総説

結晶構造から見えてきたチャネルロドプシンの分子メカニズム

加藤英明, 濡木 理 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻

Channelrhodopsin (ChR) is a light-gated cation channel derived from algae. Since the inward flow of cations triggers the neuron firing, neurons expressing ChRs can be optically controlled even within freely moving mammals. Although ChR has been broadly applied to neuroscience research, little is known about its molecular mechanisms. We determined the crystal structure of chimeric ChR at 2.3 Å resolution and revealed its molecular architecture. The integration of structural and electrophysiological analyses provided insight into the molecular basis for the channel function of ChR, and paved the way for the principled design of ChR variants with novel properties.

membrane protein / rhodopsin family / channelrhodopsin / optogenetics / X-ray crystallography / electrophysiology

1. はじめに

ヒトから微生物まであらゆる生物は光を受容し、その光情報に応じた行動をとる。多くの場合この光情報の受容は、発色団としてレチナールと呼ばれる低分子を結合した、ロドプシンファミリータンパク質によって担われている。たとえば、ヒトの眼に存在する動物型ロドプシン（視物質ロドプシンなど）は、光を吸収すると3量体Gタンパク質を活性化することでヒトの視覚形成に重要な役割を果たす。また、一部の微生物が持っている微生物型ロドプシン（バクテリオロドプシン（BR）など）は、光を吸収すると細胞外にH⁺を汲み出しH⁺濃度勾配を形成することで、特に嫌気性条件下でのエネルギー獲得に重要な働きを示す。このように、一口にロドプシンタンパク質と言ってもその機能は多岐に渡ることが知られていたが、イオンチャネルとして働くロドプシンタンパク質は長らく発見されておらず、その存在も疑問視されていた。しかし2002年、Peter Hegemannらが緑藻類の走光性に関わる新規微生物型ロドプシンを発見し、このタンパク質が陽イオンチャネルとして働いていることを示した¹⁾。これがチャネルロドプシン（ChR）である。ChRは青色光を吸収すると細胞内に陽イオンを取り込むことで膜電位を変化させる。この性質から、ChRは神経細胞を脱分極させるツールとしてロドプシン研究者からのみならず、神経科学者からも注目されることとなった。

2005年から2006年にかけて、3つのグループがChR

を神経細胞に発現させ、これに光を照射することでChRを発現させた神経細胞のみを選択的に興奮させることに成功²⁾⁻⁷⁾、そしてその翌年にはKarl DeisserothらがChRと光ファイバー技術を組み合わせることで生きたマウスの行動を光によって制御することに成功した⁸⁾。これ以降、ChRを用いた神経科学（optogenetics）の研究は現在まで飛躍的に増加し続けてきている。しかし、こうした研究例の増加とは裏腹に、ChR自体の分子メカニズム、すなわちこのタンパク質が光を吸収すると何故陽イオンを通すのか、またそもそも陽イオンはこのタンパク質のどこを通るのかといった諸問題には不明な点が多く、ほとんど知見が得られていなかった。また、ChRが神経科学の有用なツールとして認識され始めて以降、ChRの性質を改善し、より使い易い変異型ChRを創出しようという研究の流れが生まれたが⁹⁾⁻¹³⁾、構造既知の微生物型ロドプシンから得られる情報だけでは変異体のデザインに限界があり、ChRそのものの構造情報が待ち望まれていた。

2. ChRの発現から構造決定

膜タンパク質、特に真核生物由来の膜タンパク質は一般に不安定であり、安定性、均一性の高いタンパク質を大量に調製することは困難である。筆者らが構造解析に着手した2009年時点で、ChRは緑藻類であるクラミドモナス、ボルボックスの2種からしか単離されていなかったため、筆者らはまず両生物種から単離

Crystal Structure of Channelrhodopsin, a Light-Gated Cation Channel

Hideaki E. KATO and Osamu NUREKI

Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo

※図1-図4は、電子ジャーナル (<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています。

された計4種の野生型 ChR の性質を確認した。しかし、4種の野生型 ChR は、大腸菌、酵母、ほ乳類培養細胞、昆虫細胞といったあらゆる発現ホストで発現を試みても、その発現量は低く安定性も良好ではなかった。そこで筆者らはこの ChR 4種に関して複数のキメラ体を作製し、その発現量と安定性を、C末端側に融合させた EGFP の蛍光によって評価した (FSEC 法¹⁴⁾)。しかし、発現量、安定性の面で最も良好であったキメラ体に関して蒸気拡散法による結晶化を行ったところ、数千条件の検討を重ねても構造解析に適した良質の結晶を得ることはできなかった。

そこで筆者らは、蒸気拡散法とは原理的に異なる“脂質キュービック法 (LCP 法)”を用いて ChR の結晶化を試みた。LCP 法とは、1996 年に考案された「3 次元的に連続した脂質膜中に膜タンパク質を再構成してから結晶化する手法」である¹⁵⁾。この LCP 法を利用して、市販の結晶化スクリーニングキット 5 種 (=約 500 条件) を用い ChR の結晶化を試みたところ、1 条件でのみ ChR の結晶を得ることに成功した。この結晶化条件について条件の最適化を行ったところ、驚くべきことに筆者らは得られた結晶から 2.8 Å の分解能でデータセットを取得することに成功した。しかし、ここでまた位相決定という問題に直面した。既知の微生物型ロドプシンをサーチモデルとした分子置換法では位相が決まらなかったのである。そのため筆者らはセレノメチオニン置換 ChR を用いて位相の決定を試みたが、質量分析を用いてセレノメチオニンの導入効率を評価したところ、半年以上の度重なる条件検討を経ても導入効率は一向に上がらなかった。そこで筆者らは、セレン原子の異常分散を利用した位相決定を諦め、次に様々な重原子との共結晶やソーキングを試みた。ここで、今までの結晶化条件から得られる結晶には“質のばらつき”があり、“再現性”も良好でなく、“条件に含まれていたクエン酸ナトリウムが2価の重金属イオンをキレートしてしまう恐れがあった”ため、新規の結晶化条件を探索することにした。この際、既存の結晶化キットは蒸気拡散法に最適化されたものがほとんどであり、LCP 法には適しておらず (脂質の状態相が変化してしまう) スクリーニング効率が悪いという懸念から、筆者らは LCP 法に最適化した自作の結晶化キットをデザイン・作製し、これを用いて一からスクリーニングを行った。その結果、新たに数条件の結晶化条件を発見することに成功したため、これらの条件を元に結晶化条件の最適化を行いながら重原子の共結晶やソーキングを試みたところ、最終的に塩化メチル水銀との共結晶において、水銀の異常分

散を用いた**多波長異常分散法**によって位相を決めることができた。また、この過程でネイティブタンパク質 (非セレノメチオニン置換体 ChR) に関するデータセットも 2.8 Å から 2.3 Å に向上させることに成功した。様々な試行錯誤を繰り返すことで位相決定に成功したが、蓋を開けてみれば、これは筆者らの知る限り“LCP 法を用いて得られた結晶について、重原子の異常分散を利用して新規に位相を決定した”最初の例であった。

3. ChR の全体構造と構造比較

筆者らが構造を解いた ChR は膜貫通ヘリックス (TM) の 1-5 番がクラミドモナスの ChR1 に、TM6, 7 番がクラミドモナスの ChR2 に由来する全長 356 アミノ酸のキメラ体であり、シグナル配列として働く 1-23 残基、N 末の細胞外ドメイン (24-83)、7 回膜貫通領域 (84-317)、C 末の細胞内ドメイン (318-356) から構成されていた (図 1)¹⁶⁾。N 末の 24-48 残基、1 番目の細胞内ループである 110-117 残基、C 末の 343-356 残基は構造がディスオーダーしているためか電子密度が低くモデルを置くことができなかったが、それ以外の領域については鮮明な電子密度が観測され、モデルを構築することができた。ChR の全体構造において特筆すべき点は、このタンパク質が細胞外ドメイン、TM 3, 4、そして細胞外ループ 1 番同士の間により強固な 2 量体構造を形成している点であった。これは他の微生物型ロドプシンが 3 量体や 4 量体構造を形成しているのとは非常に対照的である^{17), 18)}。また、ChR の構造を現在まで最もよく研究されている微生物型ロドプシンである BR と比較したところ、両者の構造はレチナールの位置を含め非常に一致

図 1 ChR の全体構造。各単量体をそれぞれ緑、紫色で図示した。破線部はディスオーダー領域を表している。

図 2 ChR と BR の構造比較. 各ヘリックスはシリンダーモデルで表記している.

していることがわかった (図 2). しかし, ChR には BR に存在しないドメインが細胞外と細胞内に存在している点, ChR の TM7 は BR のそれと比較して細胞内側まで大きく突き出している点, ChR の TM1, 2 が BR と比較して外側に傾いている点などが異なっていた (図 2). 特に TM1, 2 は BR と比較してその 1 次構造における相同性も低く, 後に詳述するように ChR のイオンチャネル活性において重要な働きを示すことから, 非常に ChR “らしい” ヘリックスであると考えられた.

4. イオン輸送経路の解明

ChR の分子メカニズムを理解するためにはイオンがどこを通るのか, その輸送経路を解明することが必要不可欠である. 発見から 10 年以上経つにも関わらず, ChR のイオン輸送経路については様々な説が飛び交っていた. その中には, ChR は 3 量体を形成しておりイオン輸送経路はその中心に形成されるという説や, 3 量体ではなく 2 量体を形成しその中心をイオンが流れるという説のように「多量体の中心 (境界面) がイオン輸送経路として働く」という説と¹⁹⁾, それとは対照的に「ChR は単量体の中にイオン輸送経路を持つ」という説が存在していた. また, 輸送経路が単量体中に存在すると考える研究者の中でも, イオンがどの TM の間を通るのか, という具体的な話になると意見の一致を見られなかった²⁰⁾.

筆者らの構造を見てみると ChR は細胞外ドメイン同士で強固な 2 量体を形成しており, 3 量体を形成する可能性はきわめて低いと考えられた. また, ChR の分子表面を描いたところ, 2 量体の境界面にはイオンが透過できそうな空間は存在せず, また境界面に並んでいる残基はどれも疎水性残基であった為, 2 量体

図 3 結晶構造から推測されるイオン透過経路. 経路部分の分子表面を図示しており, 赤色部は負電荷, 青色部は正電荷を帯びていることを示している. 点線部は開状態において細胞内と繋がると考えられるパスウェイ. (a) 全体図. (b) 拡大図.

の中心を陽イオンが透過できる可能性も同様に低いと考えられた. しかし一方で, 単量体内の TM1, 2, 3, 7 によって囲まれた領域には強い負電荷を帯びた空間が存在していることがわかった (図 3a). この空間は先にも述べたように, BR と比較して外側に傾いている TM1, 2 によって形成された空間であったため, この空間は ChR 特有のものであり, イオンの透過に重要である可能性は高いと考えられた.

そこで筆者らはこの負電荷領域を形成している 12 の極性アミノ酸のうち 4 つのアミノ酸残基 (Gln95, Lys132, Glu136, Glu140) をアラニンに置換した変異体を作製し (図 3b), パッチクランプ法を用いてその Na^+ 電流を測定した. その結果, 塩基性アミノ酸である Lys132 をアラニン残基に置換した変異体では電流値が変化せず, それ以外の 3 変異体については電流値が低下するという結果が得られた. また, 4 つの残基のうち 3 つの残基については, アラニン残基に置換したことにより K^+ や Ca^{2+} , Na^+ に対するイオン選択性が大きく変化した. これらの結果はいずれも, ChR のイオン輸送経路が TM1, 2, 3, 7 によって囲まれた領域, つまり多量体の境界面ではなく単量体内部に存在している可能性を強く示唆するものであった. 余談ではあるが, 筆者らは今回の結晶構造を元に現在様々な条件下で分子動力学シミュレーションを行っているが, その結果, 実際にこの負電荷領域の奥深くまで水分子が入りこんでくることがわかってきている. こうした結果もまた, この領域が実際にイオン透過経路として働いている可能性を支持するものと言えるだろう.

5. 輸送系路上に存在する2つの狭窄部位とその役割

今回筆者らが明らかにしたのは ChR の暗状態、つまり閉状態の構造である。そのため、ChR のイオン輸送経路は細胞外側には開いていたが、細胞内側は2つの狭窄部位によって閉じていた。1つ目の狭窄部位は輸送経路の中央付近に存在しており、Thr98 が Ser102 を、Ser102 が Asn297 を、Asn297 が Glu129 の位置を順々に固定し、最後に保存された Glu129 が孔を塞ぐ形で突き出すことによって形成されていた(図 4a)。もう一方の狭窄部位は細胞内側に存在しており、Tyr109、Glu122、His173 がチャンネル孔にはまり込むことによって形成されていた(図 4b)。

ここで1つ目の狭窄部位に着目したい。筆者らが立体構造を元に Glu129 の pKa を計算すると、Glu129 は H⁺ 化されていることが予想された。しかし Glu129 の各種変異体を作製しその Na⁺ 電流を測定したところ、予想に反して E129Q 変異体においてその電流値が有為に減少することがわかった。E129Q は Glu129 の H⁺ 化状態を模倣した変異体であると考えられるため、筆者らはこれらの結果から「閉状態で Glu129 は H⁺ 化されているが、光サイクル中で Glu129 は一度脱 H⁺ 化状態になり、その H⁺ 化状態の変化がチャンネル活性に重要なのではないか」という仮説を立てた。

最近筆者らの研究室で今回の結晶構造を用いてシミュレーションを行い、脱 H⁺ 化状態にある Glu129 は確かに Asn297 との水素結合を失いその側鎖の向きを変えることや、その影響でイオン透過経路の半径が広がることを明らかにしつつある。Glu129 が H⁺ 化状態を変化させる理由については未だ不明な点が多いが“Glu129 はチャンネルのゲートとして働いており H⁺ 化 /

脱 H⁺ 化によってその制御が行われている”という筆者らの仮説はある程度の信憑性を持っていると考えられる。

6. 終わりに

今回筆者らは ChR のイオン透過経路やそのゲートについて様々な知見を得ることに成功したが、ChR の分子メカニズムにはまだ不明な点が多い。今後は構造解析や電気生理学のみならず、シミュレーションや電子スピン共鳴法、赤外分光法など様々な手法を組み合わせることが肝要となるであろう。やるべきことは山積みである。

文 献

- 1) Nagel, G. *et al.* (2002) *Science* **296**, 2395-2398.
- 2) Boyden, E. S. *et al.* (2005) *Nat. Neurosci.* **8**, 1263-1268.
- 3) Li, X. *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 17816-17821.
- 4) Nagel, G. *et al.* (2005) *Current biology : CB* **15**, 2279-2284.
- 5) Bi, A. *et al.* (2006) *Neuron* **50**, 23-33.
- 6) Ishizuka, T. *et al.* (2006) *Neurosci. Res.* **54**, 85-94.
- 7) Zhang, F. *et al.* (2006) *Nat. Methods* **3**, 785-792.
- 8) Adamantidis, A. R. *et al.* (2007) *Nature* **450**, 420-424.
- 9) Berndt, A. *et al.* (2009) *Nat. Neurosci.* **12**, 229-234.
- 10) Gunaydin, L. A. *et al.* (2010) *Nat. Neurosci.* **13**, 387-392.
- 11) Berndt, A. *et al.* (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 7595-7600.
- 12) Kleinlogel, S. *et al.* (2011) *Nat. Neurosci.* **14**, 513-518.
- 13) Yizhar, O. *et al.* (2011) *Nature* **477**, 171-178.
- 14) Kawate, T., Gouaux, E. (2006) *Structure* **14**, 673-681.
- 15) Landau, E. M., Rosenbusch, J. P. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14532-14535.
- 16) Kato, H. E. *et al.* (2012) *Nature* **482**, 369-374.
- 17) Gordeliy, V. I. *et al.* (2002) *Nature* **419**, 484-487.
- 18) Matsui, Y. *et al.* (2002) *J. Mol. Biol.* **324**, 469-481.
- 19) Muller, M. *et al.* (2011) *J. Mol. Biol.* **414**, 86-95.
- 20) Bamann, C. *et al.* (2010) *Biochemistry (Mosc.)* **49**, 267-278.

図 4
イオン透過経路上に存在した2つの狭窄部位を細胞内側から見たもの。(a) 主に Glu129 によって形成された狭窄部位。(b) 主に Glu122、Tyr109 によって形成された狭窄部位。黒破線は残基間の相互作用、数値は残基間の距離を示す。

加藤 英明

加藤 英明 (かとう ひであき)

東京大学大学院理学系研究科博士3年
研究内容: 膜タンパク質の構造機能解析
連絡先: 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
E-mail: emekato@biochem.s.u-tokyo.ac.jp

濡木 理

濡木 理 (ぬれき おさむ)

東京大学大学院理学系研究科教授
研究内容: 遺伝暗号の翻訳、膜輸送、がんと自然炎症
連絡先: 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
E-mail: nureki@biochem.s.u-tokyo.ac.jp
URL: <http://www.nurekilab.net>