

氏名	サヅリ ユウコ 坂尻 由子
本籍（国籍）	石川県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 735 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学
学位論文題目	バイオインフォマティクス的手法による機能強化型新規光受容タンパク質の創出 (Development of functionally enhanced new types of photosensitive proteins by using bioinformatics technology)
学位審査委員	主査 岩手大学教授 富田 浩史 副査 菅野 江里子(岩手 准教授),西野 敦雄(弘前 准教授),木村 直子(山形 教授)

論文の内容の要旨

網膜色素変性症は国内の中途失明原因の第 3 位で、国内での患者数は 5 万人、世界では 150 万人に上る。また、網膜色素変性と同様に視細胞変性により失明を来す加齢黄斑変性症は、欧米では中途失明原因の第 1 位に位置し、その患者数は日本国内で 70 万人、世界で 1 億人以上と推定されている。視細胞変性の進行を抑制する薬剤や iPS 細胞を利用して、進行を抑制する治療法などが研究されているものの、不幸にも失明に至った場合の治療法、「視覚再生法」は現時点では皆無である。先行研究において、緑藻類ボルボックスの Na⁺チャンネルであるチャンネルロドプシン 1 の改変 (mVChR1) により哺乳類細胞で光受容陽イオンチャンネルとして機能する光受容タンパク質を開発し、これを失明に至った網膜の神経細胞に導入することによって視機能を回復 (ON 応答の回復) させることに成功している。一方、古細菌型ロドプシンの一つであるハロロドプシン (HR) は、黄色光の受容により、細胞内にクロライドイオンを取り込む、光駆動型クロライドイオンポンプとして機能し、細胞の過分極 (OFF 応答) を引き起こす。したがって、ハロロドプシン (HR) と mVChR1 を網膜細胞に発現させることで、生来の視覚システムに近い高度な視機能を創出することが可能となる。しかしながら、野生型 HR は光応答性が弱く、強力な光が必要であるため、視覚再生としては実用的ではない。本論文では、HR の光反応性を増強することを目的とし、イオンポンプ機構に重要なアミノ酸残基をバイオインフォマティクスにより特定し、アミノ酸残基を組換えることで、どのような機能変化が起こるかを調べた。野生型 HR のクロライドイオン輸送の分子メカニズムとしてイオン透過時にクロライドイオンが野生型 HR のスレオニン 126 番 (T126) のヒドロキシ基とシッフ塩基 (レチナールトリジン残基との結合部位) のプロトンに結合することが結晶構造解析から明らかにされているが、クロライドイオンが細胞膜外側から T126 への移動経路は未解明である。そこで HR 内部のクロライドイオンの移動に関わるアミノ酸残基を特定するために、タンパク質内部のイオン透過経路探索ソフトウェアの CAVER を使用し、野生型 HR のクロライドイオン透過経路上に存在するボトルネック (経路が細くなりイオンの移動が妨げられる部分) の探索を

行った。その結果、セリン 81 番 (S81) とロイシン 95 番 (L95) により構成される 1Å以下 (0.96Å) のボトルネックを発見した。さらに S81 を側鎖の短いアラニンに変異させたところ、ボトルネックが消失することが明らかとなった。

このボトルネック上で発見した野生型 HR S81 のクロライドイオンの移動における役割を調べるために、野生型 HR と S81A 変異体の分子動力学シミュレーションをタンパク質および脂質部分を CVFF 力場、クロライドイオン、レチナール部分に対しては ESFF 力場を用いて実行し、タンパク質内部におけるクロライドイオンの動的情報を得た。その結果、シミュレーション時間内において野生型 HR は水素結合によってクロライドイオンと T126 ヒドロキシ基との結合を維持したままであったが、HR S81A 変異体はクロライドイオンを保持できないことが判明した。これは野生型 HR の S81 のヒドロキシ基が T126 のヒドロキシ基と水素結合を形成しており、Thr126 の側鎖の二面角(N-C α -C β -O)を固定しているためと考えられた。この固定により T126 のヒドロキシ基はシッフ塩基近傍に存在することが可能になることが分かった。野生型 HR の S81 がクロライドイオンの移動に関わっていることを調べるために、ヒト胎児腎細胞 (HEK293 細胞) に野生型または変異型の HR 遺伝子を含むプラスミドベクターをエレクトロポレーション法により導入し、野生型または変異型 HR を恒常的に発現する細胞株を樹立した。野生型または変異型 HR の機能評価は、光照射に伴うイオン透過量をパッチクランプ法により測定した。550nm (14 μ W/mm²) で 20 秒ごとに 1 秒間露光し、細胞の光刺激に対する応答を調べた結果、野生型 HR 発現 HEK293 細胞は光刺激に伴い過分極応答したのに対し、S81A 変異体は応答を示さず、正常にクロライドイオンを輸送できないことが確認された。以上のように、培養細胞を用いた研究において、イオン透過経路探索ソフトウェアによる透過経路予測、分子動力学によるクロライドイオンの動的シミュレーション結果を支持する結果が得られた。

本研究により HR のクロライドイオンポンプの機能に大きく関わる S81 残基を発見することができ、

バイオインフォマティクス技術を用いて、S81 の置換だけでなく、種々のアミノ酸残基に組み替えシミュレーションを行うことにより、機能性の高い HR を創出することが可能になると考えられる。

論文審査の結果の要旨

光受容に伴い、細胞内に陽イオンを透過させる機能を持つ古細菌型ロドプシンの発見以来、同様な機能を有するロドプシンファミリータンパク質が見出されている。これらの古細菌型ロドプシンは単一のタンパク質で光受容とイオンチャネルの機能を有することから、神経細胞に発現させることで、光照射で神経細胞の興奮を人為的に制御できる細胞となる。このような光で神経細胞の興奮を制御する技術は「オプトジェネティクス」と呼ばれ、神経科学分野で実験ツールとして広く用いられるようになってきている。一方、光受容に伴い細胞内にクロライドイオンを透過させるタンパク質も発見されており、これらは神経細胞の興奮を抑制させるためのツールとして用いられている。その代表的な光受容クロライドイオンポンプとしてハロロドプシン (HR) がある。しかしながら、ハロロドプシンは光感受性が弱く機能させるためには強力

な光照射が必要である。本論文は、HR の光応答能の強化のためにイオンポンプ機構に重要なアミノ酸残基をバイオインフォマティクスにより特定することを目的とし、遺伝子工学によりアミノ酸残基を組換えることで、実際にどのようにイオンポンプの機能変化が起きるのかを解析したものである。

タンパク質内部のイオン透過経路探索ソフトウェアの CAVER を用い、HR 内部のクロライドイオンの移動に関わるアミノ酸残基を予測した結果、セリン 81 番 (S81) とロイシン 95 番 (L95) により構成される 1Å 以下 (0.96Å) のボトルネックを発見し、この S81 を側鎖の短いアラニンに変異させることによって、ボトルネックが解消されることが分かった。また、HR の野生型と S81A 変異体の分子動力学シミュレーションをタンパク質および脂質部分を CVFF 力場、クロライドイオン、レチナル部分に対しては ESFF 力場を用いて実行し、タンパク質内部におけるクロライドイオンの動的情報を調べた結果、シミュレーション時間内において、HR S81A 変異型はクロライドイオンを保持できないことが判明した。実際にこの S81 がクロライドイオンの移動に関わっているか確認するために、変異型 HR S81A が発現する安定細胞株を樹立し、パッチクランプ法により細胞レベルでのイオン透過量を測定し、S81A 変異型は正常にクロライドイオンを透過できないこと示した。以上のように、バイオインフォマティクス手法および細胞生理学実験によりイオン輸送に重要なアミノ酸を明らかにし、その成果は、国際的な学術誌に発表済みである。

本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

Natronomonas pharaonis halorhodopsin ser81 plays a role in maintaining chloride ions near the Schiff base. Biochemical and biophysical research communications : Vol.503(4)2326-2332