

博士論文

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

岩手大学大学院連合農学研究科

生物資源科学専攻

坂尻 由子

目次

1. 緒論	3
1.1. ロドプシン	4
1.2. チャネルロドプシン	8
1.3. ハロロドプシン	11
1.4. ハロロドプシンの塩化物イオン輸送メカニズム	15
1.5. オプトジェネティクスによる視覚再生に関する研究	20
1.6. mVChR1 のチャネルロドプシンによる遺伝子治療の開発	21
1.7. ハロロドプシンを用いた高機能視覚再生と本研究の意義	23
2. 材料と方法	24
2.1. モデル構造の構築	24
2.2. エネルギー最小化と MD シミュレーション	26
2.3. HR 野生型および S81A 変異体発現細胞の樹立	26
2.4. パッチクランプ記録	27
3. 結果と考察	28
3.1. HR における塩化物イオン透過経路の解析	28
3.2. MD シミュレーションにおける野生型および変異型 NpHR の構造特性	32
3.3. HR 野生型および S81A 変異体に対するパッチクランプ記録	36
4. まとめ	38
5. 参考文献	39
謝辞	45

1. 緒論

網膜色素変性症は、遺伝子変異による網膜変性疾患である。この病気に罹患した患者は、夜盲を自覚し視野狭窄が進行し、長い年月を経て社会的失明に至ることが多い。国内の中途失明原因の第3位で、国内での患者数は約5万人、世界では約150万人に上る[1]。また、網膜色素変性と同様に視細胞変性により失明を来た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[2]、世界で1億人以上と推定されている[3]。原因遺伝子の多くは視サイクルに関与する遺伝子であるが、視細胞の変性を引き起こす詳細なメカニズムは多種多様であり、いまだ、視細胞の変性を効果的に抑制する治療薬の開発に至っていない。視細胞変性の進行を抑制する薬剤やiPS細胞を利用した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。一方、網膜色素変性症により失明に至った場合でも、視細胞以外の網膜神経細胞は比較的よく保たれていることが知られている[4]。この残存する網膜神経細胞に光情報を伝達することができれば、視覚機能を再建できる可能性がある。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、失明に至った網膜の神経細胞に導入し、視機能の回復(ON応答の回復)に成功している[5]。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塩化物イオンを取り込む光駆動型塩化物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[6]。したがって、ハロロドプシン(HR)とmVChR1を組み合わせ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、強力な光が必要となるため、視覚再生法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。本知見により、特定されたイオンポンプにとって重要な残基の発見は、種々のアミノ酸に組み換えることにより機能性の高い HR を創出する一助になると考えられる。

1.1. ロドプシン

光は生命にとって極めて重要なエネルギー源であり情報源である。生体内で光をエネルギーや情報に変換するのはタンパク質分子である。一般にタンパク質は可視部を吸収する化合物を持たず光を受容できないが、光受容タンパク質は可視部に吸収を有する化合物を持つ。光を吸収すると多くはタンパク質場に特異な光化学反応（異性化、電子移動など）が起こり、その結果として機能が発現する。光受容タンパク質の中でレチナール分子を発色団とするタンパク質群が「ロドプシン」である。

ロドプシンタンパク質は、レチナールタンパク質と呼ばれ、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て持つ 7 回膜貫通型光受容タンパク質の総称である。7 番目のヘリックスにあるリジン残基とレチナールがシッフ塩基を形成している。レチナールが光を受容しその構造が変化すると、ロドプシンの構造の変化が惹起され、レチナールとオプシンの結合が切れる（図 1）。ロドプシンの構造が光で変化するのは可視光線がレチナールの電子状態を変化させるからである。この変化が視細胞の一種の桿体細胞のロドプシンで起こる

と、刺激が視神経を通過して脳に伝わり視覚が生じる。なお、オプシンと結合が切れたトランス型のレチナールは視細胞から網膜色素上皮細胞に移行し、酵素的にシス型レチナールに変換され、視細胞で再び、オプシンと結合する。

真正細菌や古細菌などの膜タンパク質に存在する微生物型ロドプシンは、光センサーのみならずイオン輸送により、光エネルギー変換の機能を持つようになった[7]。イオン輸送型のロドプシンは大きくチャネル型とポンプ型とに分類することができる(図2)。チャネル型ロドプシンは2002年にはじめて発見された[6]。チャネル型ロドプシンについての詳細は本論文 [1.2](#) で記述する。一方、ポンプ型ロドプシンの研究の歴史は非常に古く、1971年には、すでに初の微生物型ロドプシンにして初のプロトンポンプ型ロドプシンであるバクテリオロドプシンが発見されている[8]。1977年に初の塩化物イオンポンプ型ロドプシンであるハロロドプシンが発見されて以降、さまざまなポンプ型ロドプシンが発見された[9]。ハロロドプシンについては本論文 [1.3](#) で記述する。

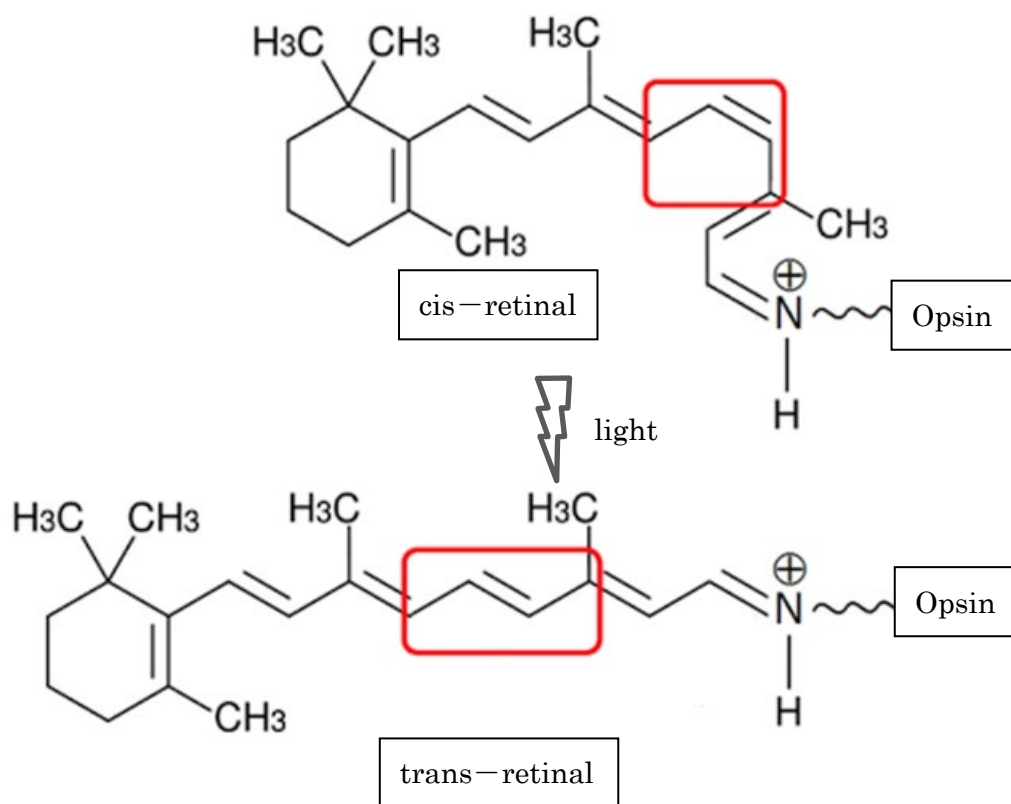


図 1. 桿体細胞における光によるレチナールの構造変化

オプシンと結合しているレチナールは図の上の構造をしているが、光を受けると図の下構造になる。レチナールの構造が変化すると、レチナールとオプシンの結合が切れる。オプシンと結合が切れたトランス型のレチナールは視細胞から網膜色素上皮細胞に移行し、酵素的にシス型レチナールに変換され、視細胞で再びオプシンと結合する。

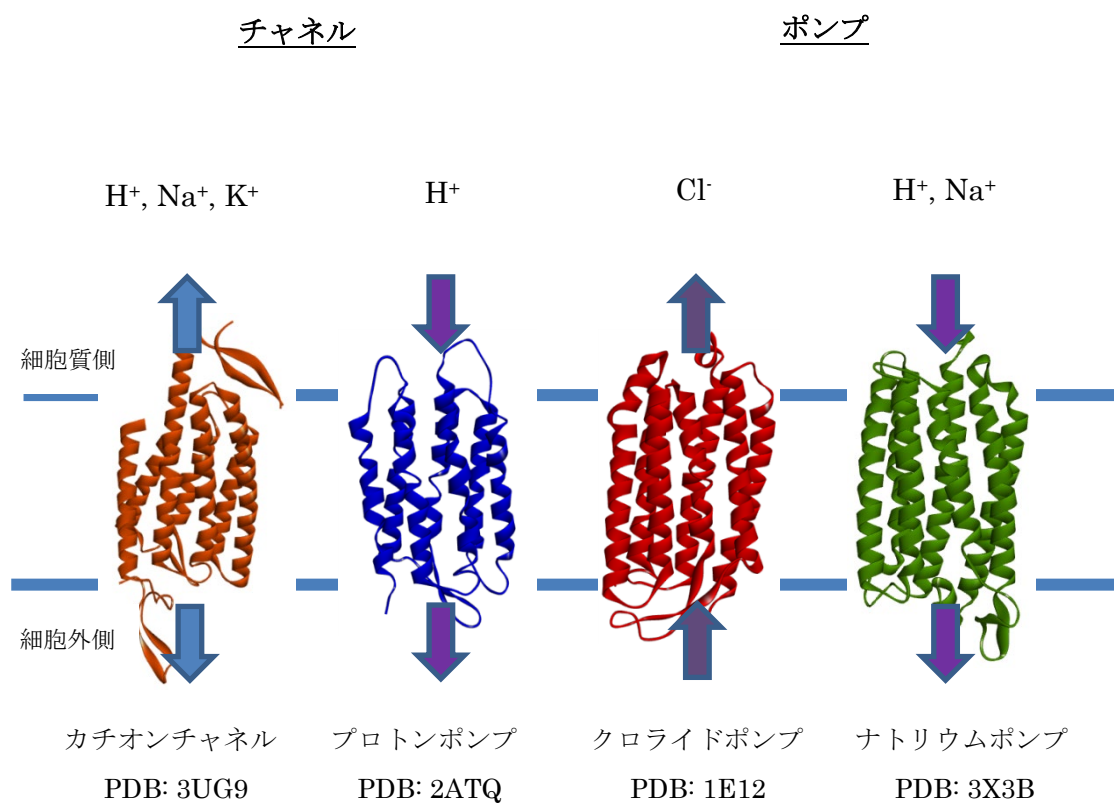


図 2. チャンネル型とポンプ型の微生物型ロドプシタンパク質の構造と機能
チャンネル型は 1.2. で記述する。ポンプ型のクロライドポンプについては 1.3. で記述する。

1.2. チャネルロドプシン

1.1.の微生物型ロドプシン類の中の、チャネル型ロドプシン（チャネルロドプシン）は、特定の波長の光を受容することで濃度勾配にしたがってイオンを受動的に輸送するチャネルとして機能することが知られている。チャネルロドプシンを発現させた神経細胞では、外部から光を照射することでその神経活動の活性、あるいは抑制を引き起こすことができる。この技術は光遺伝学「オプトジェネティクス」と呼ばれており、チャネルロドプシンはその主要なツールとして利用されている。

緑藻類の一種クラミドモナス（*Chlamydomonas reinhardtii*）において同定された二つの光感受性陽イオンチャネルはチャネルロドプシン1および2(ChR1, ChR2)と呼ばれる。ChR1 および ChR2 はオプトジェネティクスの強力なツールとして、その発見以来注目を集めている。このチャネルロドプシンは、2002年、2003年にドイツ、アメリカ、日本の3グループが独立に、緑藻クラミドモナスのcDNAを用いた研究により古細菌型ロドプシンと結論づけ報告している[10, 11, 12]。ドイツ[11]のグループはこれを細胞に発現させて光照射すると細胞内外に H^+ が透過することを示した。ChR1と2は、2002年にHegemannらによって発見された光駆動性陽イオンチャネルである[10]。

これらのチャネルロドプシンは、レチナールが青色の光を吸収すると、 Na^+ 、 K^+ などの陽イオンを透過させる。レチナールの構造はall-トランス型から13-シス型に変化し（図3）[6]、その際シッフ塩基の脱プロトン化、再プロトン化が起こる。そのあとタンパク質の構造変化が引き起こされる。このレチナールの構造変化は古細菌型ロドプシンに共通する。その後、ChR2は不活性化状態に移行し、レチナールは再びall-トランス型に変換し静止状態に戻る。ChR2は、

古細菌型ロドプシンの1種で、古細菌型ロドプシンの光学特性について、レチナールの光反応サイクルに関わる環境は、それを取り囲むアミノ酸電荷によって決定される。そのため、ChR2の改変には、点変異をランダムに導入するのではなく、レチナールを取り囲むアミノ酸残基の電荷に狙いを付けた点変異を行う[13, 14]。

ChR2を神経細胞の細胞膜に発現させ光を照射すれば、陽イオンが細胞内に流入し、脱分極を引き起こすため、神経の活動を誘引することができる[15]。この方法においては、ChR2が発現している細胞のみを刺激することができるため、薬理刺激や電気刺激と比較して空間分解能が高いという優位性がある。

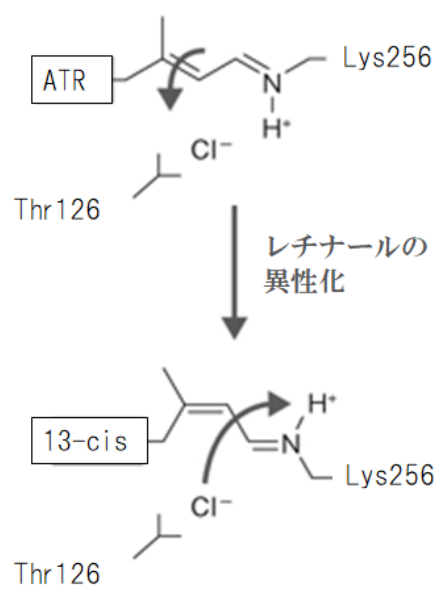


図 3. 微生物型ロドプシンにおけるレチナールの光受容による構造変化

1.3. ハロロドプシン

1.1.の微生物型ロドプシン類のポンプ型タンパク質の一種であるハロロドプシン(HR)は、塩湖などの高塩濃度の環境下で生息する細菌から見つかったイオン輸送タンパク質で、光のエネルギーを利用して塩化物イオンを輸送する光駆動塩化物イオンポンプである。

レチナール発色団の光異性化 がトリガーとなり、さまざまな中間体を經由する光サイクル反応[16]の間に、塩化物イオンを細胞外から細胞内へポンプする。レチナールは、タンパク質中に含まれるリジン残基とプロトン化シッフ塩基を介して結合している。HR では、シッフ塩基近傍にアニオン結合サイト (BS-I) がある (図4)。この結合サイトには、塩化物イオンの他にもさまざまなアニオンが結合する。レチナール発色団の電子状態は 結合するアニオンの影響を受け、その結果、吸収スペクトルの吸収極大波長や C=C 伸縮振動の振動数が変化する [17]。

ハロロドプシンとバクテリオロドプシンは、遺伝子重複によって生じた類似タンパク質であり [18]、その分子系統樹解析から、共通祖先タンパク質から早い変異の蓄積によってハロロドプシンが生じたことが推定されている。そのため、ハロロドプシンはバクテリオロドプシンと構造上の共通点や類似点が多く、イオン輸送機構も共通である可能性が示唆されている (イオン輸送機構の詳細については本論文 1.4. で記述する)。実際に、バクテリオロドプシンの 85 番目のアスパラギン酸(Asp85)をハロロドプシンと同様にスレオニンに置換した変異バクテリオロドプシンは、塩化物イオンを輸送する [19]。塩化物イオンを輸送するハロロドプシンがアジドイオン存在下でプロトン輸送する。アジドイオンがレチナールシッフ塩基のプロトンドナーやアクセプターになることは、96 番目のアスパラギン酸(Asp96)を置換したバクテリオロドプシン変異体などを用

いた研究で報告されている[19]。ハロロドプシンでも、アジドイオンがチャンネル内でプロトン輸送を担っていると考えられる。一方、ハロロドプシンのいくつかのアミノ酸をバクテリオロドプシン型に変化させてもプロトンポンプにはならない[19]。バクテリオロドプシンは、可塑性の高い祖先型の性質を保持したタンパク質であるのに対して、ハロロドプシンは機能が特化したタンパク質へと進化した結果、可塑性が低くなったことが予想されている。

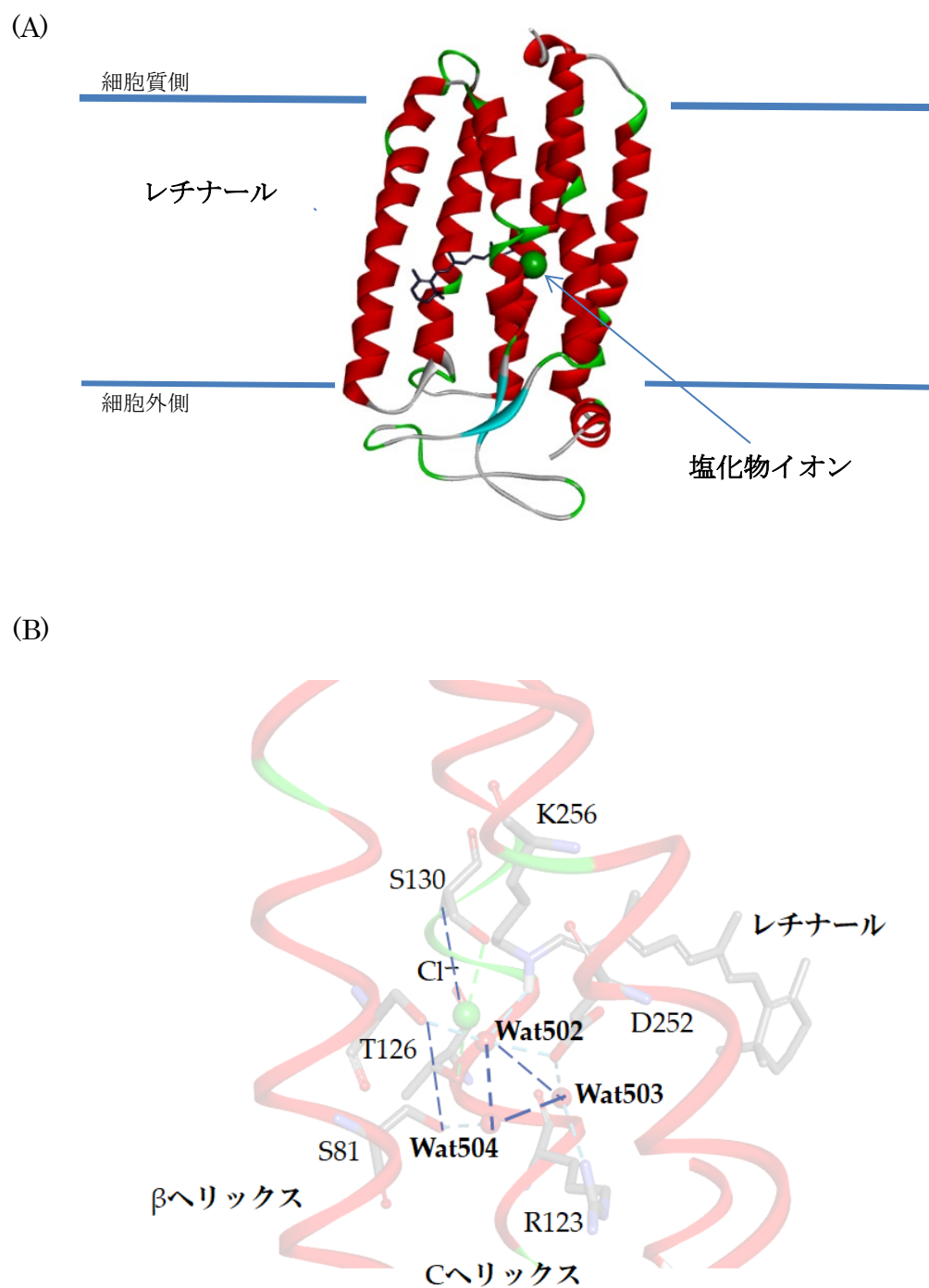


図4. 光駆動塩化物イオンポンプであるハロロドプシンの X 線結晶構造. (A) ハロロドプシンは、微生物型ロドプシンの一種であり、光駆動型塩化物イオンポンプとしてはたらく。図の構造は HR (PDB ID: 3A7K) [20] の 3 次構造を主要なアミノ酸残基とともに示した。(B) レチナールシッフ塩基近傍の活性

中心構造では、光を受け取る部位であるレチナール分子、塩化物イオン、水分子を示している。

1.4. ハロロドプシンの塩化物イオン輸送メカニズム

古細菌型イオンポンプの分子メカニズムを説明する仮説として IST モデルが提唱されている。このモデルは、光照射により引き起こされるイベントを I,S,T (レチナール異性(Isomerization)、タンパク質の構造変化(Switch)、イオンの輸送(Transport)) の順序で 3 つの独立した変化過程としてとらえ、イオン輸送の方法を説明するものである[21,22,23]。しかしながら、最も重要な Switch の分子実体が欠けており、この仮説だけでは十分理解できない。以下に、分光学や構造のデータに基づき、現在推定されている分子機構を述べる。

Natronomonas pharaonis (NpHR) または *Halobacterium salinarium* (sHR) 由来の HR を用いた HR 媒介塩化物イオン輸送に関する多くの研究が存在する。これら二つの HR は 7 つの膜貫通ヘリックス構造 (ヘリックス A~G) を有し、シッフ塩基を介して G ヘリックスの中心に位置する Lys256 に共有結合したレチナールを有する (本論文で使用されるすべてのアミノ酸および水分子の数は、NpHR PDB ID : 3A7K [20]のものに対応する)。イオン輸送に関わる塩化物イオンの結合部位は、1.3.で記述した細胞外側のシッフ塩基近傍の部位 (BS-I) 以外に、細胞質側にもう一箇所を存在する必要がある[23]。sHR、NpHR の構造データで、ともに細胞質側に唯一の水分子(sHR では Wat506, NpHR では Wat501) の存在が報告されている[23]。この水分子と水素結合を形成する Thr218 (sHR の Thr203)を Val に置換することで塩化物イオン活性は低下し、光化学反応サイクルも遅くなることから[24]、T218 近傍付近に細胞質側の塩化物イオン結合部位 (BS-II) が仮定されている。

Chizhov と Engelhard (2001)が提唱した光サイクルモデルは、以下の中間状態を経由する、HR→K→L1→L2→N→O→HR '[25,26] (図 5)。ポンプを通る塩化物イオンの動きは、4 つの異なるステップで起こり、最後の 2 つの状態は塩化

物イオンの放出[25]および取り込み[27]にそれぞれ関与すると考えられている。All-トランス状態である休止状態 (HR) および最初の 2 つの 13 シス状態 (K および L1) では、塩化物イオンは、Thr126、Ser130 およびプロトン化シッフ塩基近傍の座標位置である BS-I に存在している[16,28,29]。シッフ塩基の近傍には Wat502 以外に 2 つの水分子 (Wat503, Wat504) が存在している。Wat503 は Asp252 と Arg123 の側鎖の間に存在し、Wat504 は Ser81 と相互作用して、水素結合のネットワークが Thr90 まで伸びている。Arg123 の側鎖から Glu234 の側鎖までの間には、水分子 6 個 (Wat505~510) を含む大きな空洞が存在し、水素結合ネットワークを形成している。細胞質側においては、塩化物イオンは L2 状態でヘリックス F [30]上の BS-II の Lys215 および Thr218 に結合する。sHR[25]では O 状態が検出されないため、N 中間体および O 中間体の構造情報は完全には明らかにされていない。NpHR ではアジドイオン(N₃⁻)を含む O 型結晶構造が得られており[23]、その構造からアジドイオンの移動機構 (図 6) と同様に、細胞質への塩化物イオンの放出にヘリックス F の大きな構造変化を伴うことが推測されている[31]。

NpHR [20]の休止状態の結晶構造において、レチナールは、Trp127、Tyr180、Phe187、Trp222、Tyr225、および Trp229 からなるアミノ酸群によって固定される。シッフ塩基はプロトン化され、シッフ塩基のプロトンは休止状態で細胞外に面する。塩化物イオンは、シッフ塩基近傍の空洞に位置する BS-I に固定される。そのあとレチナールの異性化において、基底状態で塩化物イオンと水素結合を作っていた Thr126 の側鎖は回転し、OH 基は細胞外側を向き、シッフ塩基側には Thr126 の CH₃ 基が突き出すため、シッフ塩基を含む BS-I がきわめて疎水的な環境に変化し、塩化物イオンが BS-I に存在できない。そのあと、塩化物イオンは細胞質側の BS-II の Thr216 と水分子 (Wat 502) 近傍に移動し水素

結合によって結合する。ヘリックス F が大きく移動した際に、大きな空隙が生じることにより細胞質側からプロトンが入ってくる事が報告されており[31]、細胞質側からプロトンが取り込まれ、プロトンは BS-II にある塩化物イオンと HCl を形成し、HCl の状態で細胞質に移動し放出される。ヘリックス F の元の位置への復元は、O から HR' への減衰の間に生じる。次いで、塩化物イオンが再び取り込まれ BS-I に結合し、再配置サイクルを再開することができる[30]。

上記のように、塩化物イオンの細胞外側の BS-I から細胞質側の BS-II への移動に関与する複雑な水素結合のネットワークが存在する[32]。HR の塩化物イオン輸送能を強化するためには、これらの水素結合のネットワークを明らかにする必要がある。特に本論文では BS-I のシッフ塩基近傍の空洞に注目した。

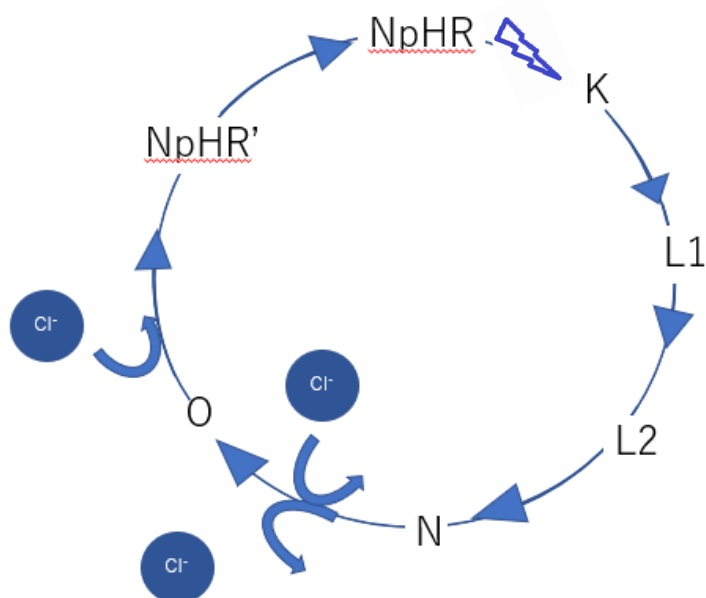


図5. NpHRの光サイクルモデル



シッフ塩基 (SB) の細胞外 (EC) 方向から細胞質 (CP) 方向へ $\text{HR} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{L1} \rightarrow \text{L2} \rightarrow \text{N} \rightarrow \text{O} \rightarrow \text{HR}$ に反応が進む。暗状態の NpHR は、PBS の対イオンとしてこの位置に Cl^- を結合しており、この Cl^- が光反応サイクルの間に細胞質側へ放出されると考えられる [33, 34, 35, 36]。

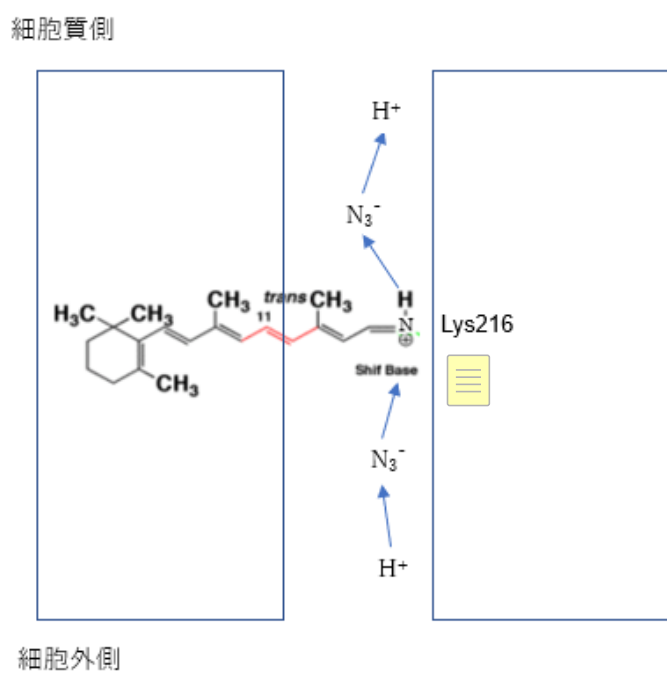


図 6. ハロロドプシンのプロトン輸送メカニズム[31]

1.5. オプトジェネティクスによる視覚再生に関する研究

近年、本文 [1.3.](#) のチャンネルロドプシンや本文 [1.4.](#) のハロロドプシンなどのロドプシンは、光の照射により任意のニューロンを興奮あるいは抑制させることのできる理想的なツールとして、特に神経科学の分野において非常に注目されている。

視細胞の光受容は、オプシントタンパク質に結合するレチナール（ビタミン A の類縁体）の異性化に始まり、オプシンの構造変化、G タンパク質の活性化などの連鎖反応を経て、視細胞の過分極により完了する。このような複雑な連鎖反応には、視細胞の特異的なタンパク質が関与している。2002 年に Zemelmann らは、視細胞の光受容に関わるタンパク質のうち、3 種の遺伝子を 1 つの神経細胞に導入し、光感受性を与えることに成功している [37]。しかしながら、この方法で得られた光感受性細胞は、光応答性が低く、3 個の遺伝子を 1 つの細胞に導入する必要があることから、失明者の視覚再生法として応用することは不可能である。このような中、2003 年、Negel らによって緑藻類クラミドモナスの ChR2 を神経細胞に発現させることで、光照射で神経細胞の脱分極を誘導し、光駆動性神経細胞の作製を可能にした。

網膜色素変性症では、視細胞の変性後も網膜内層は比較的よく保たれている。Santos らは、視細胞の変性を程度別に分け、内顆粒層や神経節細胞層の厚みを比較し、視細胞の変性の程度に関わらず、内顆粒層の厚みは変化しないこと、神経節細胞層は重度の患者でわずかに減少がみられるものの残存していることを報告している (図 7) [38]。このような背景から、唯一の光受容細胞である視細胞が変性し失明に至ったとしても何らかの方法で残存する網膜神経細胞に光情報を伝達することができれば、視覚機能を再建できる可能性がある。ChR2 遺伝子をこれらの残存する網膜細胞に導入することによって、網膜細胞に光感

受性を与えることで光受容を残存する網膜細胞に代用させることができる。現在、上記のような失明患者に対する視覚再生法として、様々なアプローチが試みられている。この詳細については本文 [1.6.](#) および [1.7.](#) に記述する。

1.6. mVChR1 のチャンネルロドプシンによる遺伝子治療の開発

2006年に緑藻類ボルボックスから VChR1 が発見された。これは、ChR2 と異なり、黄色の光吸収によって陽イオンを透過させる。富田らの先行研究では、ボルボックス由来の光活性化陽イオンチャンネル遺伝子を改変し、ChR2 より幅広い波長域を持つチャンネルロドプシン遺伝子 (mVChR1) の開発に成功している [5]。mVChR1 を RCS ラットに導入し、視覚誘発電位を測定することによって、波長特性を調べた結果、mVChR1 遺伝子を導入した盲目ラットは、450nm から 640nm の光に反応することが判明している。また、波長域が拡大することによって、白色光への応答性が增大している。このように mVChR1 は、ChR2 に比べ感受波長域が広く、ヒトの視覚回復に有用な遺伝子であると考えられる。

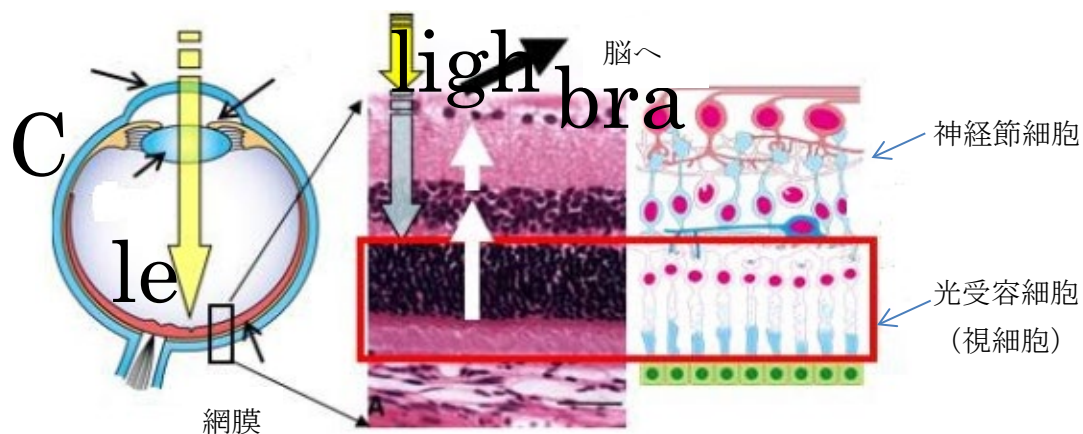


図7. 網膜の光受容機構.

網膜には、様々な役割の異なる神経細胞群が存在し、網膜に入射した光は神経節細胞、双極細胞を通り、光受容細胞（視細胞）で受け取られ、視細胞で光エネルギーは神経伝達物質へと形を変え、双極細胞、神経節細胞を経て脳へ送られる。何らかの原因で、視細胞が変形し、光が受け取られなくなる。視細胞の障害に起因する失明では、その他の網膜の神経細胞は残存していることが知られている。

1.7. ハロロドプシンを用いた高機能視覚再生と本研究の意義

ハロロドプシン (HR) は、オプトジェネティクスの応用においてニューロンの膜電位を制御するために使用されている[39]。視覚再生研究の分野では、光感受性カチオン選択性イオンチャンネル ChR2 が、AAV 媒介遺伝子治療による視力回復に使用されている[4,40]。視覚再生するための光遺伝学的遺伝子治療は臨床試験段階にとどまっているが、視覚系では、センターサラウンドアンタゴニズム（網膜における光受容細胞の受容野の中心領域と包囲領域との間の拮抗的相互作用のことで、視覚野内のエッジ検出とコントラスト強調に関わる）は視覚情報処理の基本的な側面であることはよく知られている[41]。Greenberg らは ChR2 と eNpHR の 2 つのオプトジェネティック遺伝子を用いてセンターサラウンドシステムを実証した[42]。同様に、HR の光感受性塩化物イオンポンプは、神経回路調節において重要な役割を有する。しかしながら、HR は光応答性が弱く、強力な光が必要となるため、視覚再生としては実用的ではない。HR の光応答能を向上させるためには、野生型 HR の塩化物イオン輸送の分子メカニズムを明らかにする必要がある。分子メカニズムとして、イオン透過時に塩化物イオンが野生型 HR のスレオニン 126 番 (Thr126) のヒドロキシ基とシッフ塩基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（本文 1.3. に記述）、塩化物イオンの細胞膜外側から Thr126 への移動経路はまだ解明されていない。

本研究では、HR 内部の塩化物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 (<https://caver.cz/>) を使用し、野生型 HR の塩化物イオン透過経路上に存在するボトルネックの探索を行った。その結果、セリン 81 番 (Ser81) とロイシン 95 番 (Leu95) がボトルネックを構成することを発見した。さらに、ハロロド

プシンにおける塩化物イオン輸送を明らかにするために、Thr126 付近の Ser81 の役割の解明に焦点を当てて解析を行った。野生型 HR と、今回見出した S81 を Ala に置換した変異型 HR(S81A 変異型 HR)を用いた全原子分子動力学(MD)シミュレーションを用いて塩化物イオン透過経路の形状の大きな解析を試み、タンパク質 と塩化物イオンの結合状態を解析した。

2. 材料と方法

2.1. モデル構造の構築

NpHR (以降 HR) のタンパク質の初期構造座標は、ホモロジーモデリングサーバー swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/>) を用いて、*Natronomonas pharaonis* (NpHR) に由来する野生型 HR の基底状態の X線結晶構造解析データ (PDB : 3A7K [20]および GENBANK : EF474018 [39]) に基づいて決定した。モデル構造は、タンパク質三量体、共有結合レチナール発色団、3つのカロチノイド脂質分子 (バクテリオルベリン)、144の水分子、タンパク質単量体あたり 2つの塩化物イオン、およびホスファチジルコリン (POPC) 分子オレオイル脂質断片を含む。また、電荷を中性化するためにナトリウムイオンを添加した。HR 内部に存在するイオン透過経路はイオン透過経路ソフトウェア CAVER (<https://caver.cz/>) (図 8)を用いて探索を行った。

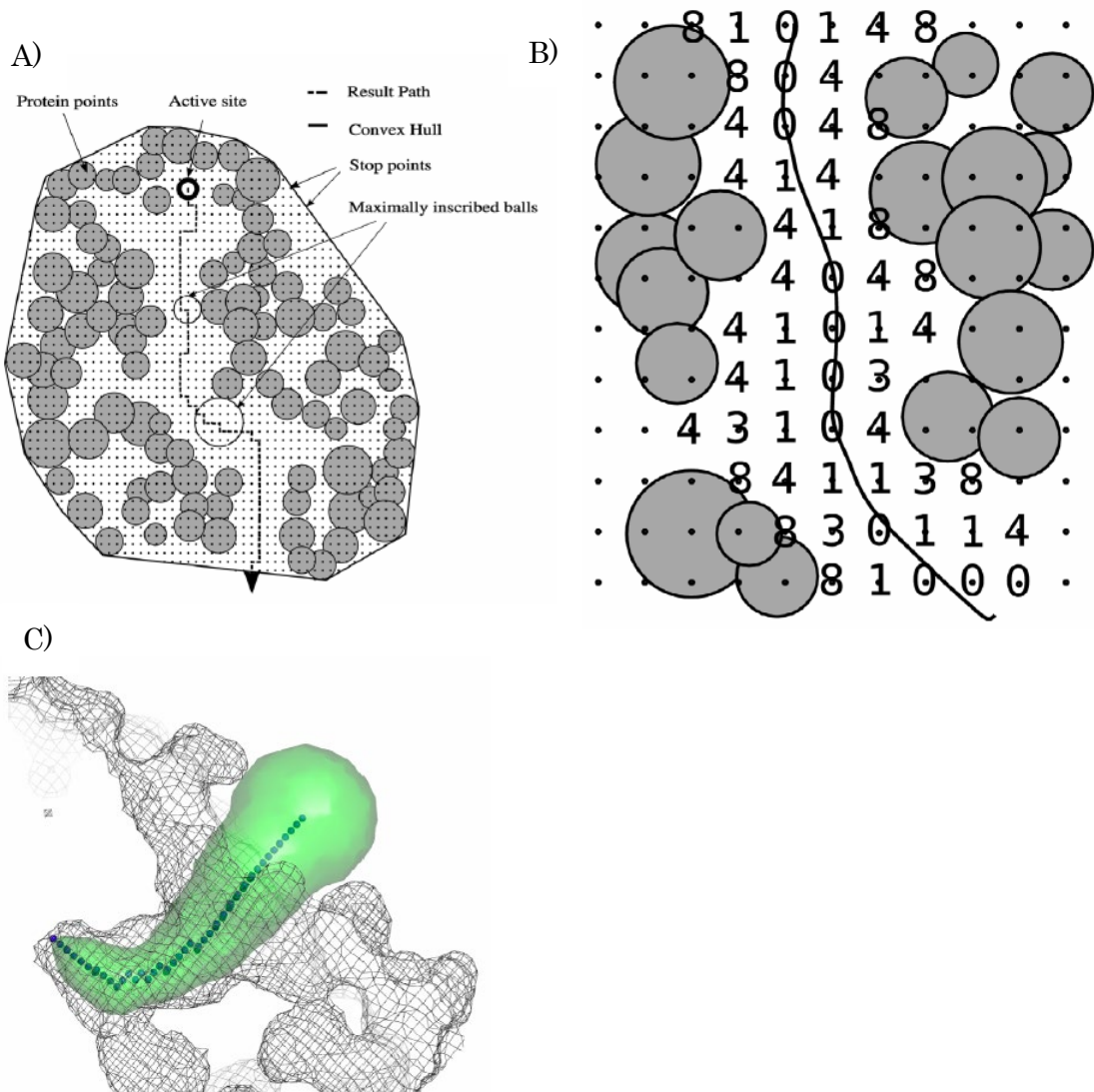


図 8. CAVER のアルゴリズム[43]. A) CAVER の描画: 黒い太い円は開始点を表す。タンパク質は、灰色の円によって可視化され、ファンデルワールス原子半径は離散的な格子 (黒い点) 上にマッピングされる。実線はタンパク質内部とその周囲との境界を表す。白抜き丸は予想されるルート (破線) 上の最大の球を表す。B) コスト関数を用いて格子点において評価する。実線は最適な中心線を表す。C) pyMol によって可視化されたアクセスパス。メッシュワイヤーはタンパク質の表面を表し、球は予想されたイオン透過経路の中心線を示し、緑のオブジェクト表面はイオンの透過経路を表す。

$$c(x) = \frac{1}{(r_{\max}(x) + \epsilon)^2}$$

2.2. エネルギー最小化と MD シミュレーション

ポテンシャルエネルギー関数として、タンパク質と脂質には CVFF 力場[44]、ポリエン鎖（レチナールとバクテリオルベリン）と塩化物イオンには ESFF 力場[45]を用いた。以下のプロトコルを用いて MD シミュレーションを行った。シミュレーションに用いる系は、5,000 ステップの共役勾配エネルギー最小化を実行することによって構造最適化された。塩化物イオン、タンパク質、水分子およびバクテリオルベリン重原子の位置座標は、構造最適化の間、X線結晶構造の位置座標に固定した。平衡計算として、200ps の MD シミュレーションにおいて力定数を $25 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}$ 、 $10 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}$ および $1 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}$ と減少させることにより、初期構造への位置制限を徐々に緩和させながら 200ps の MD シミュレーションを行った。減少させることによって行った。次に、1-ns シミュレーションを、位置制限のない NVT アンサンブル内で 298 K の一定温度で実施した。MD シミュレーションは、Discover/Insight II ソフトウェアパッケージ (BIOVIA, Inc.) で行った。時間ステップは 1fs で積分され、短距離相互作用のカットオフは 9.5\AA であった。Discovery Studio 4.5 ソフトウェアパッケージ (DassaultSystèmesBIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego : DassaultSystèmes, 2016) を使用して分子グラフィックスと MD シミュレーション解析の操作を行った。

2.3. HR 野生型および S81A 変異体発現細胞の樹立

HEK293 細胞を、10%ウシ胎仔血清を含む最小必須培地 (Life Technologies Japan, Tokyo) 中で、 37°C 、5% CO_2 環境下で培養した。培養培地を 3 日毎に

交換し、細胞を 0.02% EDTA /PBS 溶液を用いて継代培養した。

安定した HR または S81A 変異体発現細胞は、以前に富田らにより報告された方法[21]によって確立された。発現プラスミド pCAG-NpHR-IRES-puro または pCAG-S81A 変異体-IRES-puro を制限酵素を用いて線状化し、CUY21Pro-vitro システム (Nepa Gene、Chiba、Japan) を用いて培養 HEK293 細胞にエレクトロポレーションにより形質導入させた。形質導入した細胞 (HEK-NpHR または-S81A) は、少なくとも 10 日間、ピューロマイシン (0.1~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む培地で選択した。

2.4. パッチクランプ記録

EPC-10 (HEKA Electronic、Lambrecht、Germany) を用いて、ホールセル法により光電流を記録した。サンプリングレート 10 kHz でデータを記録した。細胞内液の組成は、133 mM のグルコン酸カリウム、7 mM の KCl、4 mM の MgCl₂、0.1 mM の EGTA、10 mM の HEPES、0.5 mM の Na-GTP、および 2 mM の Na-ATP で 1N NaOH により pH 7.4 に調整した。細胞外液の組成は、138 mM NaCl、1 mM NaHCO₃、0.3mM Na₂HPO₄、5 mM KCl、0.3 mM KH₂PO₄、1.25 mM CaCl₂、0.5 mM MgCl₂、0.5 mM MgSO₄、5 mM HEPES-NaOH、22.2 mM グルコースで、1N HCl により pH 7.2 に調整した。光刺激は、超高圧水銀ランプ (HB-10103AF、Nikon、Japan) を光源とし、バンドパスフィルターにより 550 nm の波長を刺激光として用いた。光強度は、光エネルギーメーター (LaserCheck、Edmund Optics、New Jersey) で測定し 14 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ に統一した。光電流は、20 秒ごとに 1 秒間の光刺激を電磁シャッター (Unibiltz、Rochester、NY) により制御して行い、これを 2~3 回反復して記録した。

3. 結果と考察

3.1. HR における塩化物イオン透過経路の解析

イオン透過経路ソフトウェア CAVER を用いて、HR (3a7k) のイオン透過経路を予測した。図 9 および図 10 に示すように、内径 0.96 \AA 未満の Ser81 および Leu85 で囲まれた領域は、塩化物イオンの大きさに比べ非常に狭く、イオン輸送のボトルネックの 1 つであることが示された。Ser81 を Ser よりも小さい Ala で置き換えることによって、CAVER シミュレーション (図 11) でボトルネックと見られるイオン輸送経路の半径が 1.11 \AA に広がった。塩化物イオンは、Ser81 から Ala への変異において容易に輸送されると予想された。しかしながら、この変異によって塩化物イオンとの相互作用が弱まり、これが塩化物イオンの透過性を低下させる可能性も考えられた。

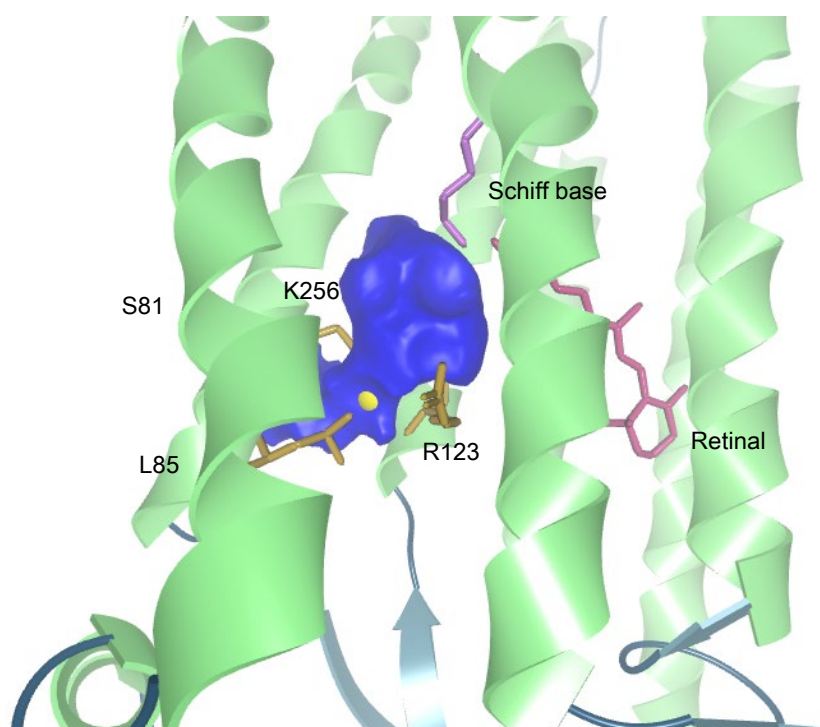


図9. CAVERによる予測イオン透過経路.

青色の部分は予想されたイオン透過経路を示す。Ser81 および Leu85 により構成される狭い経路 (0.96 Å)が確認された。

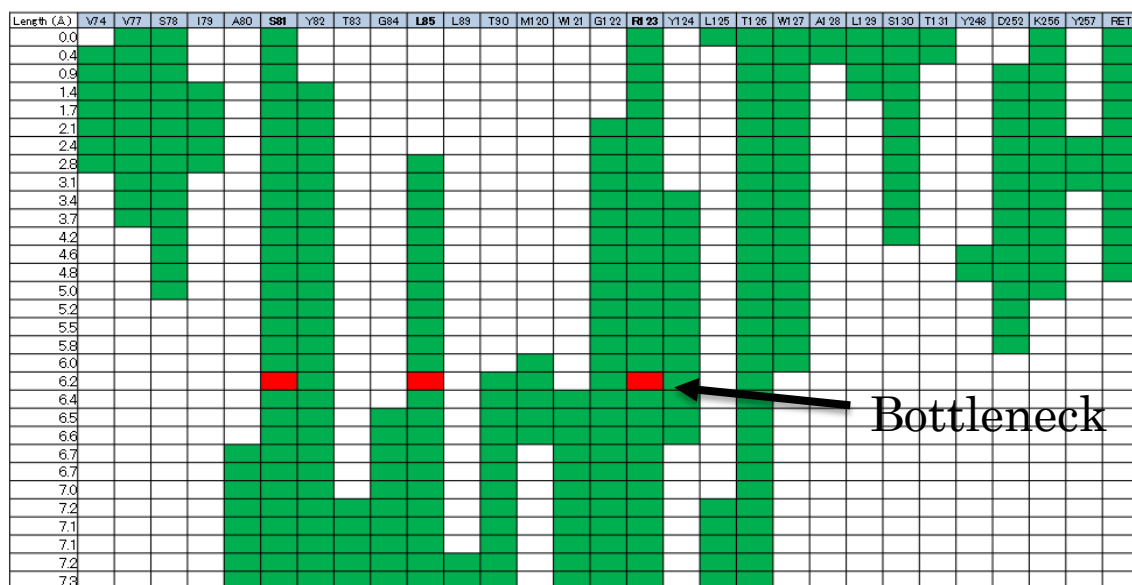


図10. CAVERによるイオントンネルを構成アミノ酸残基と初期座標からの距離（初期座標は Thr126）。緑セルの表示は予測されたイオン透過経路、赤セルの表示は経路が狭くなったボトルネックを示している。

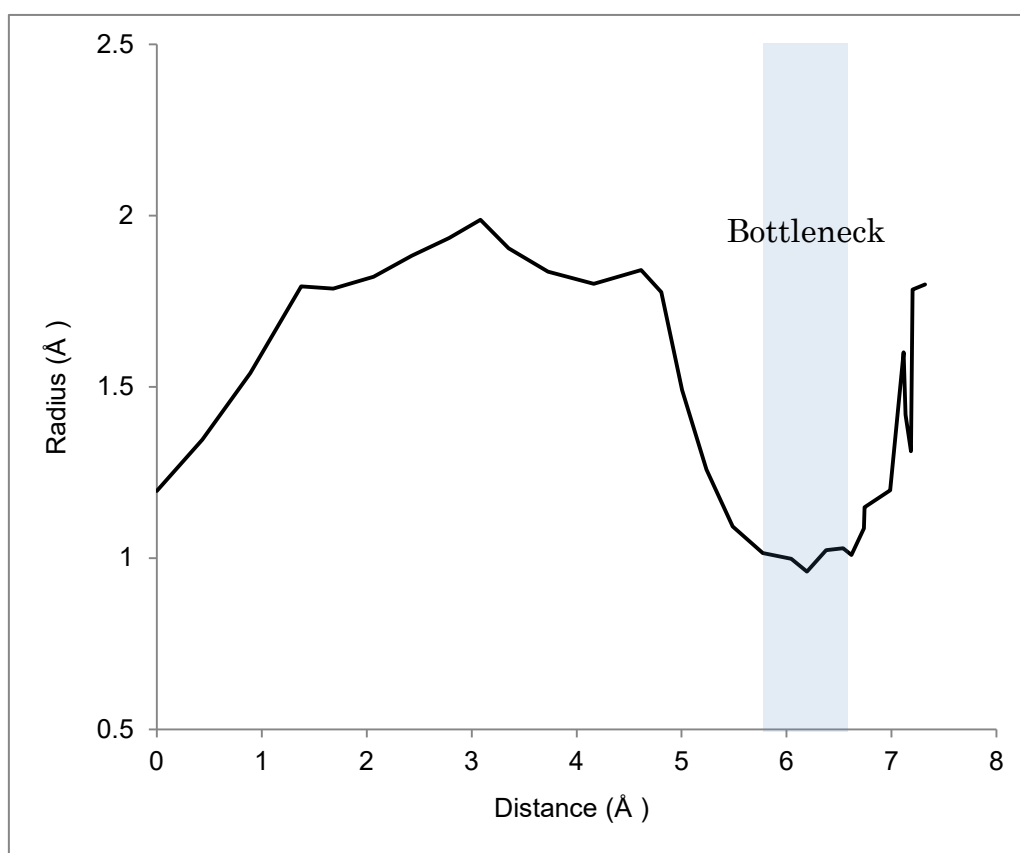


図 1 1. イオン透過経路における経路径と初期座標 (Thr126) からの距離
グレーの箇所は、Ser81 と Leu95 で構成されるイオン透過経路が経路径 1.0 Å 以下でボトルネックになることを示す。

3.2. MD シミュレーションにおける野生型および変異型 NpHR の構造特性

S81A 変異の効果を調べるために、MD シミュレーションを行った。1-ns MD シミュレーション後の野生型 (図 1 2 A) および S81A 変異体タンパク質 (図 1 2 B) 構造の両方を示した。野生型および変異体についての結晶構造とシミュレーション後の構造との間の主鎖の二乗平均平方根距離 (RMSD) 値は、1.5 Å 未満であった。結晶構造とシミュレーション後間の各残基の RMSD 値は、常に 2.5 Å 未満であった (図 1 2 C)。シミュレーションを通じてバクテリオルベリン分子は HR モノマーとの接触を維持した (図 1 2 A、B)。図 1 2 A に示すように、野生型の構造シミュレーションは、MD シミュレーション中に BS-I の塩化物イオンが初期構造の塩化物イオンの位置に近接したままであることを示した。

野生型タンパク質において、BS-I の塩化物イオンは、結晶構造と比較して Thr126 の C_β から 2 Å 以内に保持された (図 1 2 D、青色線)。野生型、変異体の両構造における α-ヘリックスの相対的な向きはほぼ同じであり、変異によって引き起こされる 3D 構造の変化は局所的に限定されていた。図 1 2 B に示すように、S81A 変異体の効果は構造全体ではなく BS-I に限定された。

野生型および変異体の初期構造と最終構造との間の RMSD 値を図 1 2 C (それぞれ青線および赤線) に示す。RMSD 値は 1.6 Å を超えなかった。しかしながら、野生型と変異体の間で、著しい変動を伴う領域が時折変化することは興味深い。

注目すべきことに、S81A 変異体の MD シミュレーションは、図 1 2 D に示すように、塩化物イオンが 250 ps 以内に Thr126 から逸脱し、塩化物イオンと Thr126 との間の相互作用の復元が 1-ns MD シミュレーションの間では一度も観察されなかった。この結果は、塩化物イオンによる透過が S81A 変異体において決して起こらなかったことを強く示している。また、シミュレーション後

の 3 次元構造は、水分子が結晶構造中の塩化物イオンの位置を占めていることを明らかにした (図 1 2 B)。

図 1 3 A および B は、それぞれ野生型および S81A のシッフ塩基付近のシミュレーション後の構造を示す。いずれの構造においても、各 81 番目の残基の C_{β} と水分子との間の距離に有意差は認められず (図 1 3 C)、水分子は各空洞に保持された。しかし、S81A 変異体の Thr126 側鎖の二面角 ($N - C_{\alpha} - C_{\beta} - O$) は、野生型と比較して 120° 変化した (図 1 3 D)。野生型の結晶構造では、Thr126 と Ser81 の水酸基 O 原子間の距離は 2.6 \AA であり、シミュレーション後のこの距離は 2.5 \AA と変化せず、これは強力な相互作用(水素結合)が Thr126 と Ser81 との間に存在することを示している。

塩化物イオンは Thr126、Ser130、およびプロトン化されたシッフ塩基によって強く結合することが知られている[30]。したがって、図 1 3 B に示すように、S81A 変異体で生じた Thr126 側鎖回転が、Thr126 のヒドロキシル基を Ser130 およびシッフ塩基のプロトンから離れさせ、塩化物イオンと Thr126 との相互作用を弱めると考えられる。この現象は、Ser81 が水素結合を介して Thr126 側鎖の向きの維持に関与することを示唆している。

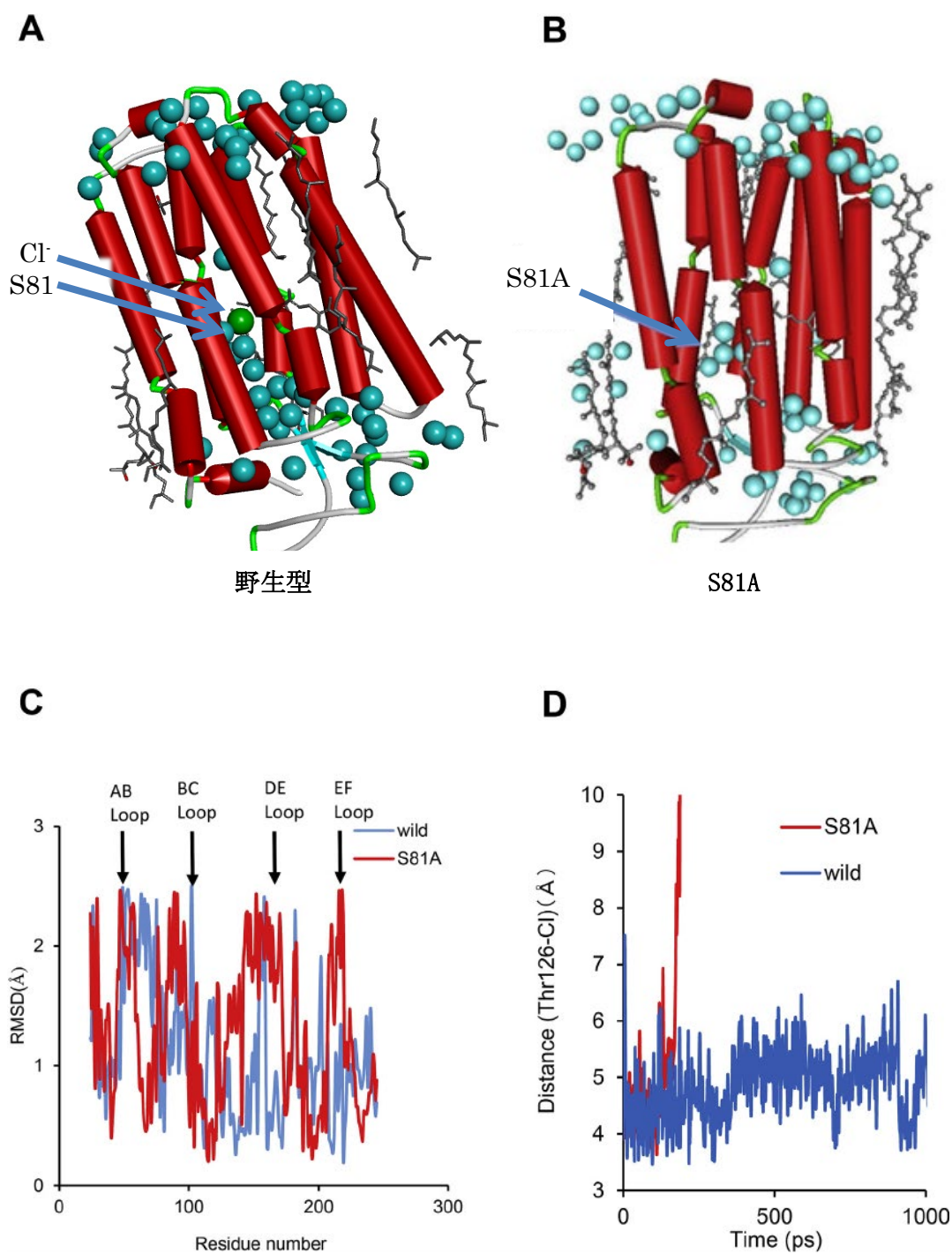


図 1 2 (A-D). MD シミュレーションにより予測された HR 平衡構造
 HR の (A) 野生型および (B) S81A 変異体の 3D 構造を示す。(C) 結晶構造
 (PDB ID:3A7K) と野生型および S81A 変異体の平衡構造との間の各残基の RMSD
 値を示す (D) 塩化物イオンと Thr126 の C_β との間の距離を示す。

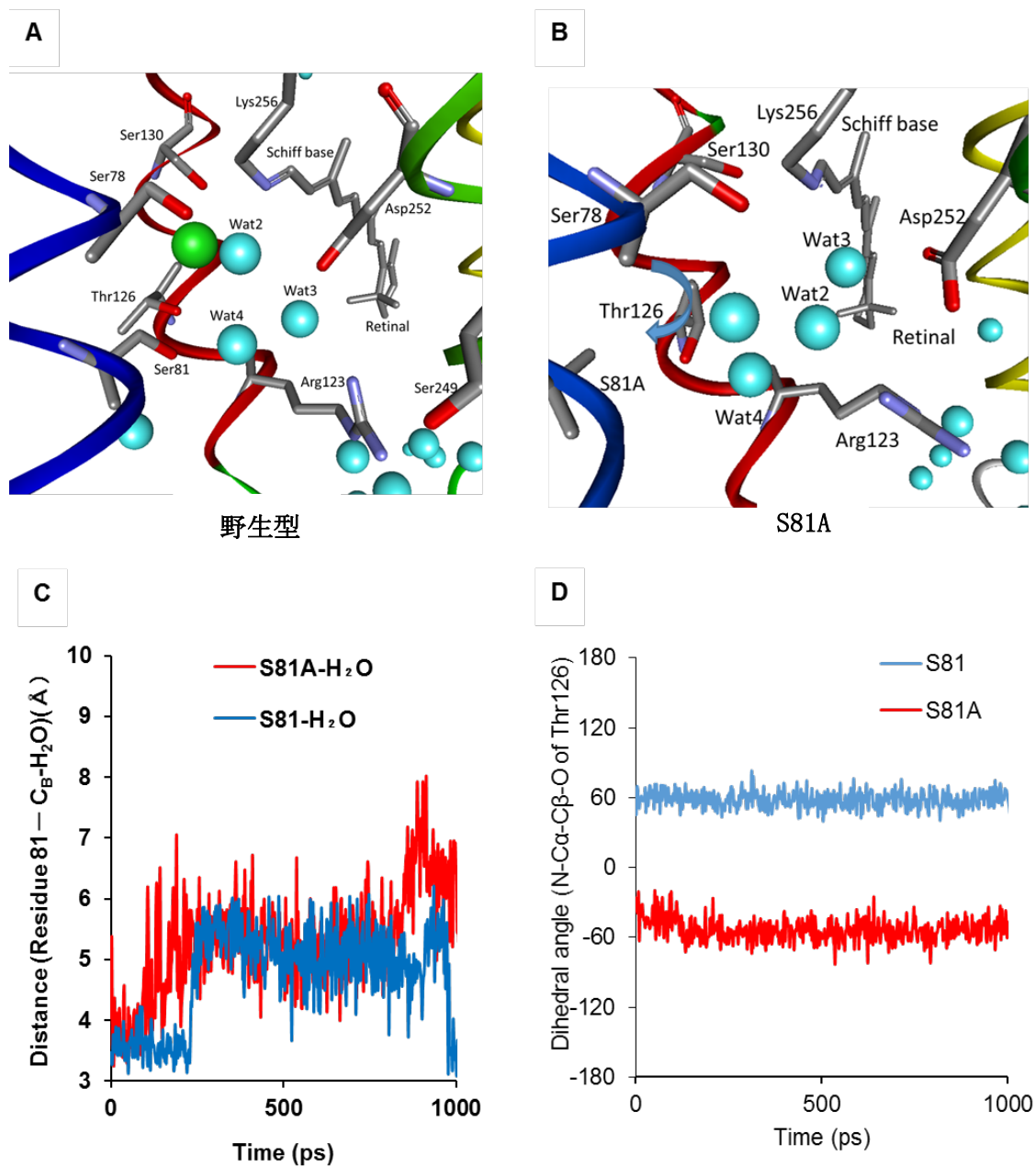


図. 1 3 (A-D) . 緑色および青色の球体は、それぞれ (A) 野生型および (B) S81A 変異体において塩化物イオンおよび水分子を示す。 赤色、青色および緑色のリボンは、それぞれ B ヘリックス、C ヘリックスおよび G ヘリックスを表す。

(C) 81 番目の残基の C_β と水分子の 0 との間の距離の時間経過を示す; 青線: 野生型、赤線: S81A。 (D) Thr126 の N-C_α-C_β-O 二面角 (度) の時間経過を示す; 青線: 野生型、赤線: S81A。

3.3. HR 野生型および S81A 変異体に対するパッチクランプ記録

HR 野生型および S81A 変異体遺伝子の発現が光電流に及ぼす影響を調べるために、各遺伝子を安定的に発現する細胞株を樹立した。発現プラスミドベクターは、CAG プロモーターおよび内部リボソーム進入部位 (IRES) によって調節されるピューロマイシン耐性遺伝子を含む。目的の遺伝子を発現する細胞を、ピューロマイシンを含む培地で培養することによって選択した。

野生型 HR を発現する細胞は、550 nm の光に応答し過分極を引き起こした (図 14A)。しかし、S81A 変異 HR は 550 nm の光に反応しなかった (図 14B)。これらは、構造モデリングおよび MD シミュレーション結果を支持し、HR S81A 変異体が塩化物イオン輸送を起こさないことを示した。

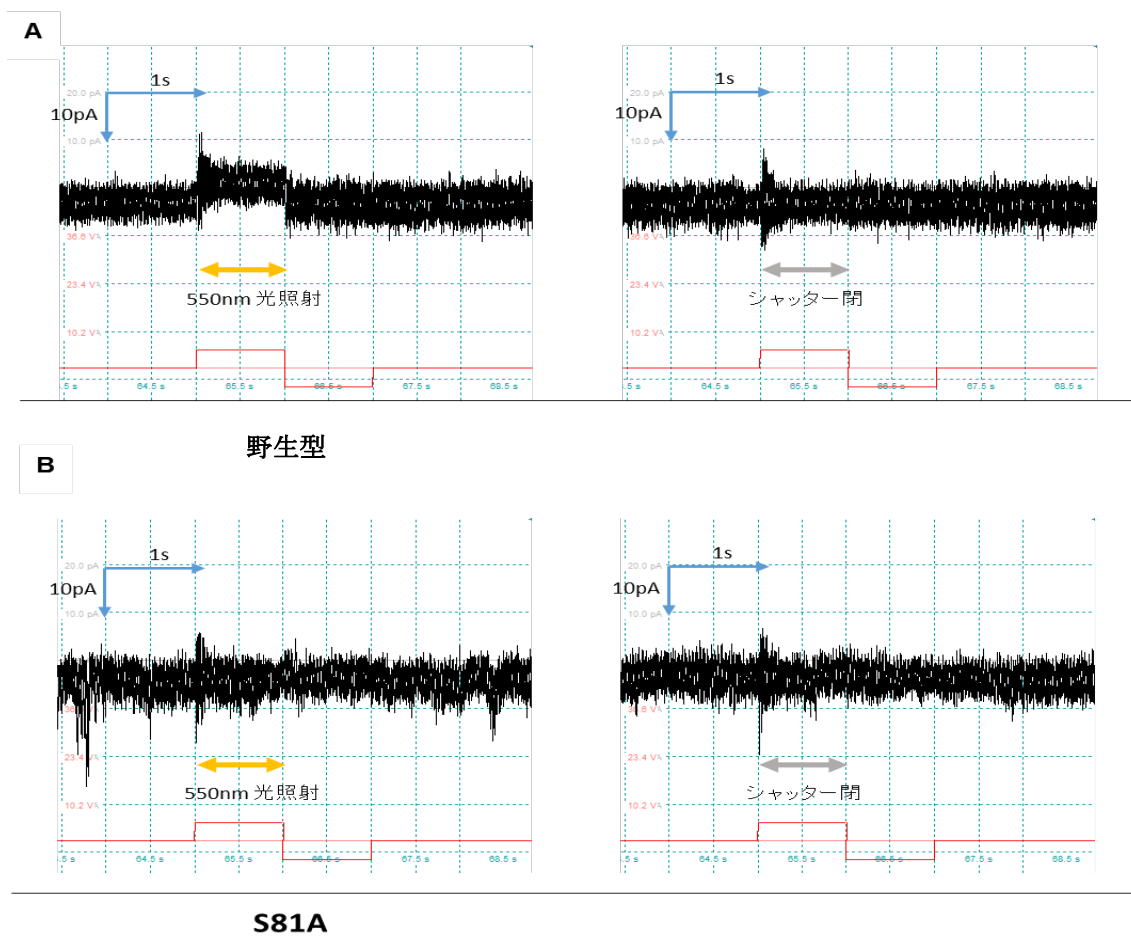


図 1 4 A, B. (A) 野生型 HR と (B) HR S81A 変異体の 550 nm における誘発光電流 右側の図の最初のスパイクは電気シャッターによって誘発された誘発光電流である。

4. まとめ

本研究では、HR のイオン透過経路の形状解析から、Ser81 が塩化物イオン経路にボトルネックを形成することが予測された。ボトルネックを拡張した HR S81A 変異体の MD シミュレーションから、S81A 変異体のイオン透過経路に塩化物イオンが安定的に存在できないことが明らかとなった。一方、野生型 HR の Ser81 と Thr126 との間の相互作用は、水素結合を介して Thr126 側鎖の配向を拘束していることがわかった。この拘束が Thr126 と塩化物イオンの相互作用を維持させ、塩化物イオンが BS-I に維持されることを明らかにした。また、S81A を恒常的に発現する細胞株を用いたパッチクランプ法によるイオン電流測定により、S81A 変異体の塩化物イオン透過性の消失が確認された。この結果はシミュレーション結果を支持した。

本研究では、HR における塩化物イオン輸送に対する Ser81 の重要性を明らかにした。さらに、本研究で同定したボトルネックの位置に影響を及ぼす変異体を用いて、高いイオン透過性を有する新規な HR 変異体の設計に寄与できると考えられる。

5. 参考文献

- [1] S.M. Petersen-Jones, L.M. Occelli, P.A. Winkler, W. Lee, J.R. Sparrow, M. Tsukikawa, S.L. Boye, V. Chiodo, J.E. Capasso, E. Becirovic, C. Schon, M.W. Seeliger, A.V. Levin, S. Michalakis, W.W. Hauswirth, S.H. Tsang, Patients and animal models of CNGBeta1-deficient retinitis pigmentosa support gene augmentation approach, *J Clin Invest* 128 (2018) 190-206.
- [2] 安田美穂, 観察研究 (コホート研究) : 久山町スタディ, *あたらしい眼科* 6 (2009) 25.
- [3] S.X. Wong WL, Li X, Cheung CM, Klein R, Cheng CY, Wong TY, Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Glob Health*. 2 (2014) e106-116.
- [4] H. Tomita, E. Sugano, H. Yawo, T. Ishizuka, H. Isago, S. Narikawa, S. Ku"gler, M. Tamai, Restoration of Visual Response in Aged Dystrophic RCS Rats Using AAV-Mediated Channelopsin-2 Gene Transfer, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48 (2007) 3821.
- [5] H. Tomita, E. Sugano, N. Murayama, T. Ozaki, F. Nishiyama, K. Tabata, M. Takahashi, T. Saito, M. Tamai, Restoration of the Majority of the Visual Spectrum by Using Modified Volvox Channelrhodopsin-1, *Molecular Therapy* 22 (2014) 1434-1440.
- [6] G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, E. Bamberg, Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 13940-13945.
- [7] 神取秀樹, ロドプシンの分子科学, *Molecular Science* 5 (2011) A0043.
- [8] D. Oesterhelt, W. Stoeckenius, Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*, *Nat New Biol* 233 (1971) 149-152.

-
- [9] A. Matsuno-Yagi, Y. Mukohata, Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation, *Biochem Biophys Res Commun* 78 (1977) 237-243.
- [10] G. Nagel, D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A.M. Musti, E. Bamberg, P. Hegemann, Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae, *Science* 296 (2002) 2395-2398.
- [11] O.A. Sineshchekov, K.H. Jung, J.L. Spudich, Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 8689-8694.
- [12] T. Suzuki, K. Yamasaki, S. Fujita, K. Oda, M. Iseki, K. Yoshida, M. Watanabe, H. Daiyasu, H. Toh, E. Asamizu, S. Tabata, K. Miura, H. Fukuzawa, S. Nakamura, T. Takahashi, Archaeal-type rhodopsins in *Chlamydomonas*: model structure and intracellular localization, *Biochem Biophys Res Commun* 301 (2003) 711-717.
- [13] L. Fenno, O. Yizhar, K. Deisseroth, The development and application of optogenetics, *Annu Rev Neurosci* 34 (2011) 389-412.
- [14] J.Y. Lin, A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments, *Exp Physiol* 96 (2011) 19-25.
- [15] B. Schobert, J.K. Lanyi, Halorhodopsin is a light-driven chloride pump, *J Biol Chem* 257 (1982) 10306-10313.
- [16] O. Bismuth, P. Komm, N. Friedman, T. Eliash, M. Sheves, S. Ruhman, Deciphering excited state evolution in halorhodopsin with stimulated emission pumping, *J Phys Chem B* 114 (2010) 3046-3051.
- [17] I. Chizhov, M. Engelhard, Temperature and halide dependence of the photocycle of halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*, *Biophys J* 81 (2001) 1600-1612.

-
- [18] K. Ihara, T. Umemura, I. Katagiri, T. Kitajima-Ihara, Y. Sugiyama, Y. Kimura, Y. Mukohata, Evolution of the archaeal rhodopsins: evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation, *J Mol Biol* 285 (1999) 163-174.
- [19] J. Sasaki, L.S. Brown, Y.S. Chon, H. Kandori, A. Maeda, R. Needleman, J.K. Lanyi, Conversion of bacteriorhodopsin into a chloride ion pump, *Science* 269 (1995) 73-75.
- [20] T. Kouyama, S. Kanada, Y. Takeguchi, A. Narusawa, M. Murakami, K. Ihara, Crystal structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*, *J Mol Biol* 396 (2010) 564-579.
- [21] L.O. Essen, Halorhodopsin: light-driven ion pumping made simple?, *Curr Opin Struct Biol* 12 (2002) 516-522.
- [22] M. Kolbe, H. Besir, L.O. Essen, D. Oesterhelt, Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution, *Science* 288 (2000) 1390-1396.
- [23] S. Kanada, Y. Takeguchi, M. Murakami, K. Ihara, T. Kouyama, Crystal structures of an O-like blue form and an anion-free yellow form of *pharaonis* halorhodopsin, *J Mol Biol* 413 (2011) 162-176.
- [24] M. Rudiger, D. Oesterhelt, Specific arginine and threonine residues control anion binding and transport in the light-driven chloride pump halorhodopsin, *EMBO J* 16 (1997) 3813-3821.
- [25] G. Varo, R. Needleman, J.K. Lanyi, Light-driven chloride ion transport by halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*. 2. Chloride release and uptake, protein conformation change, and thermodynamics, *Biochemistry* 34 (1995) 14500-14507.
- [26] K. Ludmann, G. Ibrón, J.K. Lanyi, G. Varo, Charge motions during the photocycle of *pharaonis* halorhodopsin, *Biophys J* 78 (2000) 959-966.

-
- [27] J. Guijarro, M. Engelhard, F. Siebert, Anion uptake in halorhodopsin from *Natromonas pharaonis* studied by FTIR spectroscopy: consequences for the anion transport mechanism, *Biochemistry* 45 (2006) 11578-11588.
- [28] W. Gmelin, K. Zeth, R. Efremov, J. Heberle, J. Tittor, D. Oesterhelt, The crystal structure of the L1 intermediate of halorhodopsin at 1.9 angstroms resolution, *Photochem Photobiol* 83 (2007) 369-377.
- [29] C. Pfisterer, A. Gruia, S. Fischer, The mechanism of photo-energy storage in the Halorhodopsin chloride pump, *J Biol Chem* 284 (2009) 13562-13569.
- [30] M. Sato, M. Kubo, T. Aizawa, N. Kamo, T. Kikukawa, K. Nitta, M. Demura, Role of putative anion-binding sites in cytoplasmic and extracellular channels of *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin, *Biochemistry* 44 (2005) 4775-4784.
- [31] T. Nakanishi, S. Kanada, M. Murakami, K. Ihara, T. Kouyama, Large deformation of helix F during the photoreaction cycle of *Pharaonis* halorhodopsin in complex with azide, *Biophys J* 104 (2013) 377-385.
- [32] T. Fukuda, K. Muroda, H. Kandori, Detection of a protein-bound water vibration of halorhodopsin in aqueous solution, *Biophysics* 9 (2013) 167-172.
- [33] G. Varo, Analogies between halorhodopsin and bacteriorhodopsin, *Biochim Biophys Acta* 1460 (2000) 220-229.
- [34] J.K. Lanyi, Photochromism of halorhodopsin. cis/trans isomerization of the retinal around the 13-14 double bond, *J Biol Chem* 261 (1986) 14025-14030.
- [35] G. Varo, L. Zimanyi, X. Fan, L. Sun, R. Needleman, J.K. Lanyi, Photocycle of halorhodopsin from *Halobacterium salinarium*, *Biophys J* 68 (1995) 2062-2072.

-
- [36] Y. Yamashita, T. Kikukawa, T. Tsukamoto, M. Kamiya, T. Aizawa, K. Kawano, S. Miyauchi, N. Kamo, M. Demura, Expression of salinarum halorhodopsin in Escherichia coli cells: solubilization in the presence of retinal yields the natural state, *Biochim Biophys Acta* 1808 (2011) 2905-2912.
- [37] B.V. Zemelman, G.A. Lee, M. Ng, G. Miesenbock, Selective photostimulation of genetically chARGed neurons, *Neuron* 33 (2002) 15-22.
- [38] A. Santos, M.S. Humayun, E. de Juan, Jr., R.J. Greenburg, M.J. Marsh, I.B. Klock, A.H. Milam, Preservation of the inner retina in retinitis pigmentosa. A morphometric analysis, *Arch Ophthalmol* 115 (1997) 511-515.
- [39] F. Zhang, L.P. Wang, M. Brauner, J.F. Liewald, K. Kay, N. Watzke, P.G. Wood, E. Bamberg, G. Nagel, A. Gottschalk, K. Deisseroth, Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry, *Nature* 446 (2007) 633-639.
- [40] A. Bi, J. Cui, Y.-P. Ma, E. Olshevskaya, M. Pu, A.M. Dizhoor, Z.-H. Pan, Ectopic Expression of a Microbial-Type Rhodopsin Restores Visual Responses in Mice with Photoreceptor Degeneration, *Neuron* 50 (2006) 23-33.
- [41] H.K. Hartline, The response of single optic nerve fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina, *American Journal of Physiology* 121 (1938) 400-415.
- [42] Kenneth P. Greenberg, A. Pham, Frank S. Werblin, Differential Targeting of Optical Neuromodulators to Ganglion Cell Soma and Dendrites Allows Dynamic Control of Center-Surround Antagonism, *Neuron* 69 (2011) 713-720.
- [43] M. Petrek, M. Otyepka, P. Banas, P. Kosinova, J. Koca, J. Damborsky, CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and

cavities, *BMC Bioinformatics* 7 (2006) 316.

[44] P. Dauber-Osguthorpe, V.A. Roberts, D.J. Osguthorpe, J. Wolff, M. Genest, A.T. Hagler, Structure and energetics of ligand binding to proteins: *Escherichia coli* dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system, *Proteins* 4 (1988) 31-47.

[45] S. Shi, L. Yan, Y. Yang, J. Fisher-Shaulsky, T. Thacher, An extensible and systematic force field, ESFF, for molecular modeling of organic, inorganic, and organometallic systems, *J Comput Chem* 24 (2003) 1059-1076.

謝辞

本研究の場を与えてくださり、終始懇切なる御指導を賜るのみならず、科学に取り組む姿勢、生化学のすばらしさを教えてくださいました岩手大学理工学部の冨田浩史教授に心から感謝申し上げます。

研究に関する有用なご助言、適切な御指導をしてくださるのみならず、将来についての様々のご助言をくださいました岩手大学理工学部の菅野江里子准教授に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、数々のご助言をいただいた岩手大学理工学部の田端希多子研究員に感謝申し上げます。

パッチクランプ解析に関する研究を行ってくださった渡辺義人様に感謝申し上げます。

バイオインフォマティクス解析を行うにあたり、懇切丁寧にご指導くださり、様々のご助言をいただきました立命館大学生命科学部の菊地武司教授に感謝申し上げます。

研究に専念できる環境をつくることに御尽力してくださいました秘書の高橋葉子様感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、私を支援してくださった岩手大学理工学部の視覚神経科学研究室の皆様感謝申し上げます。

最後に私の研究生活を経済的な面だけでなくあたたかく見守ってくれた両親と家族である坂尻徹也 坂尻蒔穂に感謝します。