

新奇的な微生物型ロドプシンの光機能およびその光反応メカニズム

井上 圭一

Keiichi Inoue

東京大学 物性研究所

〒277-8581 千葉県柏市柏の葉 5 丁目 1-5 東京大学物性研究所 A401 号室

E-mail: inoue@issp.u-tokyo.ac.jp

1. 微生物のロドプシン

太陽は地球上に棲む全ての生物の源であり、生き物たちは光エネルギーを、生理活動を駆動するエネルギー源や、周辺の環境を認識するための情報源として利用し、自身の生存に役立っている。そして生物の光利用戦略の中で最も身近なものとして、我々ヒトを含めた動物が持つ視覚と、植物の行う光合成が挙げられる。

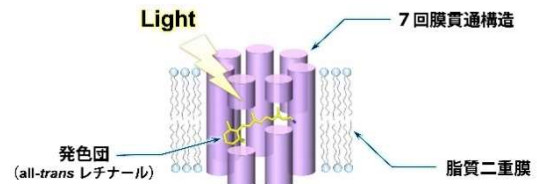
このうち光合成は、植物の葉緑体などに存在する光化学系と呼ばれる巨大タンパク質とクロロフィル色素の複合体が、太陽光のエネルギーを吸収し、高効率で電荷分離反応を起こすことで、アデノシン三リン酸 (ATP) や炭水化物の合成に必要な化学エネルギーを作り出す。

一方、動物の視覚では、目のレンズを通して入射する光を、網膜中に存在する光受容膜タンパク質であるロドプシンが捉え、視神経を通じてその情報を脳に伝達することで、目で見た物体の形や色が認識される。動物型のロドプシンは、ヒトなどの動物の細胞内でホルモンや外来物質など様々な小分子リガンドを認識する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一種であり、7回膜貫通型構造の中心に発色団としてビタミン A の誘導体である 11-*cis* 型のレチナール色素を結合している。そしてレチナールが光を吸収すると *all-trans* 型への光異性化が起こり、それがさらにタンパク質部分の構造変化を引き起こすことで、視細胞内の特殊な G タンパク質 (トランスデュシン, Gt) を活性化し、視覚情報を伝達する神経活動が誘起される。ロ

ドプシンの発見は 1876 年に遡り、網膜中に存在し、可視光に反応する物質としてその存在が記録されている。それをもとに後年ギリシア語でバラ色を表す *rhodon* と視覚を表す *opsis* を組み合わせて *rhodopsin* という名が付けられた。

その後およそ 100 年にわたるヒトをはじめとする様々な動物のロドプシンが研究され、動物の視覚におけるその役割が次第に明らかとされていった。ところが 1971 年に飽和塩濃度環境下で棲息する高度好塩古細菌の一種である *Halobacterium salinarum* が動物のロドプシンに酷似した、レチナールを発色団とする膜タンパク質を持つことが報告された[1]。このタンパク質はバクテリオロドプシン (bacteriorhodopsin, BR) と名付けられたが、目を持たない単細胞生物である古細菌の細胞内で、一体どのような役割を果たしているか、発見当初は不明であった。しかしそれに続く研究によって、BR は光のエネルギーを使って水素

微生物型ロドプシンの基本構造



主な微生物型ロドプシンの機能

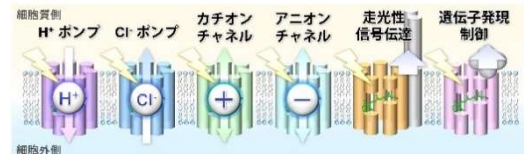


図 1. 微生物ロドプシンの基本構造 (上) とその多様な機能 (下)

イオン（プロトン, H^+ ）を細胞内から細胞外へ輸送する機能を持つことが明らかになり、ATP合成の駆動力となるプロトン濃度勾配を作り出す、光-化学エネルギー変換タンパク質であることが示された[2]。これによりそれまで唯一と考えられていた動物の視覚に関わるロドプシンとは別に、古細菌は進化的に独立した別個のロドプシンを持ち、その目的もエネルギー変換という全く異なるものであることが明らかとなった（図1）。その後の研究により古細菌だけでなく多くの細菌や真核微生物、巨大ウイルスまでがBRに近縁のロドプシンを持ち、それらにはBRの様な外向き H^+ ポンプだけでなく、内向き塩素イオン（ Cl^- ）ポンプや走光性のセンサーなど多様な機能を分子が含まれ、現在ではこれらを総称して微生物型ロドプシンと呼ばれている[3]。

2. センサー型ロドプシンのシグナル伝達過程

この中で私は、2002年に神戸大学理学部化学科から京都大学理学研究科化学専攻の寺嶋正秀教授の研究室に進学し、そこで初めて微生物型ロドプシンを対象とした研究をスタートした。その時に研究対象としたのが、古細菌が青色光を避ける遊泳運動である負の走光性のセンサーとしてはたらく、センサー型ロドプシ

ンII（SRII）であった。SRIIは細胞膜中で巨大なトランスデューサータンパク質（HtrII）と相互作用し、SRIIの光活性化に伴ってHtrIIにその情報が伝達され、さらにHtrIIが細胞内のCheタンパク質群を制御することで、細胞のべん毛の回転パターンが変化し、青色光からの忌避行動が誘発される。しかし当時どの様にしてSRIIからシグナルを受け取ったHtrIIが細胞内へ情報を伝達するのかは分かっていなかった。

この理由の一つに発色団を持たず分光学的に観察が難しいHtrIIの構造変化を、高い時間分解能で捉える事ができる手法がなかったことが挙げられる。そこで私は指導教官であった寺嶋正秀教授が開発された過渡回折格子（TG）法をSRII-HtrII複合体の光反応観察に応用し、シグナル伝達過程の解明を試みた。TG法では分子の体積変化や拡散定数変化を観測することで、発色団を持たない分子であっても室温溶液中において高感度・高時間分解能でタンパク質の構造変化を捉えることができる。そしてSRII-HtrII複合体のTG測定を行ったところ、光反応に伴い複合体の溶液中の並進拡散係数が大きく低下することが示された。さらに分子生物学的にHtrII部分の長さを変えた実験によって、この拡散係数の低下はHtrIIの膜貫通領域から細胞質側へ伸びるHAMPドメインと呼ばれる領域の α -ヘリックス構造が崩壊し、溶媒と多数の水素結合を新たに形成することで生じたものであることが明らかとなった（図2）。このことからSRIIからHtrIIを経て細胞内へとシグナル伝達が行われる過程で、 α -ヘリックス構造の大きな変化が密接に関連していることを、TG法を応用することで初めて明らかとすることに成功した[4]。

3. ナトリウムポンプ型ロドプシン

その後2007年に学位取得後は東京工業大学資源化学研究所（現化学生命科学研究所）の藤井正明教授と酒井誠准教授（当時）の研究室に

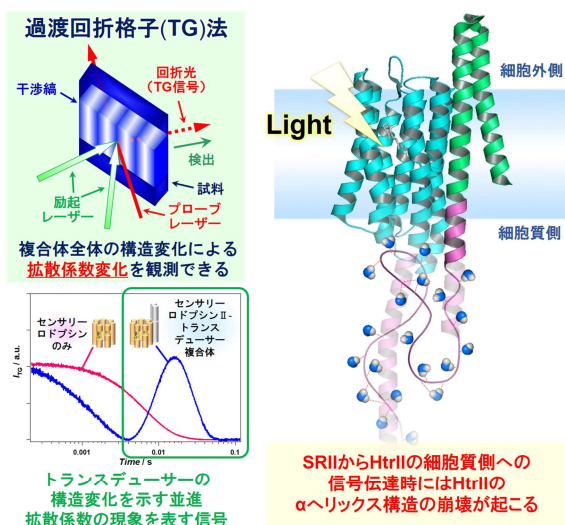


図2. TG法によって明らかにされた、SRIIからのシグナル伝達に伴うHtrIIの構造変化

ポストシリコン事業教員として研究に従事し、この間も SRII 以外のセンサー型ロドプシンの研究を継続し、さらに 2009 年からは名古屋工業大学大学院工学研究科未来材料創成工学専攻（現生命応用化学専攻）の神取秀樹教授の研究室において、助教、その後准教授として H⁺ポンプ型や Cl⁻ポンプ型など、より多様な微生物型ロドプシンについて主に分光学的な研究を行い、その機能メカニズムについて新たな知見を報告した。

一方、この頃から次世代シーケンサーに代表されるようなゲノム配列の解析技術の進展に伴い、膨大な数の微生物のゲノム上にロドプシン遺伝子が続々と発見されるようになった。この中で、我々は東京大学大気海洋研究所・木暮一啓教授、吉澤晋准教授らと共に、東京湾に棲む海洋性の細菌である *Krokinobacter eikastus* が、これまで報告例のないアミノ酸配列のロドプシン遺伝子 (KR2) を持つことに着目した。またこの細菌は一般的な H⁺ポンプ型ロドプシンと思われるアミノ酸配列を持つ遺伝子 (KR1) も持つが、まずはその機能を調べるため、大腸菌に KR1 もしくは KR2 の遺伝子それぞれを導入し、細胞内にタンパク質を発現させたところ、KR1 は予想通り H⁺を外向きに輸送するのが観察されたのに対し、KR2 を発現させた大腸菌に光を照射すると細胞内から細胞外へナトリ

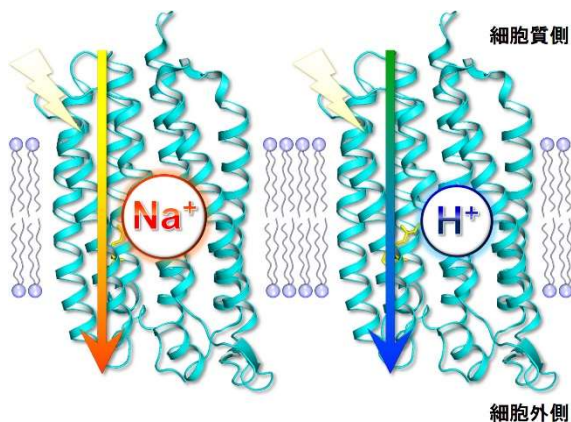


図 3. KR2 は生理学的条件下（海水中）では Na⁺を細胞外側へ輸送するが、Na⁺より大きな陽イオンしかない場合は H⁺を輸送する。

ウムイオン (Na⁺) の放出が見られた。この結果から KR2 は光のエネルギーを使って Na⁺を輸送する Na⁺ポンプ型ロドプシンであることが見出された (図 3)。KR2 以前にはこのような機能を持つタンパク質は知られておらず、海洋に棲む細菌が光のエネルギーを用いて、細胞内に流入する Na⁺イオンの排出に用いていることが明らかとなった[5]。

しかし KR2 の Na⁺輸送メカニズムについて考えると、この分子がどの様にして Na⁺を一方向的に輸送するのか数多くの疑問が持たれた。特に、一般的にイオンポンプ型のロドプシンは、輸送するイオンを光を吸収する前の暗状態においてタンパク質内部に結合し、光エネルギーを獲得すると直ちにそれを輸送するが、KR2 にはその様な Na⁺をタンパク質内には結合しておらず、高い輸送効率を達成するには一見不利のように見受けられた。また分子の中央にあるレチナールはプロトン化し、正の電荷を持っているため、それとの静電反発をどの様に乗り越えて輸送が行われるのかも不明であり（このような問題から KR2 の発見まで、Na⁺ポンプとして働くロドプシンは存在し得ないとも考えられていた）、その輸送メカニズムについて多くの不明な点が存在した。

そこで KR2 の輸送メカニズムを明らかにするため、変異体を用いた機能解析と分光計測を網羅的に行ったところ、光を吸収してレチナールが異性化したあと、およそ 25 マイクロ秒後にレチナールの H⁺がすぐ近傍にあるアスパラギン酸 (Asp116) へと受け渡されることが明らかとなった。そしてそれに続いて、およそ 1 ミリ秒後に細胞質側から Na⁺が取り込まれ、レチナールの細胞外側近傍に位置するアスパラギン (Asn112) へと結合することも示された[6]

さらにより詳細な構造情報を得るため、東京大学大学院理学研究科の濡木理教授および当時濡木研の博士過程の学生であった加藤英明さん（現東京大学大学院総合文化研究科・准教

授)との共同研究により KR2 の X 線結晶構造解析を行った。それにより Asp116 はレチナールから H^+ を受け取ると、さらにその配向をダイナミックに変化させ、近傍の Asn112 や Ser70 と水素結合を形成し、イオン透過経路を開くことが示された。これら分光学的および構造生物学的知見により、現在のところ KR2 は図4の様な形で Na^+ を輸送していると考えられ、レチナールからタンパク質部分への H^+ 移動と、過渡的な Na^+ 結合が関わったこれまでにないイオン輸送メカニズムが明かにされた[7]。

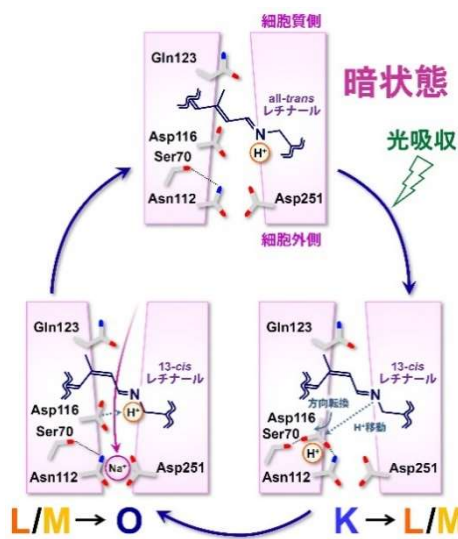


図4. Na^+ ポンプ型ロドプシンのイオン輸送メカニズム

またさらに最近では、これまで知られていた外向き H^+ ポンプ型ロドプシンとは逆の、細胞内側へ H^+ をポンプするロドプシンについても報告を行っている[8-10]。これらの構造は外向き H^+ ポンプと非常によく似通っているが、イオン輸送経路上の酸性アミノ酸残基の位置を組み替えることで、見事に輸送方向が逆転されていることを明らかとしている。

4. 第3のロドプシン：ヘリオロドプシン

上記の様にロドプシンタンパク質は動物型と微生物型の2種類に分類されると考えられていた。その中で2018年イスラエル工科大学の Oded Béjà 教授らが、自身で開発した環境中に含まれる遺伝子断片を大腸菌へ導入し、大腸

菌菌体の発色を見ることでその環境中にあるロドプシン遺伝子の探索を行う手法である、機能性メタゲノム解析を新たにイスラエル国内にあるガリラヤ湖において行った。その結果、驚くべきことに、既存の動物型と微生物型のいずれとも独立した新たな巨大なロドプシンファミリーの存在が明らかにされた。このロドプシンはギリシア語で「太陽のロドプシン」を意味するヘリオロドプシン (HeR) と名付けられ、その分子物性について彼らと共に研究を行ったところ、HeR はペプチド鎖の N 末端側が細胞内に、C 末端側が細胞内に向けた配向を持っていることが明らかとなった[11]。これは微生物型、動物型いずれのロドプシンとも異なるものであり、従来の2種類のロドプシンに対して HeR は膜内でタンパク質の配向が逆転した構造をしていることを意味している (図5)。

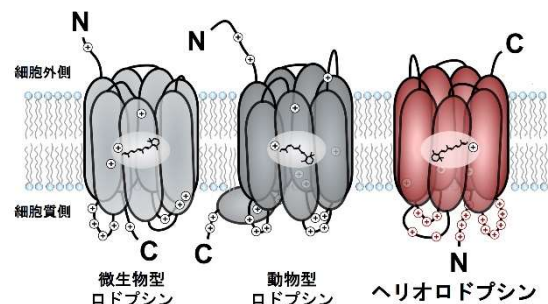


図5. 従来の微生物ロドプシン (左) および動物型ロドプシン (中央) とヘリオロドプシン (右)

一方で、HeR が光によってどのような機能を発現するのか現時点では明らかとなっていないが、真正細菌から古細菌、真核微生物に加え一部の巨大ウイルスのゲノム中にもその遺伝子が存在していることから、これまでにない広範な生物が持つ新しい光利用戦略に関わっていると考えられている。また分光解析により、HeR が光を吸収すると5秒以上の極めて長い光反応サイクルを示すことを明らかにし、さらにその中で他のロドプシンとは異なるメカニズムのプロトン移動を介した、タンパク質の大きな構造変化が起こることを見出した。そして

これらの結果から HeR は未知の細胞内光シグナル伝達のための受容体として機能する可能性が示唆されている。また昨年には濡木理教授および志甫谷渉博士との共同研究を新たに実施し、HeR の結晶構造の決定に成功した[12]。そしてその構造を見ると、レチナールの頭側にあるβイオン環のすぐ近傍に、タンパク質外につながる横穴構造が空いていることが明らかとなった。さらに生化学実験によって、レチナールはこの横穴構造を通してタンパク質内部に結合することが示された。HeR を持つ生物種は全てレチナール合成酵素がゲノム上にコードされていないという、光生物学的に一見奇妙な特徴を有しているが、自然界ではこの横穴構造を利用して、外界から取り入れたレチナールを HeR に結合していると考えられる。今後はこれらの知見をもとに、HeR の分子機能を決定するための研究が急務であり、現在全力を挙げてそちらに取り組んでいる。

5. 最後に

この度栄えある晝馬輝夫科学賞を受賞させていただくこととなり、選考に関わられた先生方や関係者の皆様に深く御礼申し上げます。本研究を行うにあたり、大学院の指導教官であった京都大学寺嶋正秀教授や、ポストシリコン事業教員としてロドプシン研究の継続を支援して下さった東京工業大学藤井正明先生、酒井誠先生（現岡山理科大）、また8年半の長きに渡り、助教・准教授として一緒に研究をさせていただいた名古屋工業大学神取秀樹教授には、大変なご指導・ご鞭撻や、並々ならぬご支援を賜りました。そしてまた上記の先生方の研究室のスタッフや諸先輩方、学生の皆様には、実験を含めたあらゆる面で多大な御協力をいただきました。今回の微生物型ロドプシンのメカニズム研究はこれらの方々の御協力無くしては決して為し得ないものであり、この場を借りて深く御礼申し上げます。また多くの研究は

我々の独力で行うのは難しいものであり、多数の国内外の共同研究者の方々との素晴らしい共同研究によって実現することができました。そちらについても重ねて御礼申し上げます。

現在、微生物型ロドプシンファミリーにはゲノム解析技術の発展により、10,000種類以上の分子があるといわれ、BR の発見から50年近くが経過した今なお広大な未開拓の沃野が存在し、さらに大きな広がりを見せています。今後微生物型ロドプシン研究において、どのような発見が為されていくのか、ぜひ楽しみに見守っていただければ幸いです。

参考文献

- 1) Oesterhelt D. & Stoeckenius W., *Nat. New Biol.* (1971) **233**, 149-152.
- 2) Oesterhelt D. & Stoeckenius W., *Methods Enzymol* (1974) **31**, 667-678.
- 3) Ernst O. P. *et al.*, *Chem. Rev.* (2014) **114**, 126-163.
- 4) Inoue K. *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2008) **376**, 963-970.
- 5) Inoue K. *et al.*, *Nat. Commun.* (2013) **4**, 1678.
- 6) Inoue K. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2015) **54**, 11536-11539.
- 7) Kandori H. *et al.*, *Chem. Rev.* (2018) **118**, 10646-10658.
- 8) Inoue K. *et al.*, *Nat. Commun.* (2016) **7**, 13415.
- 9) Inoue K. *et al.*, *Sci. Adv.* (2020) **6**, eaaz2441.
- 10) Higuchi A.[†], Shihoya W.[†] *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press.
- 11) Pushkarev A.[†], Inoue K.[†] *et al.*, *Nature* (2018) **558**, 595-599.
- 12) Shihoya W. *et al.*, *Nature* (2019) **574**, 132-136.

[†] … 共筆頭著者