

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25540132

研究課題名(和文)全原子量子化学計算によるマルチチャネルオプトジェネティクス用光受容体の分子設計

研究課題名(英文)Molecular design of photoreceptor proteins for the use of multichannel optgenetics using all-atom quantum chemical calculations

研究代表者

櫻井 実 (Sakurai, Minoru)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・教授

研究者番号：50162342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：全原子量子化学計算によりチャンネルロドプシン、プロテオロドプシンの吸収波長制御機構を解析した。その結果、吸収波長に大きく影響を与えるアミノ酸残基を特定することに成功し、さらに、波長を大きくシフトさせる変異体も提案した。また、近年オプトジェネティクスの光受容体として盛んに用いられているLOVドメインやBLUFドメインの光応答機構を分子動力学シミュレーション等を駆使して、ダイナミクスの観点から明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the spectral tuning mechanism in channelrhodopsin and proteorhodopsin using all-atom quantum chemical calculations. On the basis of these results, we successfully identified amino acid residues that exert significant influences on the absorption maxima of these proteins, and furthermore designed mutants whose absorption maxima are largely shifted with respect to those of the wild type proteins. In addition, we intensively performed MD simulations to elucidate the photoresponse mechanism in LOV and BLUF domains, which are recently used as photoreceptors in many optgenetics experiments, from a viewpoint of molecular dynamics.

研究分野：生物物理学

キーワード：チャンネルロドプシン プロテオロドプシン 量子化学計算 吸収波長制御 LOVドメイン BLUFドメイン  
光応答 ダイナミクス

### 1. 研究開始当初の背景

オプトジェネティクス(光遺伝学)では、光吸収によって活性化されるイオンチャネルを特定のニューロンに遺伝子工学的手法を用いて強制発現させた後、これらの細胞に特定の波長の光を照射することにより、標的とするニューロンをそれぞれ興奮または抑制させ、ニューロン同士の接続やニューロン集団の機能を探る。オプトジェネティクスには課題もあり、光受容体としてよく使われるチャンネルロドプシン(ChR)は 500 nm 付近に吸収極大(以下 $\lambda_{\max}$ )を持つが、この 500 nm 波長域(青色系)の光は光ファイバーや他の体組織に吸収され深部に到達しにくい。そのため、長波長に $\lambda_{\max}$ を持つ改変が切望されていた。

応募者は長年ロドプシン系タンパク質の吸収波長制御機構を量子化学計算で解明する研究を行ってきた。特に、最近タンパク質全体を丸ごと量子力学で扱い励起エネルギーを計算する方法(以下 Full-QM 法)を開発し、古細菌由来のバクテリオロドプシン(Hayashi et al., Biophysics 2012)や GFP の吸収波長(Matsuura et al., Chem. Phys. Lett. 2009)を 10 nm 以内の高精度で再現可能なことを実証した。この計算手法を用いれば、立体構造を入手可能という前提条件は付くが、アミノ酸変異体を含む任意の光受容体の吸収波長を予測することが可能である。幸いなことに、チャンネルロドプシンの X 線構造は 2012 年に発表された(Kato et al., Nature 2012)。

### 2. 研究の目的

前述した量子化学計算を用いて、野生型 ChR の吸収波長制御機構を解析し、その結果に基づいて、野生型より長波長側に $\lambda_{\max}$ をもつ変異体を分子設計することを目的とした。

よりよい変異体の設計に当たっては、ChR 以外の光受容体で見出された波長制御機構も参考になる可能性がある。本研究では、未だ理論的研究の発表されていないプロテオロドプシン(PrR)をターゲットに、新規な波長制御機構の存在の可能性を探った。

一方、本研究を遂行している間に、ロドプシン系以外の光受容体もオプトジェネティクスに頻りに利用されるようになった。例えば、フラビン環を発色団にもつ LOV ドメインや BLUF ドメインの光応答(光吸収による構造変化)を利用した報告が急速に増加した。そこで、本研究では、この流れにも対応できるように、これら光受容体の光応答機構を主として分子動力学(MD)シミュレーションにより調べた。

### 3. 研究の方法

1) 従来研究(Hayashi et al., Biophysics 2012)で確立したプロトコールに従って、ChR の X 線構造(PDB: 3UG9)に対して Full-QM 法による計算を実行し、 $\lambda_{\max}$ を評価

した。ChR については、いくつか変異体の実験値も報告されているので、これらについても同様な計算を行った。さらに、3UG9 構造に含まれるアミノ酸残基 342 個を一つずつ Gly に置換した変異体を作成し、励起エネルギーを計算した。これらの結果を野生型の結果と比較し、個々のアミノ酸残基の寄与を定量的に評価した。

以上の結果に基づいて、野生型より長波長側に $\lambda_{\max}$ をもつ新規な変異体のデザインを試みた。

2) PrR については、L105 を他の 19 種のアミノ酸に置換した変異体の $\lambda_{\max}$ が連携研究者の神取らにより報告されており、特異な波長シフトが見出されている(Ozaki et al., Biochemistry 2014)。しかし、それらシフトの原因については十分解明されたとは言えない。本研究では、概ね 1)と同様な手順に沿って、PrR の野生型および L105 位での変異体の $\lambda_{\max}$ を計算し、波長シフトの原因を調べた。

3) LOV ドメインおよび BLUF ドメインの暗状態の X 線構造を出発構造にして、光吸収後の明状態の構造をモデリングし、両状態に対し all-atom MD シミュレーションを行った。必要であれば、accelerated MD などの enhanced sampling MD 計算も行った。得られたトラジェクトリーに対し、名古屋大学の倭らが開発した CURP (CURrent calculation for Proteins)やネットワーク解析などを行い、発色団の光吸収が誘起するアロステリックな構造変化の経路を探索した。

### 4. 研究成果

#### 1) ChR の波長制御機構と変異体のデザイン

まず、X 線構造に対して QM/MM 計算による構造最適化を行った。その際、図 1 に示す発色団(プロトン化レチナル Schiff 塩基:PRSB)、その周辺 5 残基および結合水 2 分子を QM 領域に入れた。得られた構造に対し、Full-QM 法による吸収波長計算を行った。その結果、482 nm (2.57 eV)の値が得られ、実験値 470 nm (2.64 eV)によく一致していた。

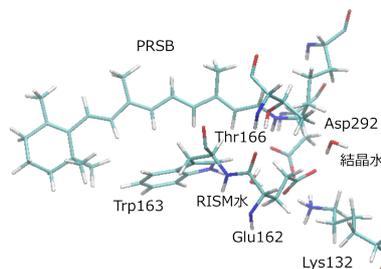


図 1 QM/MM 計算における QM 領域

次に、以下の式にしたがって各アミノ酸残基の寄与を調べた。

$$\Delta E_{ex} = E_{ex}(mu \tan t) - E_{ex}(WT)$$

ここで、右辺第一項および第二項は、それぞれ対応する変異体および野生型の励起エネ

ルギーを表す。野生型においてブルーシフトに寄与する残基とレッドシフトに寄与する残基を図2に示す。

ブルーシフトに最も大きく寄与する残基は、自明ではあるが、カウンターイオンの Glu162 と Asp292 であった。PRSB では励起に伴って、シッフ塩基に局在していた正電荷が  $\beta$  イオン環に向かって非局在化する。よく知られているように、カウンターイオンの存在によってシッフ塩基上に正電荷が留まりやすくなり、励起による PRSB ポリエン鎖上の電子移動が妨げられるため、吸収波長はブルーシフトする。反対に、最も大きくレッドシフトに寄与する残基は Lys132 であった。Lys132 はカウンターイオン近傍に位置しており、その負電荷を打ち消して、PRSB の電子移動を促進すると解釈できる。さらに、シッフ塩基付近にある結晶水を除去した場合、励起エネルギーが 0.04 eV 大きくなった。この水分子は、シッフ塩基、Glu162、Asp292、Lys132 と水素結合ネットワークを形成しているため、励起エネルギーへの寄与も無視できないといえる。

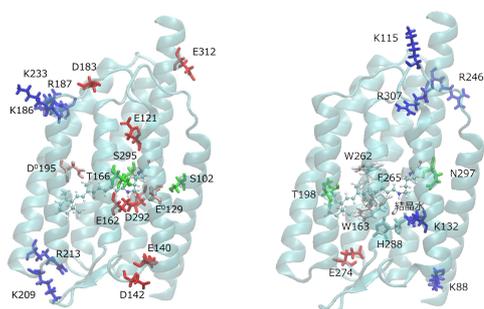


図2 左：ブルーシフトに寄与する残基、右：レッドシフトに寄与する残基

PRSB 近傍の残基だけでなく、遠方にある荷電性残基も励起エネルギーへ寄与している。図2に示したように、PRSB のシッフ塩基側 (TM1~3,7) にある酸性残基と  $\beta$  イオン環側 (TM4,5) にある塩基性残基はブルーシフトに寄与する。反対にシッフ塩基側にある塩基性残基はレッドシフトに寄与する。これらの結果から、PRSB から 20 以上離れた荷電性残基も静電力の長距離相互作用によって励起エネルギーに影響を与えることがわかった。

一方で、Gly 変異しても励起エネルギーが変化しない荷電性残基もあり、これらはポリエン鎖の中心軸上や膜の外側に位置していた。また、E237G 変異体は励起エネルギー計算が収束せず、 $\Delta E_{ex}$  を評価できなかった。Glu237 の近くには Arg187 と Lys233 があり、E237G 変異により正電荷の反発が強まって電子状態が不安定になったと考えられる。このことから E237 は ChR の電子状態を安定化

するために不可欠な残基であることが示唆された。

また、Ser295 や Thr166 などシッフ塩基付近にある極性残基はブルーシフトに、 $\beta$  イオン環付近にある Thr198 はレッドシフトにそれぞれ寄与することが判明した。

以上得られた結果から、ChR の吸収波長をレッドシフトさせるためには、シッフ塩基付近の極性を弱め、 $\beta$  イオン環付近の極性を強めれば良いと考えられる。該当する残基は、シッフ塩基付近の S295、イオン環付近の G220 などである。加えて、残基同士の相乗効果を探るために、それらを同時に変異させた 5 残基変異体の励起エネルギー計算も行った。その結果、S295A 変異体において -0.05 eV に及ぶ比較的大きなレッドシフトが見出された。Ser295 のヒドロキシ酸素はシッフ塩基の窒素から 3.4 Å の位置にあるので、Ala への変異は PRSB の電荷分布に強く影響すると考えられる。一方、他の変異体では励起エネルギーの変化がほとんど観測されなかった。

次に荷電性残基に対する変異を試みた。シッフ塩基側 (TM1~3,7) に正電荷を帯びさせ、 $\beta$  イオン環側 (TM4,5) に負電荷を帯びさせるような変異は PRSB からの距離に関わらずレッドシフト効果が期待できる。まず K209T、L309K、A181K の励起エネルギー計算を実行した。3 つの変異体ともレッドシフトが確認できたが、前述した極性残基の S295A の効果を上回るものはなかった。

さらに、シッフ塩基側の酸性残基と  $\beta$  イオン環側の塩基性残基を網羅的に Ala 変異して励起エネルギー計算を実行した (表1)。全体的に、極性残基の変異よりもレッドシフトへの寄与が大きい傾向が見えた。特に Glu121 と Glu (neutral)129 を Lys に変異させた結果、励起エネルギーが顕著に変化した。E0129K では -0.29 eV の著しく大きなレッドシフトが起こった。

最後に、カウンターイオンである Glu162、Asp292 への変異の効果を調べた。Asp292 は Glu162 よりも優先して、光サイクル中でシッフ塩基からプロトンを受け取ることが予想されている。そのため、チャネル機能を保持してレッドシフトさせるには Glu162 の変異が有効だと考えられる。実験では、ChR に対応する Glu123 を Thr や Gln に変異させるとレッドシフトすることが報告されている (Gunaydin et al, Nat. Neurosci, 2010)。本研究では、Glu162 の 6 つの変異体を作り、励起エネルギーを計算した (表2)。計算が収束しなかった E162R を除くすべての変異体で大きなレッドシフトが起きた。先の極性残基の変異や荷電性残基の変異と比較しても、Glu162 の変異によるレッドシフト効果が大きいことが判明した。

以上の結果は、マルチチャネルオプトジェネティクス用光受容体の設計指針を得るための基盤情報となり得る。

表 1 極性残基の変異体の励起エネルギー

	$\lambda_{\max}$		$\Delta E$ (eV)
	eV	nm	計算値
E121A	2.53	491	-0.04
E <sup>0</sup> 129A	2.53	490	-0.04
E140A	2.53	489	-0.04
D312A	2.54	487	-0.03
D142A	2.55	486	-0.02
D183A	2.56	485	-0.01
E <sup>0</sup> 136A	2.56	484	-0.01
E <sup>0</sup> 122A	2.57	482	0.00
R213A	2.52	493	-0.05
K209A	2.54	488	-0.03
K233A	2.55	487	-0.02
R187A	2.56	485	-0.01
K186A	2.56	484	-0.01
E <sup>0</sup> 129K	2.28	543	-0.29
E121K	2.49	499	-0.09

表 2 Glu162 変異体の励起エネルギー

	$\lambda_{\max}$		$\Delta E$ (eV)	
	eV	nm	計算値	実験値
E162Q	2.20	563	-0.37	~-0.16
E162K	2.24	554	-0.33	
E162L	2.35	555	-0.22	
E162A	2.36	525	-0.21	~-0.11
E162T	2.36	525	-0.21	~-0.16

## 2) PrR の吸収波長制御機構の解析

PrR では、L105 を他の 19 種のアミノ酸に変異する計算を行ったが、計算が収束しないものもあった。 $\lambda_{\max}$  が得られた変異体について実験値と比較した結果を図 3 に示す。数値は、野生型 (L105) の  $\lambda_{\max}$  との差を示している。これを見て分かる通り、全体的に右上がりの傾向は再現できているとは言えるものの、バラツキが大きく、 $\lambda_{\max}$  シフトのメカニズムにまで踏み込んだ議論がきるほどのデータは得られなかった。その原因の一つは、励起エネルギー計算に用いた構造にあるかもしれない。ただし、芳香族系の残基に対しては、別途、側鎖の屈折率の 2 乗 (分極能に相当) に対し実験値をプロットしたところ、よい相関が得られた。したがって、残基間の電子相関の効果が波長シフトの主な原因となっている可能性がある。本研究で用いた Full-QM 法では電子相関が考慮されていないので、将来的には CAS/PT2 などの手法の導入が必要であろう。

本研究では、X 線構造に対し QM/MM 法による構造最適化を行っているが、体積や極性

などが異なる様々なアミノ酸変異に対する最適構造を求めるには、MD 計算による構造サンプリングが必要かもしれない。そのような研究は、現在進行中である。

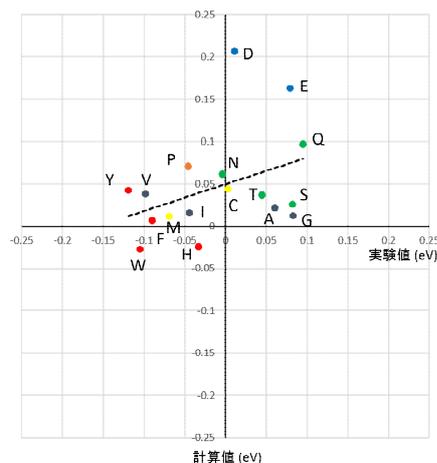


図 3 PrR の 105 位変異体の波長シフト

## 3) LOV ドメインおよび BLUF ドメインの光活性化機構

LOV ドメインは、青色光を受容すると発色団 FMN が近傍の Cys と共有結合を形成し、暗状態から明状態へ遷移する。フォトロピン中の AsLOV2 の光応答過程では、明状態において AsLOV2 下流につながる J $\alpha$  ヘリックスが乖離することが、その先に存在するエフェクターの活性化に重要とされている。一方、オーレオクロム LOV ドメイン (AuLOV) では、上流側にエフェクターが存在するため上流側の A' $\alpha$  ヘリックスに光シグナルが伝わると予想される。本研究では、前述した CURP (CURrent calculation for Proteins) 法を用いて、MD シミュレーションの結果から各 LOV ドメインの光吸収前後における残基間のエネルギー伝導性を解析した。その結果、AuLOV では、明状態になったとき、FMN 周辺の水素結合を介して FMN から A' $\alpha$  ヘリックスまで繋がるエネルギー流が生じることが判明した。これがさらに上流のエフェクターに繋がると予想される。一方、AsLOV2 では、明状態になると、暗状態で見られた FMN のリン酸基周辺から F $\alpha$  ヘリックスを介して J ヘリックスへと伝わる経路が断ち切れ、さらに、 $\beta$  シート上の残基と J $\alpha$  ヘリックスの間に見られたエネルギー流が、明状態では低下する傾向が見られた。すなわち、AsLOV2 では J $\alpha$  ヘリックスと  $\beta$  シート間の結合が弱まり、J $\alpha$  ヘリックスの乖離が引き起こされることが示唆された。

シアノバクテリアの走光性に関与する BLUF ドメイン TePixD は、暗所においてリング状の 5 量体を面あわせにした 10 量体構

造を形成しているが、光照射によって5量体に分離し活性化する。本研究では、MDシミュレーションを用いてTePixDの光応答反応メカニズムをダイナミクスの観点から解析した。まず、TePixDのX線結晶構造PDB ID:1X0Pを基に、水溶液中における単量体の暗所、明所、恒常的活性変異体M93AのMDシミュレーションを行った。このMDシミュレーションの結果に対し、名古屋大学の倭らが開発したCURP(CURrent calculation for Proteins)を行い、タンパク質内のエネルギー流を解析した。その結果、発色団から1 $\alpha$ を介する経路やGln50を介して $\beta$ シートの裏側へエネルギーを伝達させる経路が見出された。1 $\alpha$ を介する経路ではMet93がシグナル伝達を阻害しており、タンパク質の活性化に深く関わることが示唆され、M93A変異体の結果とも矛盾のないことがわかった。ついで、10量体の暗所、明所におけるMDシミュレーションも行い、ネットワーク解析から、光応答反応のメカニズムを解析した。その結果から、明順応状態における単量体の上下間の協同的揺らぎが、暗順応状態における単量体の上下間より弱くなっていることが判明した。

#### 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 2 件)

1. Q. Gao, S. Yokojima, D-G. Fedorov, K. Kitaura, M. Sakurai, S. Nakamura, Octahedral point-charge model and its application to fragment molecular orbital calculations of chemical shifts, *Chem. Phys. Lett.*, 593, 165-173 (2014).
2. H. C. Watanabe, M. Banno and M. Sakurai, An adaptive quantum mechanics/molecular mechanics method for the infrared spectrum of water: incorporation of the quantum effect between solute and solvent, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18, 7318-7333 (2016).

[学会発表](計 17 件)

1. 國分 哲雄, 古田 忠臣, 櫻井 実, MDシミュレーションによる光受容タンパク質LOV-HTHの光応答機構の解析, 第13回日本蛋白質科学会年会, 鳥取, 6/12-14, 2013.
2. H. Tamura, S. Chiba, T. Furuta, S. Sakuraba, N. Matsubayashi, M. Sakurai, Study of the mechanism of the light-driven ion transport in halorhodopsin based on the free energy calculation, 第51回日本生物物理学会年会, 京都, 10/28-30, 2013.
3. T. Kokubu, T. Furuta, M. Sakurai, Study of the photoresponsive mechanism of LOV-HTH protein using  $\mu$ s scale molecular dynamics simulations, 第51回日本生物物理学会年会, 京都, 10/28-30, 2013.
4. 國分 哲雄, 古田 忠臣, 櫻井 実, accelerated MDシミュレーションで探る光受容タンパク質LOV-HTHの光応答機構, 第14回日本蛋白質科学会年会, 横浜, 6/25-27, 2014.
5. 矢板 智大, 古田 忠臣, 櫻井 実, MDシミュレーションを用いたAsLOV2ドメイン光活性機構の解明, 第14回日本蛋白質科学会年会, 横浜, 6/25-27, 2014.
6. T. Kokubu, T. Furuta, M. Sakurai, Analysis of the photoresponse mechanism of the LOV-HTH system using accelerated molecular dynamics simulation, 第52回日本生物物理学会年会, 札幌, 9/25-27, 2014.
7. H. C. Watanabe, M. Elstner, M. Sakurai, Theoretical approach toward an understanding of molecular functions of channelrhodopsin, 第52回日本生物物理学会年会, 札幌, 9/25-27, 2014.
8. T. Yaita, T. Furuta, M. Sakurai, Study of the photactivation mechanisms in AsLOV2 domain by using accelerated molecular dynamics simulations, 第52回日本生物物理学会年会, 札幌, 9/25-27, 2014.
9. N. Yoshino, T. Hayashi, A. Matsuura, T. Furuta, M. Sakurai, Quantum chemical study of the absorption maximum of channelrhodopsin, 第52回日本生物物理学会年会, 札幌, 9/25-27, 2014.
10. H. Tamura, S. Chiba, T. Furuta, S. Sakuraba, N. Matsubayashi, M. Sakurai, Study of the mechanism of the light-driven ion transport in halorhodopsin based on the free energy calculations, 16<sup>th</sup> International Conference on Retinal Proteins, Nagahama, Japan, 10/5-10, 2014.
11. T. Kokubu, T. Yaita, T. Furuta, M. Sakurai, Study of the photoactivation mechanisms of AsLOV2 and LOV-HTH using accelerated molecular dynamics simulations, 16<sup>th</sup> International Conference on Retinal Proteins, Nagahama, Japan, 10/5-10, 2014.
12. 柳 開智, 渡邊 宙志, 古田 忠臣, 櫻井 実, 量子化学計算を用いたプロテオロドプシンL105変異体の波長シフトの解析, 第15回日本蛋白質科学会年会, 徳島, 6/24-26, 2015.
13. 林 俊洋, 渡邊 宙志, 古田 忠臣, 櫻井 実, 構成的活性変異がリガンドフリーGPCRオプシンに及ぼす効果のMDシミュレーション, 第15回日本蛋白質科学会年会, 徳島, 6/24-26, 2015.
14. Y. Kaneta, H. C. Watanabe, T. Furuta, M. Sakurai, Ab initio MD study on the dynamic structure of the hydrogen bond network in the active site of PYP, 第53回日本生物物理学会年会, 金沢, 9/13-15, 2015.
15. K. Yanagi, H. C. Watanabe, T. Furuta, M. Sakurai, Theoretical analysis of the

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

16. color-tuning mechanism of mutations at Leu105 in Green-Light Absorbing Proteorhodopsin, 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢, 9/13-15, 2015 .
17. 矢板 智大, 古田 忠臣, 櫻井 実, MD シミュレーションによる BLUF タンパク質 TePixD の光応答メカニズムの解析, 第 16 回蛋白質科学会, 福岡, 6/7-9, 2016 .
18. 金森 悠一郎, 古田 忠臣, 櫻井 実, MD シミュレーションによる青色光受容タンパク質 AuLOV と AsLOV2 の光応答機構の解明, 第 16 回蛋白質科学会, 福岡, 6/7-9, 2016 .

〔図書〕(計 0 件)

〔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.cherry.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
櫻井 実 (Sakurai, Minoru)  
東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・教授  
研究者番号：50162342

(2)研究分担者  
( )  
研究者番号：

(3)連携研究者  
神取 秀樹 (Kandori, Hideki)  
名古屋工業大学・工学研究科・教授  
研究者番号：70202033