

トピックス

新規な光異性化経路を有する微生物型ロドプシンの発見

Discovery of novel microbial rhodopsin having unusual photoisomerization process

レチナール(ビタミン A アルデヒド)を発色団とする光受容タンパク質はロドプシンと呼ばれ、自然界においてこれまでに、動物・植物・真菌・真正細菌・古細菌といった広範な生物種から数千種以上のものが単離同定されている。ロドプシンは、レチナールを包含する7回の膜貫通領域を共通してもつ膜タンパク質であり、そのアミノ酸配列から動物型ロドプシンと微生物型ロドプシンに分類される¹⁾。動物型ロドプシンは、三量体Gタンパク質共役型受容体であり光センサー(主として視覚機能)として機能を発揮するが²⁾³⁾、微生物型ロドプシンは光駆動イオンポンプ、光開閉イオンチャンネル、光センサー、光活性化酵素など機能的に異なるグループに分類される⁴⁾⁵⁾。両者は、タンパク質部分のアミノ酸配列の相同性がなく異なる祖先分子が独立に進化してきたものと考えられているが、タンパク質の立体構造や発色団レチナールを結合する特徴など、共通点も多くみられる。

ロドプシン中のレチナールのアルデヒド基は、タンパク質(オプシンと呼ぶ)のアミノ酸配列中のリシン残

基とプロトン化シッフ塩基結合(PSB)を形成する。レチナール分子は光を吸収すると異性化し、それがタンパク質部分の構造変化を誘起する。そしてロドプシンは様々な中間体を経由することによりその機能を発揮する。動物型ロドプシンは、11シス-レチナールを発色団とし光吸収により全トランス-レチナールへ異性化するのに対して、微生物型ロドプシンは、全トランス-レチナールを発色団とし光吸収により13シス-レチナールへ異性化することが知られている(図1)¹⁾。

近年においても新しいロドプシンの発見が相次いでいるが、発色団レチナールの異性化方向が全トランス型から13シス型とは異なる微生物型ロドプシンが発見された。そのひとつは藻類より単離されたベストロドプシンであり、通常のロドプシンドメイン(7回膜貫通構造)のN末端側にもうひとつ膜貫通領域を持つユニークな8回膜貫通構造に加えて、C末端側にベストロフィン様イオンチャンネルドメインを持つ。光を吸収するとレチナールは全トランス型から11シス型へ異性化し、イオンチャンネルの機能を発揮する⁶⁾。もう

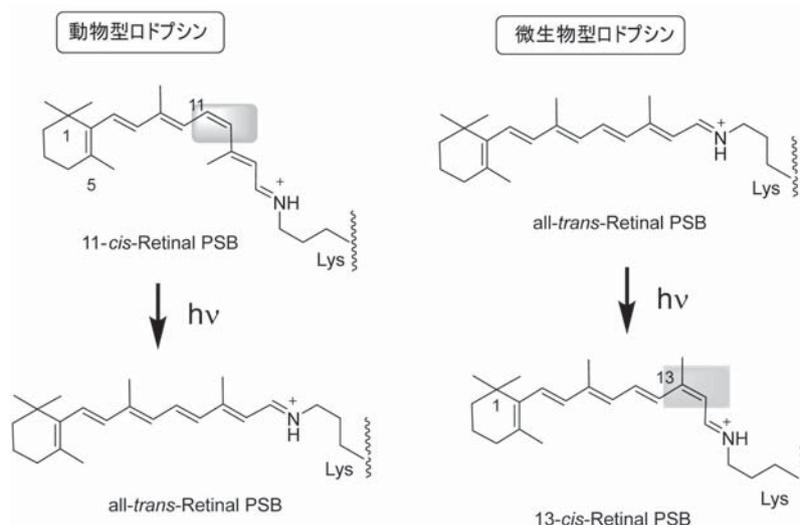


図1 ロドプシン類の光異性化反応

ひとつは、真菌 *Rhizoclostridium globosum* より単離されたネオロドプシンであり、ロドプシンドメインのN末端側にもうひとつの膜貫通領域を持つことに加えてC末端側に酵素ドメインが融合し、光により酵素作用を発揮する⁷⁾。別の真菌 *Obelidium mucronatum* より単離されたネオロドプシンの解析で、光を吸収するとレチナルが全トランス型から7シス型へと異性化することが示され、レチナルの異性化方向が極めて特徴的であることが判明した⁸⁾。さらに、レチナル異性化後に生成する活性中間体の吸収極大波長は紫外領域

にあるため、この中間体のレチナルシッフ塩基結合は、これまでの微生物型ロドプシンでみられたプロトン化状態ではなく脱プロトン化していると考えられた(図2)。

レチナルを有機溶媒中で光照射すると、生成する異性体の大部分はモノシス体で、その構造は13シス型、11シス型および9シス型がほとんどで7シス型はほとんど得られないことが知られている⁹⁾。実際、我々が行った全トランス-レチナルの蛍光灯照射後のHPLC分析でも同様な結果が得られている(図3)。

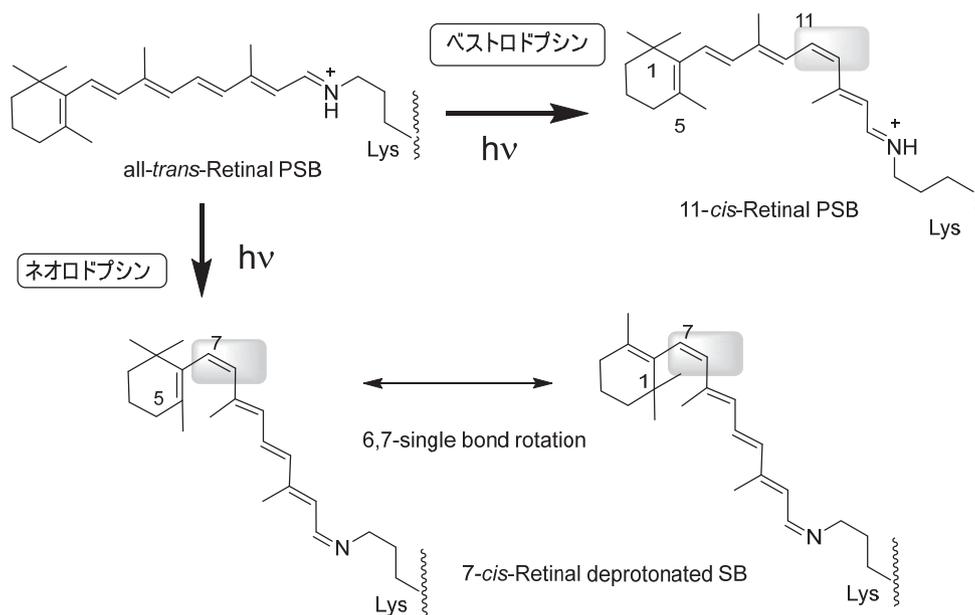


図2 新規な光異性化経路を持つ微生物型ロドプシン類

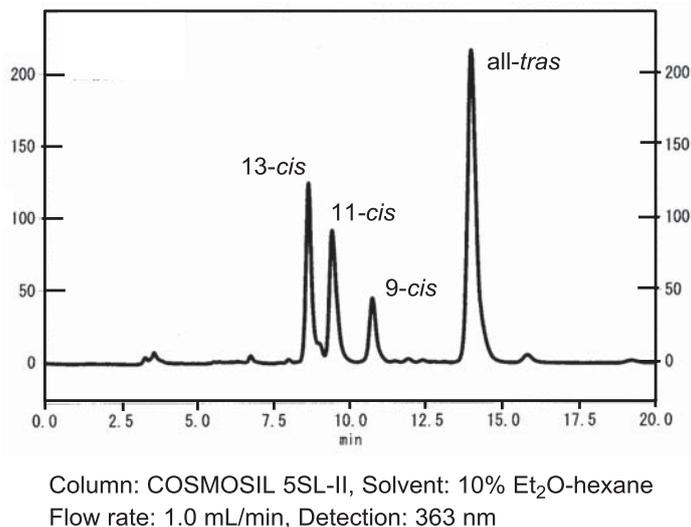


図3 全トランス-レチナルの蛍光灯照射後のHPLCクロマトグラム

レチナルの7シス-異性体が得られないのは、異性化後の5位のメチル基と9位のメチル基、あるいは1位のジメチル基と9位のメチル基との立体反発が大きく(図2で示すどちらのコンホメーションをタンパク質中でとっているかは明らかとなっていない)、側鎖部分が大きくねじれる必要があり極めてエネルギー的には不安定で不利となっているためである。ネオロドプシンにおいてレチナルが7シス型に光異性化できることは、異性化後にタンパク質部分がレチナルの7シス型構造を堅固に固定化しているためと思われる。

また、このタンパク質による発色団の固定化は、光反応にも大きく関与していると考えられる。通常、微生物型ロドプシンは、液体窒素温度のような低温下で光照射しても、レチナルの異性化にともなって光反応する¹⁾。しかし、ネオロドプシンは、マイナス3度で光照射をしても室温の半分程度の光反応しか示さず、それ以下の温度ではほとんど光反応しなかった。このことは、ネオロドプシンでは励起状態において全トランス型から7シス型への異性化に非常に高い反応エネルギー障壁が存在しており、この障壁を作り出すためにタンパク質部分が大きく寄与している可能性を示している。ベストロドプシンにおいても、マイナス100度ではわずかに光反応を示すものの、それ以下の温度では全く光反応しないことが判明した。このように低温で光反応しないのは、ネオロドプシンと同様にタンパク質部分との相互作用によって、レチナルの11位での異性化に比較的高いエネルギー障壁ができていたためと思われる。

ベストロドプシンにおいてみられるレチナルの全トランス型と11シス型との変換は、動物型ロドプシンにおいて広くみられる¹⁾。また、ネオロドプシンにおいてみられるレチナルの全トランス型と7シス型との変換は、動物型ロドプシンにおいても観察の報告がある¹⁰⁾。微生物型ロドプシンと動物型ロドプシンは、同じレチナルを発色団として用いながら、レチナルの光異性化経路は異なると考えられてきたが、一部では共通の光異性化経路を持つものを進化的に創製していたと言える。

ヒトの視覚は桿体視細胞のロドプシン(吸収極大波長:500 nm)と錐体視細胞の3種類の錐体視物質(吸収極大波長:420 nm, 535 nm, 565 nm)により担われるため、これらがカバーできる400~700 nmが可視光の波長領域と定義されている。これまでの様々なロドプシンの吸収極大波長をみると、400 nmよりも短波長のものはよく知られるものの、600 nmよりも長波長の

ものは非常に稀であった。ベストロドプシンの吸収極大波長は660 nm、ネオロドプシンの吸収極大波長は690 nmであり、これまでのものと比べて大きく長波長シフトしていることもこれらのロドプシン類の特徴のひとつとなっている。

近年、チャンネルロドプシンを脳の神経細胞に発現させ、その神経細胞の活性を光で操作する技術が開発されてオプトジェネティクスと呼ばれる¹¹⁾¹²⁾。神経科学の研究領域では、ある行動や現象を司る神経細胞を同定するため、他の細胞に影響することなく脳内の特定の細胞の活性だけを制御する方法が求められていた。電極や薬剤を用いて刺激を行う従来の方法に比べて、光で刺激を行う方法は、低侵襲的に特定の細胞の活性のみを制御できる画期的な方法・技術となっている。そのため、オプトジェネティクスは非常に有用な研究分野であり、脳神経の機能解明に大きく貢献するとともに脳神経変性疾患や精神神経疾患の発病メカニズムの解明へとつながることが期待される。光は波長によりエネルギーが異なるため(波長が長いほどエネルギーは小さくなる)、チャンネルロドプシンを活性化する光は、毒性が小さい長波長のものの方が有用とされている。これまでも長波長光で活性化されるチャンネルロドプシンが単離されてきた¹³⁾¹⁴⁾が、今回紹介したベストロドプシンおよびネオロドプシンは近赤外光を吸収できることから、今後のオプトジェネティクスへの応用が期待される場所である。

Key words :bestrhodopsin, neorhodopsin, 11-*cis*-retinal, 9-*cis*-retinal, unusual photoisomerization

¹Department of Biophysics, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto 606-8502

²Laboratory of Organic Chemistry for Life Science, Kobe Pharmaceutical University, Kobe 658-8558

Takahiro Yamashita¹, Akimori Wada²

¹京都大学・大学院理学研究科・生物物理

²神戸薬科大学・生命有機化学

山下 高廣¹, 和田 昭盛²

利益相反自己申告: 申告すべきものなし

(2023.5.24 受付)

文 献

- 1) Ernst OP, Lodowski DT, Elstner M, Hegemann P, Brown LS, Kandori H (2014) Microbial and animal rhodopsins: Structures, functions, and molecular mechanisms. *Chem Rev* **114**, 126–163
- 2) Deupi X, Standfuss J, Schertler G (2012) Conserved activation pathways in G-protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans* **40**, 383–388
- 3) 小島慧一 (2021) 光受容タンパク質・ロドプシンの生物物理化学研究 薬学雑誌 **141**, 1155–1160
- 4) Rozenberg A, Inoue K, Kandori, H, Bejà, O (2021) Microbial Rhodopsins: The Last Two Decades. *Annu Rev Microbiol* **75**, 427–447
- 5) 須藤雄気, 小島慧一 (2020) 微生物ロドプシンの多様性と可能性 生物物理 **60**, 209–214
- 6) Rozenberg A, Kaczmarczyk I, Matzov D, Vierock J, Nagata T, Sugiura M, Katayama K, Kawasaki Y, Konno M, Nagasaka Y, Aoyama M, Das I, Pahima E, Church J, Adam S, Borin VA, Chazan A, Augustin S, Wietek J, Dine J, Peleg Y, Kawanabe A, Fujiwara Y, Yizhar O, Sheves M, Schapiro I, Furutani Y, Kandori H, Inoue K, Hegemann P, Beja O, Shalev-Benami M (2022) Rhodopsin-bestrophin fusion proteins from unicellular algae form gigantic pentameric ion channels. *Nat Struct Mol Biol* **29**, 592–603
- 7) Broser M, Spreen A, Konold PE, Peter E, Adam S, Borin V, Schapiro I, Seifert R, Kennis JTM, Bernal Sierra YA, Hegemann P (2020) NeoR, a near-infrared absorbing rhodopsin. *Nat Commun* **11**, 5682
- 8) Sugiura M, Ishikawa K, Katayama K, Sumii Y, Abe-Yoshizumi R, Tsunoda SP, Furutani Y, Shibata N, Brown LB, Kandori H (2022) Unusual photoisomerization pathway in a near-infrared light absorbing enzymehhodopsin. *J Phys Chem Lett* **13**, 9539–9543
- 9) Tsukida K, Kodama A, Ito M (1977) Simultaneous determination of *cis-trans* isomeric retinals by high-performance liquid chromatography. *J Chromat* **134**, 331–336
- 10) Matsuyama T, Yamashita T, Imamoto Y, Shichida Y (2012) Photochemical properties of mammalian melanopsin. *Biochemistry* **51**, 5454–5462
- 11) Deisseroth K (2011) Optogenetics. *Nat Methods* **8**, 26–29
- 12) Govorunova EG, Sineshchekov OA, Li H, Spudich JL (2017) Microbial rhodopsins: Diversity, mechanisms, and optogenetic applications. *Annu Rev Biochem* **86**, 845–872
- 13) Klapoetke NC, Murata Y, Kim SS, Pulver SR, Birdsey-Benson A, Cho YK, Morimoto TK, Chuong AS, Carpenter EJ, Tian Z, Wang J, Xie Y, Yan Z, Zhang Y, Chow BY, Surek B, Melkonian M, Jayaraman V, Constantine-Paton M, Wong GK, Boyden ES (2014) Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nat Methods* **11**, 338–346
- 14) Govorunova EG, Sineshchekov OA, Li H, Wang Y, Brown LS, Spudich JL. (2020) RubyACRs, nonalgal anion channelrhodopsins with highly red-shifted absorption. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**, 22833–22840