

研究報告書

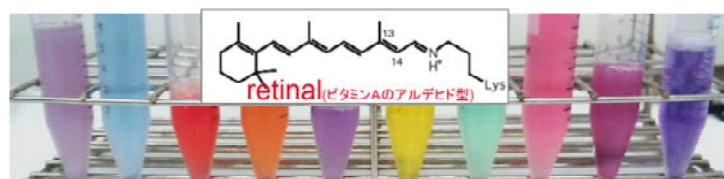
研究課題名：「光機能性・制御性蛋白質による細胞・個体操作」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：須藤 雄気

1. 研究のねらい

光は、生物にとって重要なエネルギー源であり情報源である。生体内で光を受け取る実体は、光を吸収するための発色団を含んだタンパク質分子で、総称して光受容タンパク質と呼ばれる。緑色蛍光タンパク質(GFP)に代表される蛍光タンパク質により、細胞内の現象を可視化(観る)ことが可能となり、広く生命科学者が利用している。レチナール(ロドプシン)タンパク質は、その名の通り、ビタミンAのアルデヒド型であるレチナールを発色団としたタンパク質群の総称で、光によりエネルギー(電気化学ポテンシャル差)を産生するタンパク質、我々の視覚/色覚を司るタンパク質など、多彩な機能の特徴とする(図1)。2000年以降、ゲノムプロジェクトの進展により、5000を越える分子が自然界から見つかった。本研究では、これらロドプシン分子により、細胞や個体を“観る”ことから一歩進んで、“操る”ことが可能なツールを開発することを目指した。



“Rhodopsin”(ロドプシンとは?)

- Having a **retinal** as a chromophore
(発色団としてレチナールを持つ)
- Having **seven transmembrane** α -helices
(7回膜貫通型 α ヘリックス構造を持つ)
- ~5000 **examples** have been isolated from various organisms, showing **various functions**.
(5000を越える分子が発見されており、様々な機能を持つ)

図1: 保持するレチナールタンパク質(ロドプシン)

2. 研究成果

本研究は、研究目的の達成のため、以下の3つの課題を同時並行的に行った(図2)。

- (1) 新しいロドプシンの取得
- (2) それらを含めたロドプシン分子の性質の解析
- (3) ロドプシンを用いた細胞や個体の操作にわかれる

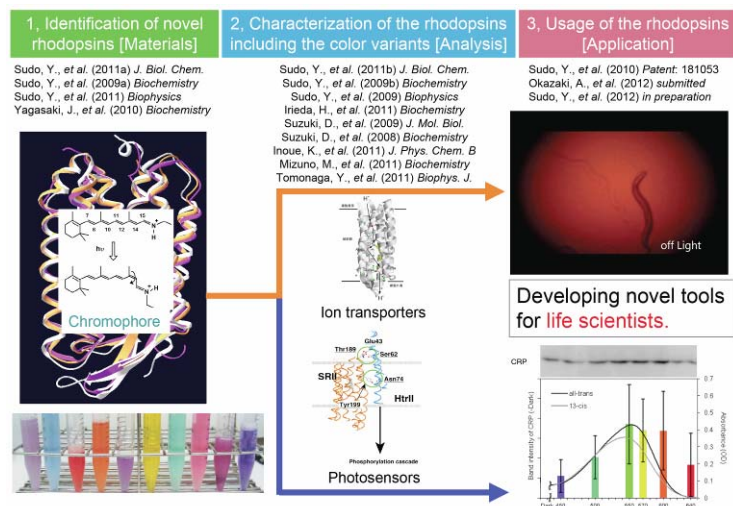


図2: 本研究の流れと成果

(1) ロドプシン分子の同定・単離・精製(図3)

四角形をした古細菌 *H. walsbyi* から微生物由来としてはじめて 11-*cis* 型レチナルを発色団とする分子を発見し、MR と命名した[Sudo et al. (2011a) *J. Biol. Chem.*]. この分子は、微生物型ロドプシンの分子進化を考える上で、光反応、発色団組成、機能分化について興味深い知見を与えた。また、古細菌 *H. vallismortis* から、光センサータンパク質の精製に成功し、HvSR1 と名付けた[Yagasaki et al. (2010) *Biochemistry*]. さらに、光情報を細胞内で処理するタンパク質群の同定・単離・精製に成功した[Sudo et al. (2009a) *Biochemistry*, Sudo et al. (2011) *Biophysics*].

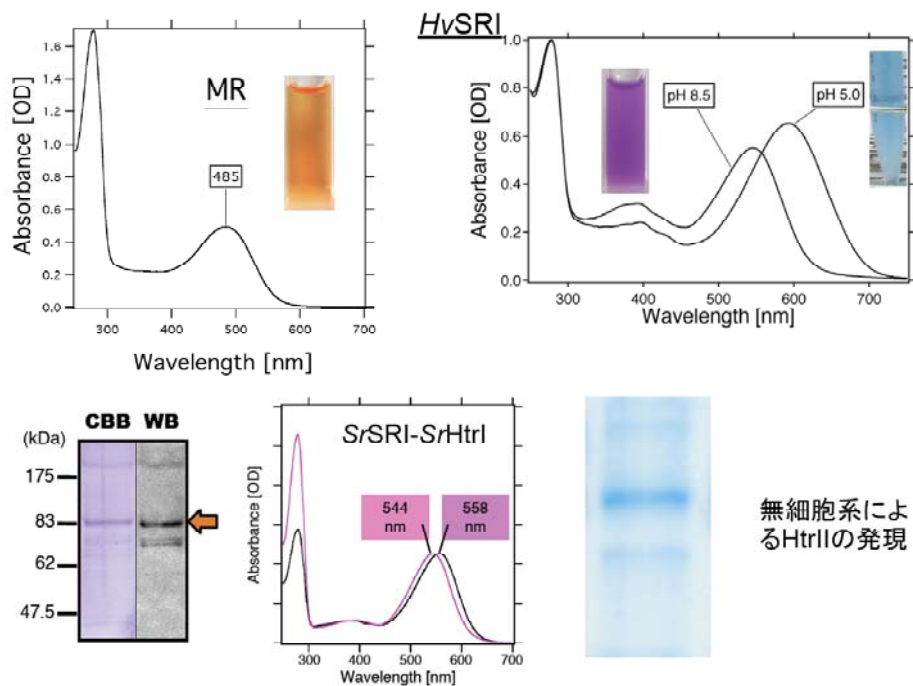


図3: 得られたロドプシン分子と関連分子

(2)ロドプシン分子の性質評価、改変

様々な波長での励起を可能とするため、変異体により、光センサー型ロドプシン[Sudo et al. (2011b) *J. Biol. Chem.*], イオンポンプ型ロドプシン[Sudo et al. in preparation]の波長制御機構を解析し、波長制御の分子メカニズムを明らかにすると共に、490–560nm の人工的波長変換を実現した。また、Cl⁻イオンにより、波長変換が可能であることを発見した[Suzuki et al. (2009) *J. Mol. Biol.*, 朝日新聞、科学新聞など](図4)。さらに、機能発現に至る、構造変化を各種分光法を用いて解析した[Sudo et al. (2009b) *Biochemistry*, Sudo et al. (2009) *Biophysics*, Mizuno, Sudo et al. (2010) *Biochemistry*, Irieda et al. (2011) *Biochemistry*]。

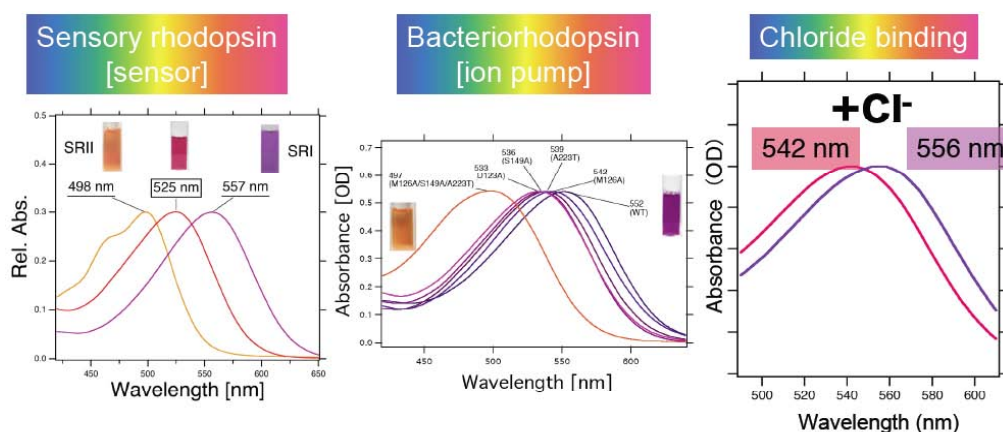


図4: ロドプシン分子の色(吸収波長)の改変

(3)細胞・個体操作

藍藻 (*Anabaena*) 由来のロドプシン、ASR を用いて、光によるタンパク質発現誘導できるシステムを開発した(図5)[須藤ら(2010)特願]。このシステムを大腸菌(単細胞生物)に導入し、細胞の運動性制御が可能なこと[Sudo et al. in preparation]、プロトンポンプ型ロドプシン(Arch)を線虫(多細胞生物)に導入し、個体の運動性制御が可能なることを実証した[Okazaki et al. revised]。

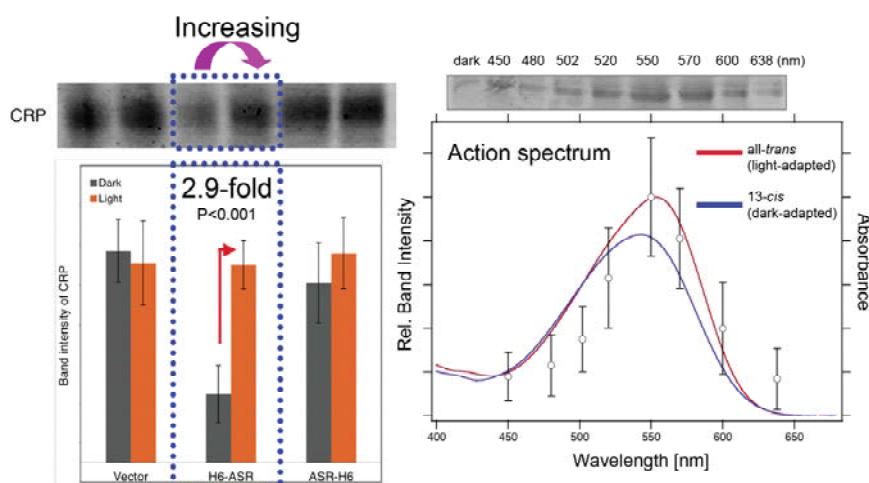


図5: ASR による細胞内タンパク質量のコントロール

3. 今後の展開

本研究では、細胞内の転写活性を光で制御することにより、任意の“タンパク質量”をコントロール出来る系を確立した。また、細胞内外のイオン濃度を光で制御することにより、“神経活動”を制御することに成功した。ロドプシン分子は、この他にも、細胞内キナーゼ活性の ON・OFF やカチオン輸送など、様々な機能を有する。また、本研究で見いだした機能未知ロドプシンや波長バリエーションを利用し、より幅広い生理機能をターゲットとしたロドプシンの利用が期待される。

4. 自己評価

当初掲げた3つの課題、(1)取得、(2)解析、(3)利用について、(1)については、単なる取得にとどまらず、ロドプシン分子の進化過程にも関わる受容体 MR を発見し、(2)については、機能を変えずに、幅広い吸収波長を有する受容体の創成、CFIによる新規波長制御機構、機能発現に重要な構造変化の同定、これまでの常識とは反する異性化反応の発見に成功した。(3)については、生命活動の根幹に関わるタンパク質の量を、光によるコントロール可能な系を確立し、単細胞の行動制御へ応用した。また、イオン輸送型ロドプシン分子を用いて、個体である線虫の制御にも成功した。研究開始時には、同時並行的な研究に多少の不安があったが、むしろ相乗的にそれぞれの研究が進展したと実感している。

5. 研究総括の見解

須藤研究者は、さきがけ研究の提案時まで培っていたロドプシン分子の学理と技術をもとに、新しいロドプシンの探索、光センサー型ロドプシンやイオンポンプ型ロドプシンの波長制御機構の解明、吸収波長変換などの研究を組織的に展開してきた。最終段階では、藍藻由来のロドプシンを用いて光によるタンパク質発現誘導システムを開発し、このシステムを大腸菌に導入することにより細胞の運動性制御が可能なること、プロトンポンプ型ロドプシンを線虫に導入することにより個体の運動性制御が可能なることを実証した。これは、光照射により蛋白質の機能を制御することにより、細胞や個体を操作するという初期の目的を実現したもので、須藤研究者のさきがけ研究に対する姿勢を高く評価している。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. *Sudo, Y., Ihara, K., Kobayashi, S., Suzuki, D., Irieda, H., Kikukawa, T., Kandori, H., & Homma, M. “A microbial rhodopsin with a unique retinal composition shows both sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin-like properties” *J. Biol. Chem.* 286, 5967-5976 (2011a).
2. *Sudo, Y., Yuasa, Y., Shibata, J., Suzuki, D., & Homma, M. “Spectral tuning in sensory rhodopsin I from *Salinibacter ruber*” *J. Biol. Chem.* 286, 11328-11336 (2011b).
3. *Sudo, Y., Okada, A., Suzuki, D., Inoue, K., Irieda, H., Sakai, M., Fujii, M., Furutani, Y., Kandori, H., & Homma, M. “Characterization of a signaling complex composed of sensory rhodopsin I and its cognate transducer protein from the eubacterium *Salinibacter ruber*” *Biochemistry* 48, 10136-10145

(2009a).

4. Suzuki, D., Furutani, Y., Inoue, K., Kikukawa, T., Sakai, M., Fujii, M., Kandori, H., Homma, M. & *Sudo, Y. "Effects of chloride ion binding on the photochemical properties of *Salinibacter* sensory rhodopsin I" *J. Mol. Biol.* 392, 48-62 (2009).【朝日新聞 7/15, 科学新聞 7/24, 中日新聞 7/19, 時事通信 7/14, 共同通信 7/18】
5. Irieda, H., Reissig, L., Kawanabe, A., Homma, M., Kandori, H., & *Sudo, Y. "Structural characteristics around the β -Ionone ring of the retinal chromophore in *Salinibacter* sensory rhodopsin I" *Biochemistry* 50, 4912-4922 (2011).

(2)特許出願

研究期間累積件数:1件

発明者: 須藤 雄気、入枝 泰樹、本間 道夫

発明の名称: アナベナセンサリーロドプシンを利用したタンパク質発現法

出願人: 名古屋大学

出願日: 2010/8/12

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

【主な国際会議の招待講演】

- 1, Sudo, Y. & Homma, M. "Molecular and evolutionary aspects of microbial sensory rhodopsin" 5th Asia and Oceania Conference for Photobiology (AOCP), Sept 31, Nara, Japan (2011).
- 2, Sudo, Y. "Sensory signal transduction from the sensory rhodopsins to their cognate transducer proteins in microbes" (2010) 14th International Conference on Retinal Proteins, Aug 3, Santa cruz, USA (2010).

【主な国内会議の招待講演】

- 1, 須藤雄気, 本間道夫(発表兼シンポジウムオーガナイザー) "What should we learn from sensory rhodopsins? : Signal transfer mechanism and its application for protein expression" The 49th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan「Photobiophysics promoted by young scientists」, 姫路, 9, 17 (2011).
- 2, 須藤雄気 "7回膜貫通型色素結合タンパク質(ロドプシン)の調製法"第11回・日本蛋白質科学会年会 蛋白質科学会アーカイブワークショップ, 大阪, 6, 9 (2011).
- 3, 須藤雄気、本間道夫 "機能性・制御性膜タンパク質(微生物型ロドプシン)による新しい解析ツールの創成に向けて" 日本薬学会第 131 年会シンポジウム「生体反応・細胞挙動のセンシング-光を使って何ができるのか?-」, 静岡, 3, 29 (2011).
- 4, 須藤雄気 "機能性・制御性膜タンパク質(微生物型ロドプシン)による新しい解析ツールの創成に向けて" 生理研研究会「光操作研究会」, 岡崎, 9, 9 (2010).
- 5, 須藤雄気 (発表兼研究会オーガナイザー) "微生物の走光性:センサリーロドプシンの機能理解から何がわかるか、何をもたらすか" 分子研研究会「拡がるロドプシンの仲間から」何がわかるか"何をもたらすか", 岡崎, 3, 23 (2010).

【受賞】

平成21年度光科学技術研究振興財団・研究者表彰

【解説/総説、著書】

- 1, 須藤雄気、本間道夫 "光受容タンパク質による微生物の光センシングの理解とその利用" 薬学雑誌 印刷中
- 2, 須藤雄気、井原邦夫、本間道夫、加茂直樹 "高度好塩性微生物の"目":センサリーロドプシンへの Cl⁻イオン結合の役割" 極限環境微生物学会誌 10, 23-29 (2011).

3, Sudo, Y. “Transport and sensory rhodopsins in microorganisms” CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology, the 3rd edition, 1173-1193 (2011).

4, Suzuki, D., Irieda, H., Homma, M., Kawagishi, I. & *Sudo, Y. “Phototactic and chemotactic signal transduction by transmembrane receptors and transducers in microorganisms” Sensors 10, 4010-4039 (2010).

5, 須藤雄気 “ロドプシン研究はどこに行くのか？” 生物物理 50, 160-161 (2010).

【プレス発表】

平成21年7月14日

「細菌が緑色を感じる仕組み—色素たんぱく質の新しい色決定機構」