

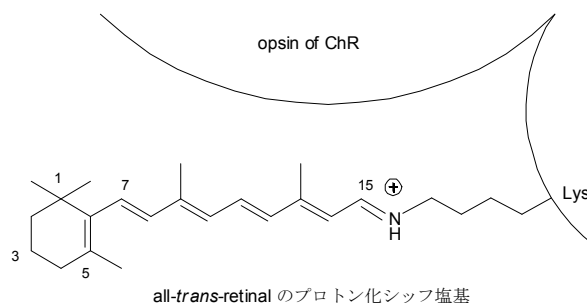
「発色団によるチャンネルロドプシンの長波長光による刺激活性化モデルの構築」
 神戸薬科大学薬学部 教授 和田 昭盛

1 研究の背景と目的

近年、チャンネルロドプシン (ChR) を脳のニューロンに発現させ、ニューロン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、多くの注目を集めている。オプトジェネティクスは、脳神経の機能解明と密接にかかわり、記憶における脳の制御や脳神経変性疾患、精神神経疾患の発病メカニズムの解明が期待できるなど非常に有用な研究分野となっている。神経科学において、他の細胞に影響を与えることなく脳内の特定の細胞だけを制御することが直面する大きな課題となっていた。オプトジェネティクスは、神経細胞をコントロールするために光を用いているため、従来からある電極を用いた電気刺激による方法に比較して周りの細胞への影響が少なくできることから、選択的な細胞の制御において革命的な方法となっている。

これまでのオプトジェネティクスには、Ch1 と Ch2 が用いられるが、これらは青色光および緑色光にのみ応答するという限界がある。青色光や緑色光は、組織中の神経細胞に光が到達しにくく、光に対する応答が小さくなるという欠点が存在している

ChR は、視物質ロドプシンと同様に、発色団であるレチナールとタンパク質オプシンから成り立っており、その吸収波長は発色団やオプシンにより異なることが判明している。そこで、今回、光の組織中への到達度ならびに応答性を高めるために発色団を基盤として赤外線などの長波長光による制御ができるような ChR の活性化モデルを構築することを目的とした。



脳神経の光制御に関しては、オプシンであるタンパク質部分のミューテーションにより、発色団との相互作用による長波長光での制御を模索している研究は活発に行われている。しかしながら、現時点では緑色光での制御が限界となっている。

本研究では、この欠点を打破すべく、プロトン化シッフ塩基部分あるいは、レチナールのシクロヘキセン部分の発色団共役系を延長することにより、長波長光で ChR を制御しようとするものである。

2 研究方法・研究内容

長波長光による ChR の制御するため発色団部分の改変として2つの方法を計画した。第一の方法は、シッフ塩基のアルキルアミン部への二重結合の導入である (図1)。

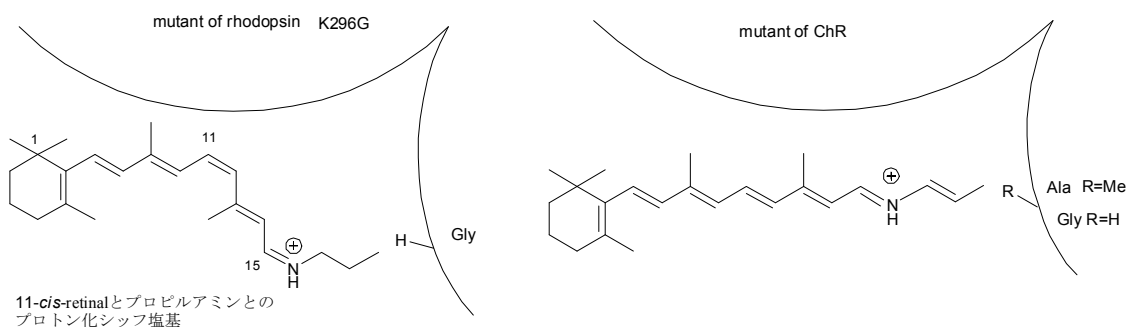


図1

ロドプシンオプシンの 296 番目のリジンを経リジンにかえたミュータントは、11-*cis*-レチナールとプロピルアミンとから創製したプロトン化シッフ塩基をタンパク質中に取り込み、視覚色素を形成することが明らかになっている (図 1、左)。従って、ChR の対応するリジンをアラニンやグリジンと変えたミュータントにおいて、シッフ塩基部分を修飾してもタンパク質中に取り込まれ、ChR アナログが形成されることが十分に期待できる。そこで、長波長光での感受性をもたせるためアルキルアミン部分に二重結合を導入したシッフ塩基を作成することとした (図 1、右)。

第二の方法としては、レチナールそのものの共役系を伸ばすこととした。まず、A1 アルデヒドのシクロヘキセン環に二重結合を導入した A2 アルデヒドを用いることにより、第一段階での長波長シフトが可能である。続いて、側鎖のポリエン部分に二重結合を増やすことで更なる吸収極大の長波長側へのシフトを達成することが可能である。

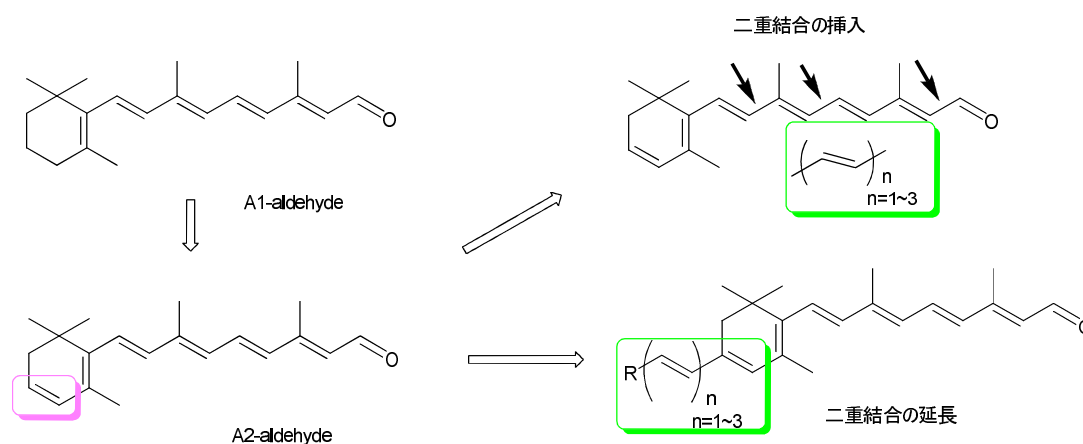


図 2

3 研究成果

(1) 共役したシッフ塩基の合成

まず、予備実験としてβ-イオニリデンアセトアルデヒドにエーテル中アリアルアミンを反応させると、定量的に非共役型のイミンが得られた。得られたイミン体を異性化して共役イミンとするために、塩基や溶媒等を種々検討したところテトラヒドロフラン中、18-クラウンエーテルと *t*-ブトキシカリウムを用いると最も良く異性化が進行し、定量的に共役したイミンの二重結合に関する異性体混合物 (*E:Z*=11:2) として得ることができた。

同様のルートによりレチナールから共役したイミンへと収率よく変換できた (図 3)。

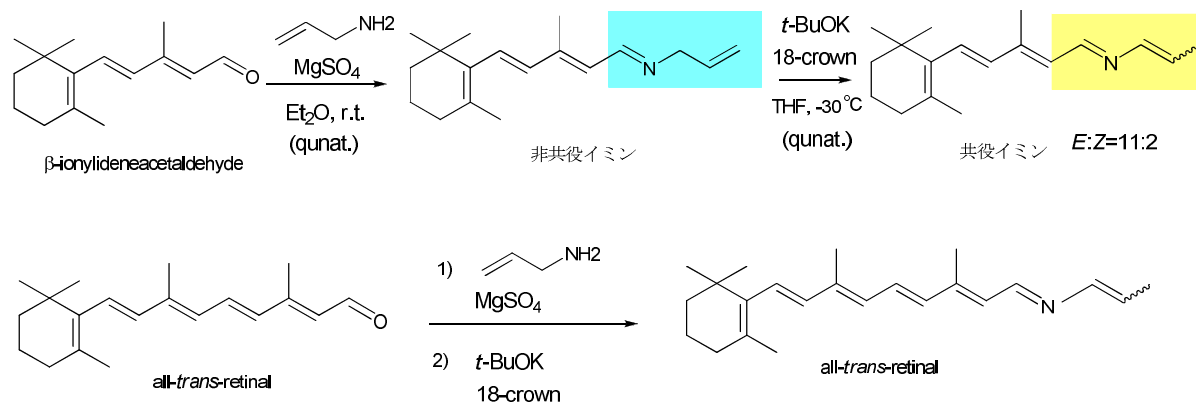


図 3

合成した共役イミンをプロトン化し、レチナールとブチルアミンとのプロトン化シッフ塩基とのUV吸収を比較検討したところ、共役イミンの吸収極大 476 nm となりブチルアミンとのプロトン化シッフ塩基にくらべ約 35 nm 長波長側にシフトしていることが判明した (図4)。

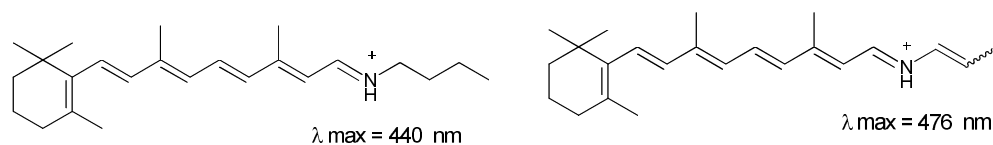


図4

(2) 共役系の長い発色団の合成

共役系の長い発色団は、サフラナールを出発原料として反応条件 A および B を使いわけ共役系の延長と官能基変換を繰り返して、レチナール側鎖に二重結合を一つ挿入した新規アナログ化合物を合成することができた (図5)。

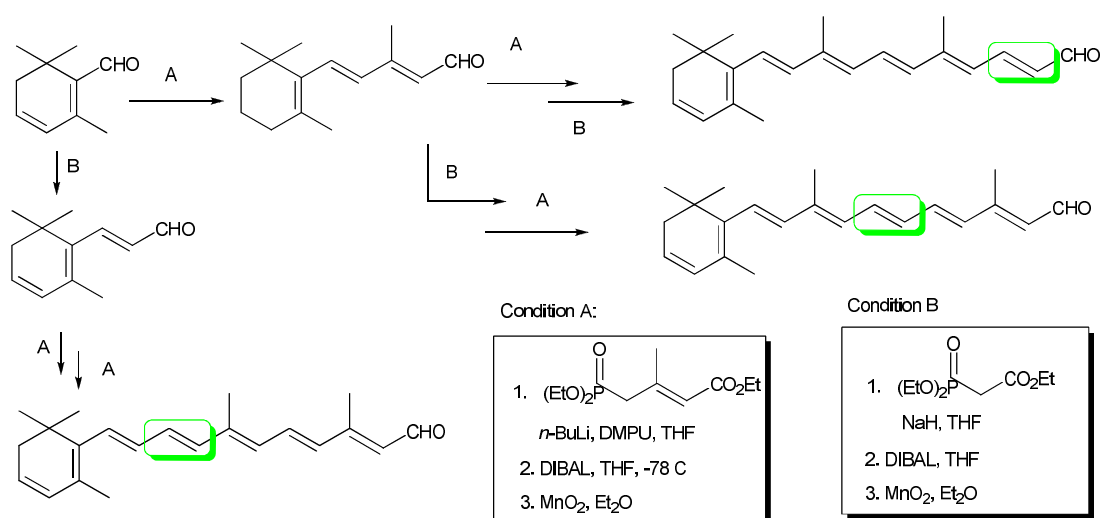


図5

新規合成した発色団の吸収スペクトルを測定したところ、いずれの化合物も 420nm 付近に吸収極大を有しており、A2 アルデヒドの 394nm に比べ約 25nm、レチナール (A1 アルデヒド) に比べ 40nm 長波長側にシフトしていることが明らかとなった。

(3) コンピューターによるコンホメーション解析

現在、ChR のオプシン部分のリジングリシンやアラニンに変異したタンパク質が作成できたので現在結合実験を実施しているところである。一方、ChR の X 線結晶構造が明らかにされている (Nature, 482, 369 (2012)) ので、この構造を用いて共役したイミンとのドッキングシュミレーションを行い発色団のコンホメーション解析を実施した。まず、X 線構造のタンパク質のリジン残基をグリシンおよびアラニンに一塩基変異体とした後、発色団部分をプロトン化共役イミンと変換し、最も安定なコンホメーションを解析し、タンパク質との相互作用についても検討した。

その結果、同じ発色団として用いた結合実験での変異体を比較したところ、グリシン変異体と共役イミンとのプロトン化シッフ塩基のほうがアラニン変異体の場合よりもより安定な構造をとっていることが明らかになり、その安定エネルギーには約 15 kcal/mol 程度の差があることが示された。これはアラニン変異体の場合には、共役シッフ塩基のメチル基水素とアラニンのメチル基水素との距離が近いこと互いに立体的

に反発するため不安定になっているものと予想された。一方グリシン変異体では、この相互作用が消失するためアラニン変異体にくらべてより安定になっているものと思われる(図6、左)。

また、両変異体における発色団コンホメーションには、大きな相違がみられなかったもののいずれの場合にもイミン部の C-N 単結合において *s-cis* 構造をとっていることが判明した。更に、発色団とタンパク質との相互作用を比較すると顕著な相違はみられなかった(図6、右)。今後、実際のタンパク質との結合実験結果とを比較しながら詳細に検討・解析していく予定である。

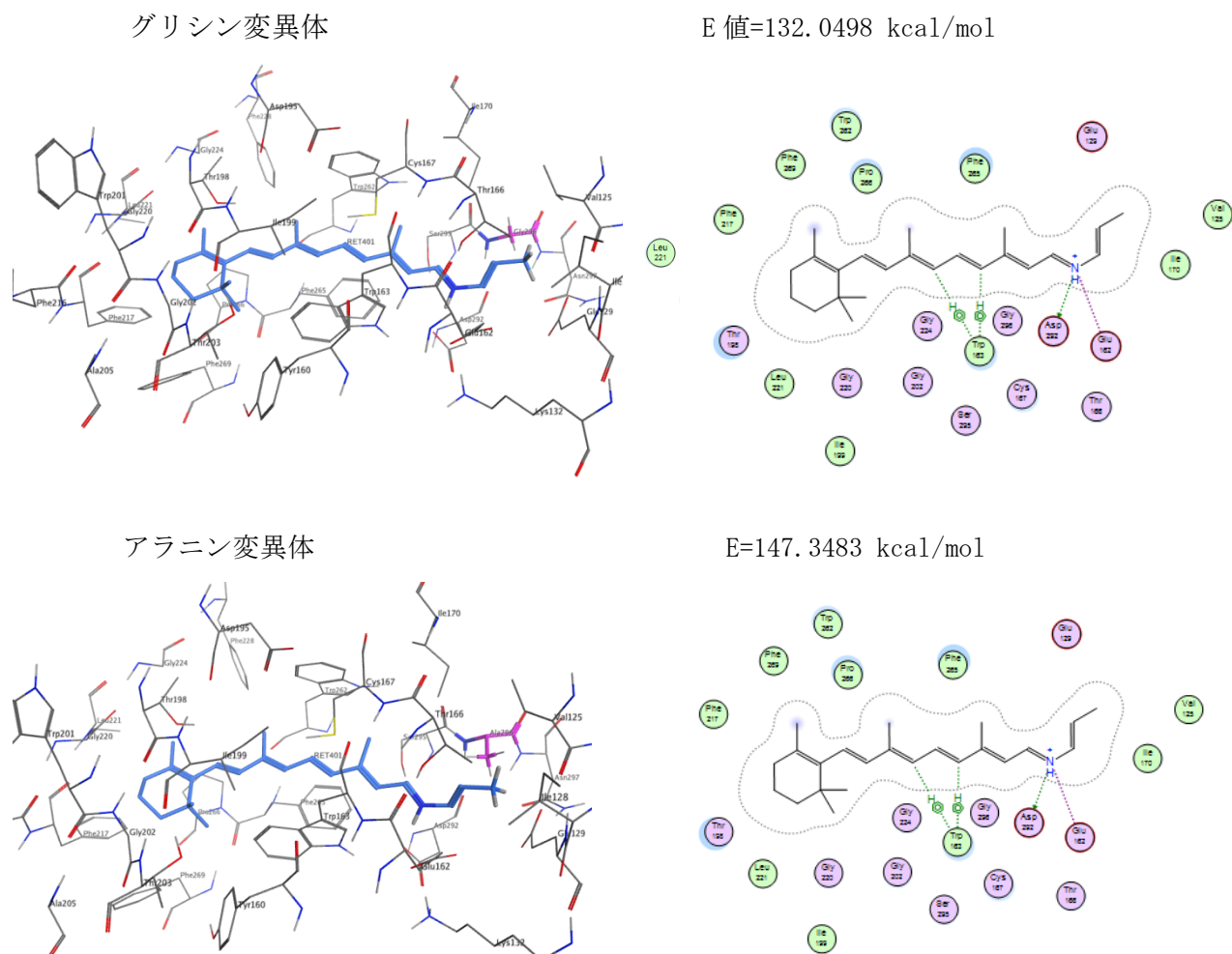


図6

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究では、まだタンパク質オプシンとの結合実験の結果までは得られなかったが、今後結合実験の結果をもとに光挙動についても検討する予定である。本研究では、発色団としてイミン部分への共役系の延長、レチナール側鎖部分への二重結合の導入をおこなったが、これらの手法を併用することにより、より長波長に吸収をもつ発色団を開発できるものと予想される。これらの成果を基盤として、研究の目的であるより長波長光で活性化可能な ChR が開発できるものと期待される。