

4D01

光誘起赤外差分分光法によるチャネルロドプシンの分子機構研究

○稲熊あすみ^{1,2}、塚本寿夫¹、木村哲就^{1,3}、石塚徹^{3,4}、八尾寛^{3,4}、古谷祐詞^{1,2}

¹ 分子研、² JST PRESTO、³ JST CREST、⁴ 東北大院・生命科学

Investigation of the molecular mechanism of Channelrhodopsin by light-induced difference FTIR spectroscopy.

○Asumi Inaguma^{1,2}, Hisao Tsukamoto¹, Tetsunari Kimura^{1,3}, Toru Ishizuka^{3,4}, Hiromu Yawo^{3,4}, Yuji Furutani^{1,2}

【背景】 チャネルロドプシンは、緑藻類のクラミドモナスの光受容器官 (eyespot) に存在する 7 回膜貫通型膜タンパク質である。発色団として全トランスレチナールを持ち、その光異性化によりタンパク質の構造を変化させて、ナトリウムイオンなどの陽イオンを細胞内へと透過する光開閉チャネルとして機能する。

クラミドモナスには、チャネルロドプシン-1 (ChR1) とチャネルロドプシン-2 (ChR2) の 2 種類が存在する。ChR2 は、青色光を照射した数ピコ秒後に P₁⁵⁰⁰ になり、P₂³⁹⁰ を経て、陽イオンを透過する P₃⁵²⁰ になった後、最も長寿命な中間体 P₄⁴⁸⁰ を経て、基底状態へと戻るフォトサイクルを示す。また、ChR1 と ChR2 のキメラが特徴的な電気生理応答を示すことが報告され¹⁾、2012 年には ChR1 と ChR2 から作製されたキメラチャネルロドプシンの暗状態の結晶構造が解かれた²⁾。さらに、ChR2 に対する時間分解赤外分光計測は報告されているが、ChR1 やキメラチャネルロドプシンの報告はない。本研究では、ChR1 の配列を含むキメラチャネルロドプシンの光反応を解析することで、ChR1 と ChR2 の違いや、キメラの光応答特性の分子機構を明らかにすることを目的とした。

【手法】 野生型 ChR2、キメラチャネルロドプシン ChR_{5/2} (ChR1 の膜貫通領域 1~5 番目 + ChR2 の膜貫通領域 6~7 番目)、ChR_{2/5} (ChR1 の膜貫通領域 1~2 番目 + ChR2 の膜貫通領域 3~7 番目) (図 1)、およびそれらの変異体のコンストラクトを作製し、哺乳培養細胞でタンパク質を発現させた。精製後、脂質に再構成したサンプルを、全反射フーリエ変換赤

外分光器で計測した。光を当てない基底状態と、460 nm の光を照射した光定常状態の赤外吸収スペクトルを測定し、そこから赤外差吸収スペクトルを得た。

【結果】 ChR2、ChR_{5/2}、ChR_{2/5} の差吸収スペクトルを比較したところ、キメラ同士のスペクトルは類似しているが、ChR2 とキメラにはスペクトルの形状に違いが見られた (図 2)。1760~1700 cm⁻¹ のカルボン酸の変化が現れる領域に 2 つのネガティブバンド (1738 および 1718 cm⁻¹ 付近) が確認されたが、そのバンドの強度は、各々のチャネルロドプシンにより異なっていた。

次に、ChR_{5/2}、ChR_{2/5} の変異体に対する解析を行った。2 番目のヘリックス上にあ

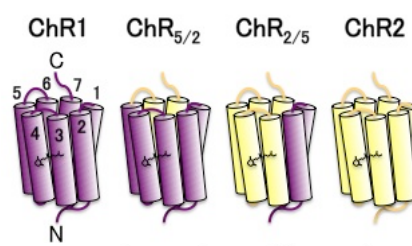


図1. 野生型チャネルロドプシン及びキメラチャネルロドプシンの模式図。

る 129 番目のグルタミン酸 (Glu129) をグルタミンにした変異体 (E129Q) では、 1720 cm^{-1} のバンドが消失し、4 番目のヘリックス上の 195 番目のアスパラギン酸 (Asp195) をアスパラギンに置換した変異体 (D195N) では、 1738 cm^{-1} 付近のバンドが消失した。このことから 1720 cm^{-1} のバンドは Glu129 に、 1738 cm^{-1} 付近のバンドは Asp195 に帰属される。

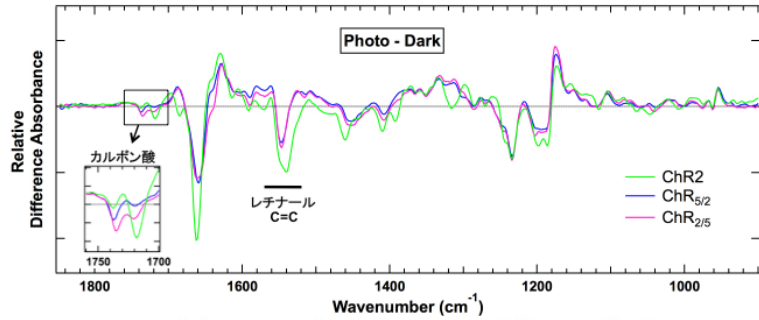


図2. チャネルロドプシン-2 及びキメラチャネルロドプシンの差吸収スペクトル。

【考察】 光定常状態の主な構成成分は P_4^{480} であり、実験で得られた差吸収スペクトルは基底状態と P_4^{480} の違いを表すと考えられる。ChR_{5/2} と ChR_{2/5} の差吸収スペクトルが類似し、ChR2 とは異なっていることから、1~2 番目の膜貫通領域が ChR1 型であることが、キメラの光応答特性に重要な役割を果たしていることが分かった。

Glu129 の脱プロトン化は 1720 cm^{-1} にネガティブバンドとして現れ、そのシグナル強度は ChR2 > ChR_{2/5} > ChR_{5/2} と、ChR1 の膜貫通領域を多く含むキメラになるにつれて小さくなった。この結果は、電気生理の光電流計測で見られる脱感作の大きさと相関している¹⁾。従って、Glu129 の脱プロトン化によって脱感作が引き起こされるが、ChR1 領域の割合が増すことで Glu129 の脱プロトン化は抑制されて脱感作が抑えられることが示唆された。

ChR2 の P_3^{520} の差吸収スペクトルでは、 $1554(-)/1542(+)$ にレチナールの C=C 伸縮振動に帰属されるバンドが特徴的に現れることが報告されている。4 番目のヘリックス上の Asp195 をアスパラギンに置換した変異体では、 1550 cm^{-1} 付近にネガティブとポジティブの対になったバンドが見られた。このことから、この変異体では、チャネル閉鎖に関わる残基が欠損しているため P_3^{520} が長寿命化し、光定常状態で P_3^{520} が主たる成分になっていると考えられる。ChR2 の Asp156 変異体 (本研究の Asp195 に相当) で P_3^{520} が長寿命化することは可視吸収変化の計測でも報告されており³⁾、今回の結果を裏付けている。キメラの差吸収スペクトルで、 1738 cm^{-1} 付近のネガティブバンドが Asp195 に帰属されることから、Asp195 の脱プロトン化によりチャネルが閉じると考えられる。

【結論】 本研究では、光誘起赤外差分分光法を用いて、野生型 ChR2、およびキメラチャネルロドプシン ChR_{5/2}、ChR_{2/5} の解析を行った。キメラでは、1~2 番目の膜貫通領域が ChR1 型であるために、その光定常状態の構造変化が ChR2 とは異なることが分かった。また、Glu129 の脱プロトン化が光電流の脱感作に、一方、Asp195 の脱プロトン化はチャネルの閉鎖に重要な役割を果たしていることが示唆された。

【参考文献】 1) Wang H. *et al.*, J. Biol. Chem. 284(9), 5685-96 (2009). 2) Kato H. E. *et al.*, Nature 482(7385), 369-74 (2012). 3) Bamann C. *et al.*, Biochemistry 49(2), 267-78 (2010).