

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	沈 宜中
論文題目	<p>Development of Red-Shifted Channelrhodopsin Variants Having Chemically Modified Retinylidene Chromophore (レチニリデン発色団の化学修飾による赤色光吸収チャネルロドプシンの開発)</p>		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>チャネルロドプシンは藻類由来の膜蛋白質で、光刺激によってカチオンを透過させるチャネル蛋白質である。チャネルロドプシンを用いて神経細胞を光でコントロールするオプトジェネティクス (光遺伝学) は、神経科学分野で広く用いられている。しかしながら、生体組織は可視光を吸収、あるいは散乱するため、可視光よりも長波長の光で駆動するチャネルロドプシンの開発が求められてきた。本論文では、チャネルロドプシンの発色団である全トランス型レチナール (レチニリデン発色団) の化学修飾により、チャネルロドプシンの吸収スペクトルを長波長シフトさせることを試みた。さらに、長波長シフトしたチャネルロドプシンが、天然のチャネルロドプシンと同じ光反応サイクルを示すかどうかを検討した。</p> <p>全トランス型レチナール (ATR1) のβイオノン環部分に二重結合を1つ追加したレチナール (ATR2) を発色団とするチャネルロドプシンでは、共役二重結合系が延長されたことにより吸収スペクトルが15~20 nm 長波長シフトすることが知られている。そこで、ATR1、および ATR2 のポリエン部分に二重結合を挿入し、共役二重結合系を延長したレチナールアナログを化学合成した。挿入位置によってメチル基の位置が変化するので、ATR1 と ATR2 のそれぞれの C6 の後、C10 の後、C14 の後に二重結合を挿入したアナログ (6ex、10ex、14ex) を合成した。これらのレチナールアナログの吸収スペクトルをエタノール中で測定したところ、ATR2、6ex-ATR1、10ex-ATR1、14ex-ATR1 の吸収スペクトルは、それぞれ ATR1 より約 20 nm 長波長シフトしていた。また、6ex-ATR2、10ex-ATR2、14ex-ATR2 の吸収スペクトルは、それぞれ ATR2 よりさらに約 15 nm 長波長シフトしていた。つまり溶液中のレチナールアナログの吸収スペクトルは、メチル基の位置に依存せず、共役二重結合系の長さのみに依存することが示された。</p> <p>次に、これらのレチナールアナログを、広く用いられているチャネルロドプシンである C1C2 に組み込んだ。レチナールアナログを組み込んだ C1C2 の吸収スペクトルは、それぞれもとの ATR1 を組み込んだ C1C2 のより長波長シフトしていたが、その長波長シフトの度合いや組み込み効率は、メチル基の位置によって大きく異なることが</p>			

わかった。これは、レチナールアナログのメチル基が、周囲のアミノ酸側鎖と強く相互作用していることを示している。レチナールアナログ間の比較から、C9 のメチル基が再生効率に、C15 のメチル基が長波長シフトに重要であると考えられた。また、ATR2 アナログの方が、ATR1 アナログよりも高い取り込み効率を示したため、 $\beta$ イオノン環部分の相互作用も安定性に重要であると考えられた。さらに、アナログを組み込んだ C1C2 の光反応サイクルを、時間分解分光測定で解析した。その結果、いずれのアナログでもチャンネルが開いた状態と考えられている P390 中間体と類似の中間体が生成することがわかった。

本論文で使用したレチナールアナログの中で、最も効率よく C1C2 の吸収スペクトルを長波長シフトさせたものは 10ex-ATR2 であった。吸収スペクトルをもとの C1C2 のものと比較すると、吸収極大波長は 53 nm、長波長側のすそは 74 nm 長波長シフトしていた。

ATR1 アナログの組み込み効率が一律に低かったので、発色団結合ポケットを形成する芳香族アミノ酸残基をアラニンに置換し、延長したアナログとの立体障害を解消することを試みた。その結果、F265A 変異体で ATR1 アナログの組み込み効率の向上が見られた。また、F265A 変異体でも 10ex-ATR2 が最も長波長シフトし、P390 中間体に対応する中間体の生成が確認できた。

本論文では、アミノ酸レベルで解析するために、十分な安定性を持ち結晶構造が明らかにされているチャンネルロドプシンである C1C2 を用いたが、別の藻類由来のチャンネルロドプシンである ReaChR や ChrimsonR の吸収スペクトルは、C1C2 よりも長波長シフトしていることが知られている。これらのチャンネルロドプシンにアナログを組み込むことで、「生体の窓」を透過する近赤外光で駆動するチャンネルロドプシンを開発できると期待される。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

チャンネルロドプシンを用いたオプトジェネティクスは、細胞操作の画期的な技術として確立されている。現在、さまざまなチャンネルロドプシンが用いられているが、それらはいずれも可視光で駆動する。可視光は生体組織で吸収されたり散乱されたりするので、「生体の窓」と呼ばれる波長域（おおむね700～1,500 nm）の光で駆動するチャンネルロドプシンの開発が望まれていた。しかしながら、全トランス型レチナールを発色団とする限り、その吸収極大波長は 620 nm 程度が限界だと予測されており、それ以上の長波長シフトのためには別のアプローチが必要だと考えられた。

申請者は、レチニリデン発色団に化学修飾を加えることで、吸収スペクトルを長波長シフトすることを試みた。一般に、共役二重結合系を延長すると、吸収スペクトルは長波長シフトする。しかしチャンネルロドプシンの発色団結合ポケットは、全トランス型レチナールに適合する形状であるため、延長したレチナールアナログでは立体障害のために結合できなかつたり、結合したとしても長波長シフトが十分でない可能性が考えられた。また、チャンネルロドプシンは、他の微生物型ロドプシンと同じく光反応サイクルをもち、その過程で一時的にチャンネルを開く。そのため、レチナールアナログを組み込んだチャンネルロドプシンの光反応サイクルが、もとのチャンネルロドプシンと著しく異なっている場合、チャンネル機能を失っている可能性も考えられた。そこで申請者は、レチニリデン発色団のメチル基と蛋白質部分の相互作用が、安定性や機能に重要なことに着目した。レチナールのポリエン鎖の異なった位置に二重結合を挿入し、ポリエン鎖とメチル基の位置関係が異なる 6 種類のレチナールアナログを C1C2 に組み込んだ。本論文は、その組み込み効率や長波長シフトの度合いだけでなく、機能と関連すると考えられる光反応サイクルの詳細な解析を含めている点で、当該分野への寄与は大きいと考えられた。

吸収スペクトルの解析から、レチナールアナログを発色団とする C1C2 では、組み込み効率や吸収極大波長がメチル基の位置に大きく依存することが示された。また、光反応サイクルの中間体生成の時定数もメチル基の位置に依存するが、天然のチャンネルロドプシンと同様の光反応サイクルであると考えられたため、チャンネル機能を保持していると考えられた。光反応サイクルの解析では、時間分解測光データの特異値分解法により成分分解し、速度論的な解析がなされており、十分信頼性が高いものと認められた。

さらに、発色団結合ポケットを形成する芳香族アミノ酸残基に変異を導入することによって発色団結合ポケットを拡張し、延長したレチナールアナログの立体障害を解消することに成功した。この方法を発展させて、発色団結合ポケットの形状を

延長したレチナールアナログに最適化することができれば、内在性のレチナールとの親和性が下がり、生細胞内で効率よく長波長シフトしたチャンネルロドプシンを生成できると期待されるため、今後の展開のために重要な成果である。

以上の結果から申請者は、共役二重結合系を延長したレチナールアナログを用いて長波長シフトしたチャンネルロドプシンを作成できることを示した。また、今回用いたチャンネルロドプシンよりも長波長に吸収スペクトルを持つチャンネルロドプシンをテンプレートとすることで、「生体の窓」を透過する近赤外光で駆動するチャンネルロドプシンを開発できる可能性を示した。これらの知見は、今後のオプトジェネティクス発展に大きく貢献すると考えられた。よって、本論文は博士（理学）学位論文として価値あるものと認める。また、平成30年1月15日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。