

特別寄稿

松大Topics:

新規光遺伝学ツール開発に向けた微生物型ロドプシンの機能解析

松山大学薬学部 生物物理化学研究室 田母神 淳

【はじめに】

光遺伝学（オプトジェネティクス）という言葉をご存じでしょうか？これは、光に反応することで機能するタンパク質を遺伝学的手法を用いて特定の細胞（特に脳神経細胞）に人為的に発現させ、その細胞の活動を光によって操作する技術に対して使われている言葉ですが、2005年に米国・ドイツの研究グループにより発表されてから¹⁾、またたく間に研究者の間で広まり、今や脳神経科学の分野だけでなく、さまざまな分野で応用され、生命科学研究の幅広いフィールドにおいて重要なツールとなりつつあります。薬学の分野においても、難治性の神経疾患などに対する新薬開発の足がかりとして、特定細胞の操作による行動との因果関係を調べるための一般的な手法として使われるようになってきています。

光遺伝学論文の最初の発表からおよそ15年が経ち、この革新的技術に対して現在ではさまざまな光受容タンパク質分子が使われるようになってきていますが、開発当初から現在まで常に重要な役割を果たしてきているのが、実は古細菌や真正細菌、真核生物の中でも比較的下等な生物に位置づけられるカビや微細藻類などの微生物がもつ“ロドプシン”（高等動物の視覚に関係するロドプシンと区別するために、ここでは“微生物型ロドプシン”とよぶ）です。当研究室では、光遺伝学が誕生する前からこのタンパク質ファミリーの分子機構に興味をもって研究を行ってきました。本稿では、微生物型ロドプシンの発見から光遺伝学誕生までの流れと新規光遺伝学ツール開発につなげるための微生物型ロドプシンの機能解析の重要性について、展望も交えて概説したいと思います。

【微生物型ロドプシンの発見と普遍性】

微生物型ロドプシンが最初に発見されたのは、今から約半世紀も前の1971年にまでさかのぼります²⁾。塩田あるいは塩湖などの塩濃度が高い環境に好んで棲息する高度好塩菌の一種から私たち高等生物がもつロドプシンと同様に、発色団としてレチナールを内部に結合するタンパク質が発見され、細菌（バクテリア）から発見されたロドプシン様タンパク質ということでバクテリオロドプシン（BR）と命名されました。BRは光を受けると細胞の内側から外側に水素イオン（ H^+ ）を運びます。これにより、細胞の内外に H^+ の濃度勾配ができますので、それを駆動力にATP合成酵素が働き、BRをもつ細菌は溶存酸素の少ない高塩の環境下でも光からエネルギーを得て生き延びることができます。BRが発見されて以降、その後の研究から同じ細菌には、塩化物イオン（ Cl^- ）を細胞外から細胞内へと取り込むハロロドプシン（HR）や光に対する誘因・忌避応答のセンサーとして働くロドプシンなども見つかり、その機能は1つだけではなく、多岐に渡っていることも明らかになりました。

高度好塩菌は、系統学的には古細菌に分類されますが、BRをはじめとする微生物型のロドプシンは、当初、古細菌にのみしかその存在が認められておらず、一部の特殊な菌のみがもつマイナーなタンパク質と考えられてきました。しかし、2000年代に入ってゲノム解析の技術が格段に進歩したことにより、その認識が大きく変わることになりました。これまでは存在しないと考えられていた海洋細菌やシアノバクテリア、真核生物であるカビや藻類といった私たちの身の回りのごくありふれた微生物からも同種のタンパク質の遺伝子が見つかり、自然界に広く存在することが明らかになったからです。したがって、現状ではまだまだ生理的役割が不明なものも多いですが、微生物型ロドプシンは生物界全般に渡って何らかの重要な役割を果たしている存在であると考えられるようになってきています。

【チャンネルロドプシンの発見と光遺伝学の確立】

ゲノム科学が進展したことでもたらされたこの分野における最大の発見は、チャンネルロドプシン (ChR) とよばれるロドプシンが見つかったことです。ChR は、2002年に淡水に棲む緑藻のクラミドモナス (別名: コナミドリムシ) から発見されました³⁾。ChR はその名前からもわかる通り、 H^+ や Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} など1価や2価の陽イオンを通す光開閉型のチャンネルとして働くことがわかりました。この発見により、この分子を光依存的に細胞の膜電位を調節するツールに使おうという発想が生まれます。このアイデアは実は以前からあったようですが、これまで知られていたBRやHRといったロドプシンは1回の光反応で能動的に1個のイオンしか運ぶことができないイオンポンプであり、細胞の膜電位を大きく変えるほどのイオンの流れを光照射により生むことはできないと考えられていたため実現には至っていませんでした。

静止膜電位の状態にある神経細胞において、 Na^+ チャンネルが開いて Na^+ が細胞内に流入すると、脱分極が起こり、神経興奮を引き起こされます。これと同じ反応をChRを使って光照射をトリガーに行おうという試みが、冒頭で触れた2005年の論文で、この方法で見事に神経興奮を引き起こすことに成功します。この成功に続いて、今度は内向きの Cl^- ポンプであるHRを使って、過分極を起こし、神経抑制を引き起こすことができることもわかりました。

光遺伝学の大きな利点は、従来から使われていた電気刺激や薬物投与による操作方法とは違い、光を使って特定の細胞のみを選択的に、しかも高い時間精度で操作することができるという点です。この方法によって、ある細胞の操作とそれによって起こる行動の因果関係をより明確に示すことが可能になりました。

【BRをモデルとした微生物型ロドプシンのイオン輸送機構の解析と今後の展望】

ここまで、微生物型ロドプシンの光遺伝学への応用にスポットライトを当てて解説してきましたが、さらなる応用をめざすためには、微生物型ロドプシンの機能メカニズムを徹底的に調査し、その仕組みを詳細に理解することも重要になります。光遺伝学では、多数の候補となるロドプシン分子の中からスクリーニングにより、最も大きな反応を引き起こすものが使われています。しかし、なぜそれが他の同じ機能をもつ類似タンパク質と比較して優れているのかについて、分子機構に立脚して合理的な説明が十分になされているとはいえません。光遺伝学ツール開発の最終目標は、目的に応じた実用的ツールを分子機構に基づいた遺伝子改変などにより自由自在にデザインし、創出できることだと考えます。こうした観点から、当研究室では微生物型ロドプシンの分子機構の全容解明を目標に日々研究に取り組んでいます。

私たちが現在、特に興味をもって研究しているのは、BRに代表されるような光駆動 H^+ ポンプ型のロドプシンです。実は、この分子も神経細胞に発現させ、光を照射することで、 H^+ を細胞内から細胞外へと運び、細胞内に負の膜電位を生じさせる(過分極)ことから、HRと同様に神経抑制を誘発することができることがわかりました。さらに、過分極を起こすだけでなく、 H^+ を細胞外にくみ出すことで、細胞内のpHを上昇(アルカリ化)させるというもう1つの効果も同時に付与することができます。興味深いことに、最近の研究で、脳虚血時に起こるグリア細胞からの過剰なグルタミン酸の放出が、光駆動 H^+ ポンプ型ロドプシンを使った光操作による細胞内のアルカリ化で抑制され、脳細胞死の進行を緩和することができることもわかってきました⁴⁾。したがって、 H^+ ポンプ型ロドプシンの研究と改変によるツール開発は、光による新たな治療法の開発などにもつながるかもしれません。

私たちが H^+ ポンプ型ロドプシンに注目しているもう1つの理由は、BRというよく研究されたモデル系が存在することです。BRは、分光学的・構造学的視点から分子機構の理解がかなり進んでいる数少ない膜タンパク質の1つであり、 H^+ がどういった経路で輸送されるのか、アミノ酸レベルで詳細に研究されています。一方、2000年以降に新たに見つかった真正細菌や真核生物由来の H^+ ポンプ型ロドプシンについては、まだまだ分子メカニズムの理解は十分とはいえません。私たちは、これらの新規の H^+ ポンプ型ロドプシンの分子機構について、BRの知見を参考にしながら明らかにしたいと考えています。具体的には、海洋細菌やカサノリという海藻にある H^+ ポンプ型ロドプシンについて研究を行っており、BRにおいて知られていなかった光反応の速さを調節する新たな機構を見出しています⁵⁾。

自然界から光遺伝学ツールとなり得るロドプシンを探索し、その分子機構を明らかにした上で、新たなツール開発につなげていくという流れは、ちょうど新薬開発のためのシーズとなるリード化合物を見つけ、それをもとに合理的な改変などを加えながら、効果的なクスリを創出していくという創薬の流れと似ています。私たちは、微生物型ロドプシンの機能解析を中心とした基礎研究によって得られた情報をもとに、新規光遺伝学

ツールの開発に貢献していきたいと考えています。

【参考文献】

- 1) Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., et al., Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neurosci.* 8, 1263-1268 (2005)
- 2) Oesterhelt, D. & Stoerkenius, W., Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature New. Biol.* 233, 149-152 (1971)
- 3) Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., et al., Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296, 2395-2398 (2002)
- 4) Beppu, K., Sasaki, T., Tanaka, K.F., et al., Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron* 81, 314-320 (2014)
- 5) Tamogami, J., Kikukawa, T., Ohkawa, K. et al., Interhelical interactions between D92 and C218 in the cytoplasmic domain regulate proton uptake upon N-decay in the proton transport of *Acetabularia* rhodopsin II. *J. Photochem. Photobiol. B* 183, 35-45 (2018)

がんや血栓の新しい治療薬を届けたい。
第一三共が積み重ねてきたサイエンスに
新しい切り口を加えて
生まれるイノベーション。
その先に、希望という名の
ゴールがあると信じて。



イノベーションに情熱を。
ひとに思いやりを。



Daiichi-Sankyo
第一三共株式会社