネル活性の測定を簡易的に行うことができる実験系を構築した (右図参照)。代表的なアニオンチャンネルロドプシン・GtACR1を用いて、測定系の検討を行い、試料条件および測定条件の最適化を行い、すでに報告済みの結果と一致する良好なデータを得ることに成功した。通常、アニオンチャンネル活性は、時間分解能や定量性の優れた電気生理学的手法によって測定されてきた。本研究で我々は、これらの点は劣っているものの、複雑な装置や操作、静音な実験環境を必要としない、簡便な測定法を開発することができた。本測定系を用いて、さまざまなアニオンチャンネルロドプシンについて、網羅的なアニオンチャンネル活性測定を行った。特に、電気生理学的測定に必要な、哺乳類細胞での発現が認められていないものに着目した。その中で、GtACR1よりもアニオンチャンネル活性が数倍大きい新規アニオンチャンネルロドプシンを発見することができた。



(3) アミノ酸変異導入によるポンプ⇔チャンネル相互機能変換型分子の作成

5種類のアニオンポンプ型ロドプシン (NpHR、HvHR、NM-R3、NmHR、SyHR) について、アミノ酸変異を導入し、ポンプからチャンネルへの機能変換を試みた。それぞれについて、レチナール結合部位に対して最大3つの変異を導入した。その結果、可視吸収を変化させることはできたが、イオン輸送活性を失ってしまい、期待通りの結果を得ることはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsukamoto Takashi, Kikuchi Chihiro, Suzuki Hiromu, Aizawa Tomoyasu, Kikukawa Takashi, Demura Makoto	4. 巻 8
2. 論文標題 Implications for the impairment of the rapid channel closing of <i>Proteomonas sulcata</i> anion channelrhodopsin 1 at high Cl ⁻ concentrations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13445 ~ 13445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-31742-6	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 -
1. 著者名 Shionoya Tomomi, Mizuno Misao, Tsukamoto Takashi, Ikeda Kento, Seki Hayato, Kojima Keiichi, Shibata Mikihiro, Kawamura Izuru, Sudo Yuki, Mizutani Yasuhisa	4. 巻 122
2. 論文標題 High Thermal Stability of Oligomeric Assemblies of Thermophilic Rhodopsin in a Lipid Environment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 6945 ~ 6953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.8b04894	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 Takayama Riho, Kaneko Akimasa, Okitsu Takashi, Tsunoda Satoshi P., Shimono Kazumi, Mizuno Misao, Kojima Keiichi, Tsukamoto Takashi, Kandori Hideki, Mizutani Yasuhisa, Wada Akimori, Sudo Yuki	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 The Journal of Physical Chemistry Letters	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.jpcclett.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 Yamanashi Taro, Maki Misayo, Kojima Keiichi, Shibukawa Atsushi, Tsukamoto Takashi, Chowdhury Srikanta, Yamanaka Akihiro, Takagi Shin, Sudo Yuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Quantitation of the neural silencing activity of anion channelrhodopsins in <i>Caenorhabditis elegans</i> and their applicability for long-term illumination	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-019-44308-x	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 -

1. 著者名 Iizuka Azusa, Kajimoto Kousuke, Fujisawa Tomotsumi, Tsukamoto Takashi, Aizawa Tomoyasu, Kamo Naoki, Jung Kwang-Hwan, Unno Masashi, Demura Makoto, Kikukawa Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Functional importance of the oligomer formation of the cyanobacterial H ⁺ pump Gloeobacter rhodopsin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-019-47178-5	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Takashi Tsukamoto, Chihiro Kikuchi, Hiromu Suzuki, Tomoyasu Aizawa, Takashi Kikukawa, Makoto Demura
2. 発表標題 Substrate anion concentration significantly affects the fast channel closing of <i>Proteomonas sulcata</i> anion channelrhodopsin-1
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Tsukamoto, Chihiro Kikuchi, Hiromu Suzuki, Tomoyasu Aizawa, Takashi Kikukawa, Makoto Demura
2. 発表標題 Anion concentration dependency on the photocycle of PsuACR1: Implications for the impairment of its fast channel function
3. 学会等名 18th International Conference on Retinal Proteins (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Tsukamoto
2. 発表標題 Photochemical Properties of Microbial Rhodopsin Pumps and Channels
3. 学会等名 Asia Pasific Society for Biology and Medical Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Kikukawa, T., Sasaki, S., Nishiya, K., Tsukamoto, T., Aizawa, T., Demura, M., Tamogami, J.
2 . 発表標題 Replacements of “H ⁺ donor” residues in the light-driven H ⁺ -pump rhodopsins
3 . 学会等名 17th International Congress on Photobiology & 18th Congress of the European Society for Photobiology (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Murabe, K., Kato, T., Tsukamoto, T., Aizawa, T., Demura, T., Kikukawa, T.
2 . 発表標題 Time-resolved detection of Na ⁺ uptake and release reactions of Na ⁺ -pumping rhodopsin
3 . 学会等名 The 9th Asia and Oceania Conference on Photobiology (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Iwama, K., Watanabe, Y., Tsukamoto, T., Aizawa, T., Demura, M., Kikukawa, T.
2 . 発表標題 Importance of His166 for Cl ⁻ pump activity of Mastigocladopsis repens halorhodopsin
3 . 学会等名 日本生物物理学会第57回年会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Kiyoshima, M., Kikukawa, T., Aizawa, T., Demura, M., Sudo, Y., Tsukamoto, T.
2 . 発表標題 Inversion of Proton Transport for Thermophilic Rhodopsin by Neutralizing the Secondary Counterion Asp229
3 . 学会等名 日本生物物理学会第57回年会
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikuchi, C., Aizawa, T., Takashi Kikukawa, T., Demura, M., Tsukamoto, T.
2. 発表標題 Comparative Study for Anion Transport Activity of Anion Channelrhodopsins by Using a Simple pH Electrode Method
3. 学会等名 日本生物物理学会第57回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsukamoto, T., Kitahara, T., Kurane, H., Kikuchi, C., Aizawa, T., Kikukawa, T., Demura, M.
2. 発表標題 An Anion Channelrhodopsin with a Naturally Super-Slow Photocycle
3. 学会等名 日本生物物理学会第57回年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ https://tenure-track.cris.hokudai.ac.jp/lab/tsukamoto/ 北海道大学プレスリリース https://www.hokudai.ac.jp/news/180912_pr.pdf

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