

タンパク質ドメインの見過ごされてきた機能的役割を解明

～イオンチャネルの新しいイオン選択の仕組みの解明に向けて～

ポイント

- ・従来切除されてきた細胞内ドメインを含む、全長型アニオンチャネルロドプシンの発現に成功。
- ・硝酸イオンを優先的に輸送する仕組みと、その生理的役割を示唆。
- ・イオン選択フィルターとは違うイオンチャネルの新しいイオン選択の仕組みの解明に期待。

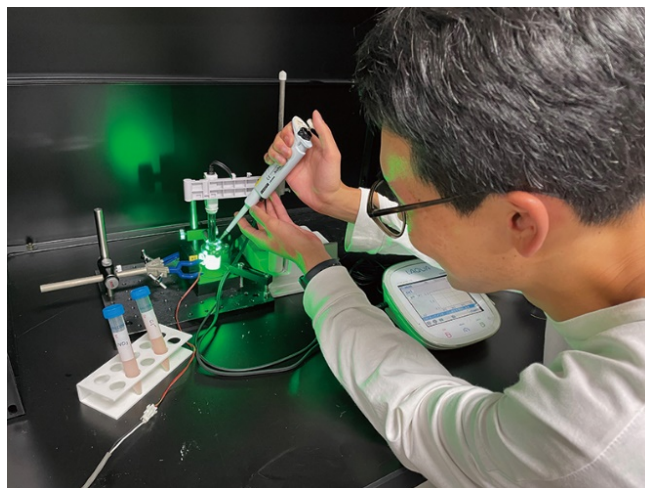
概要

北海道大学大学院生命科学院ソフトマター専攻修士課程2年の大木優也氏、同大学大学院先端生命科学研究院の塚本 卓助教らの研究グループは、全長型アニオンチャネルロドプシンが硝酸イオンを優先的に輸送すること、及びその仕組みの一端を明らかにしました。また、硝酸イオンを優先的に輸送する機能は、宿主生物（海洋藻類）が窒素源を獲得するために役立っている可能性を示唆しました。

タンパク質の基礎研究では、特定の構造を持たない末端部分を切除することが、試料安定化や遺伝子組換えによる発現量増加のための手段の一つになっています。しかし、これではタンパク質の本来の機能だけでなく、切除された部分の機能的役割を見逃すおそれがあります。本研究の対象であるアニオンチャネルロドプシン（由来生物の名前を含めて以下、*GtACR1* と表記）もまた、末端にある細胞内ドメインがその役割を検証されないまま切除された状態で、研究が行われてきました。

そこで本研究では、こうした現状を打破し、*GtACR1* の本来の機能と、細胞内ドメインの機能的役割を明らかにすることを目的に、全長型アニオンチャネルロドプシン（以下、*GtACR1_full* と表記）の機能解析を行い、これまで研究されてきた細胞内ドメインが切除された *GtACR1* との比較を行いました。その結果、*GtACR1_full* は、宿主生物の窒素源になり得る硝酸イオンを優先的に輸送すること、細胞内ドメインはその選択性を担っていることを明らかにしました。

なお、本研究成果は、2023年9月29日（金）公開の *Journal of Biological Chemistry* 誌に掲載されました。



pH電極法^{*1}により、*GtACR1_full* の陰イオン輸送活性を測定している様子

【背景】

生物の細胞は細胞膜で覆われており、細胞の内側と外側が区別されています。細胞は生きていくために、細胞の内側と外側で物質のやりとりをします。ところが、多くの物質は細胞膜をそのまま通り抜けることはできません。物質は、細胞膜に埋め込まれている膜輸送タンパク質の中を通過して、細胞の内側と外側を行き来します。膜輸送タンパク質のうち、イオンを輸送するタンパク質の一つがイオンチャンネルです。

本研究では、海に生息している藻類 *Guillardia theta* (ギラルディア・シータ) 由来で、光によって活性化し、陰イオンを輸送するイオンチャンネルである *GtACR1* を研究しました。

GtACR1 は、全長 438 個のアミノ酸から構成され、そのうちの 1 番目から 295 番目までを細胞膜に埋まっている「ロドプシンドメイン」、残りの 296 番目から 438 番目までを細胞内側に伸びている「細胞内ドメイン」(CPD と表記) と呼びます (図 1)。2015 年に *GtACR1* が初めて報告されて以降、*GtACR1* の研究ではすべて CPD が切除された状態 (*GtACR1_ΔCPD* と表記) で研究が進められてきました。タンパク質の基礎研究では、特定の構造を持たない末端部分を切除することが、試料安定化や遺伝子組換えによる発現量増加のための手段の一つになっています。

しかし、これではタンパク質の本来の機能だけでなく、切除された部分の機能的役割を見逃すおそれがあります。*GtACR1* の CPD も、特定の構造を持っていません (図 1)。そのため、CPD は機能的役割を検証されないまま切除されてきました。

そこで本研究では、こうした現状を打破し、CPD を切除していない全長型 *GtACR1* の本来の機能と、CPD の機能的役割を明らかにすることを目的に研究を行いました。

【研究手法・研究成果】

本研究では初めに、酵母 (*Pichia pastoris* SMD1168H 株) を宿主として、遺伝子組換えによって *GtACR1_full* を調製しました。遺伝子組換えの際、酵母のゲノム DNA に複数個の目的タンパク質の遺伝子を導入できる特徴を活用して、*GtACR1_full* の遺伝子組換え発現系を作成しました。その結果、*GtACR1_full* の発現を確認しました。ウェスタンブロッティング法を用いて *GtACR1_ΔCPD* の発現量と比較したところ、*GtACR1_ΔCPD* の約 1/4 の量であることが分かりました。

次に、先行研究で研究グループが考案した pH 電極法 (図 2) を用いて、*GtACR1_full* の陰イオン輸送活性を測定しました。その結果、*GtACR1_full* は *GtACR1_ΔCPD* に比べて、全体的に活性の強さは減少したものの、硝酸イオン (以下、 NO_3^-) に対する活性が突出していたことから、 NO_3^- を優先的に輸送することが分かりました (図 3)。これは、従来の *GtACR1_ΔCPD* を用いていた研究では分からなかった性質です。

さらに、高速で進むイオン輸送反応を調べることができる過渡吸収分光法を用いて、なぜ *GtACR1_full* は NO_3^- を優先的に輸送できるのかを調べました。その結果、*GtACR1_full* が NO_3^- を輸送するとき、ゲート開放状態に対応する中間体の寿命が、*GtACR1_ΔCPD* や *GtACR1_full* の Cl^- 輸送状態と比較して、有意に長くなることが分かりました。また、 Cl^- の輸送活性に対する NO_3^- の輸送活性 (比活性) も、*GtACR1_ΔCPD* に比べて *GtACR1_full* の方が有意に大きくなることも明らかになりました。

先行研究により、*GtACR1_full* をもつ *G. theta* は、窒素源が欠乏すると *GtACR1_full* の発現量を増加させることが分かっています。この結果を踏まえると、*GtACR1_full* は宿主である *G. theta* の中で、窒素源の獲得のために NO_3^- を優先的に輸送している可能性が高いと言えます。そして、 NO_3^- の優先的な輸送のためには、CPD が必要であることが分かりました。

【今後への期待】

本研究では、これまで見過ごされてきた *GtACR1_full* の本来の機能、及び CPD の役割を明らかにしました。一般的に、イオンチャネルのイオン選択性は、イオン輸送経路上にあるイオン選択フィルターと呼ばれる部位が担っています。本研究で明らかになった CPD によるイオン選択性は、イオンチャネルのイオン選択性の新しい仕組みと言えます。さらに、本研究から CPD は特定の構造をもたない天然変性領域であることも分かり、CPD によるイオン選択の仕組みの詳しい研究が必要です。

論文情報

論文名	The preferential transport of NO_3^- by full-length <i>Guillardia theta</i> anion channelrhodopsin 1 is enhanced by its extended cytoplasmic domain (全長型アニオンチャネルロドプシンの NO_3^- 優先的な輸送機能は細胞内ドメインによって促進される)
著者名	大木優也 ¹ 、篠根 司 ¹ 、猪子咲陽 ² 、須藤未羽 ² 、出村 誠 ³ 、菊川峰志 ³ 、塚本 卓 ³ (¹ 北海道大学大学院生命科学院ソフトマター専攻、 ² 北海道大学理学部生物科学科 (高分子機能学)、 ³ 北海道大学大学院先端生命科学研究院)
雑誌名	Journal of Biological Chemistry (アメリカ生化学・分子生物学会の専門誌)
DOI	10.1016/j.jbc.2023.105305
公表日	2023年9月29日(金)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院先端生命科学研究院 助教 塚本 卓 (つかもとたかし)

T E L 011-706-4475 メール t-tak@sci.hokudai.ac.jp

U R L <http://altair.sci.hokudai.ac.jp/infana/>

配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

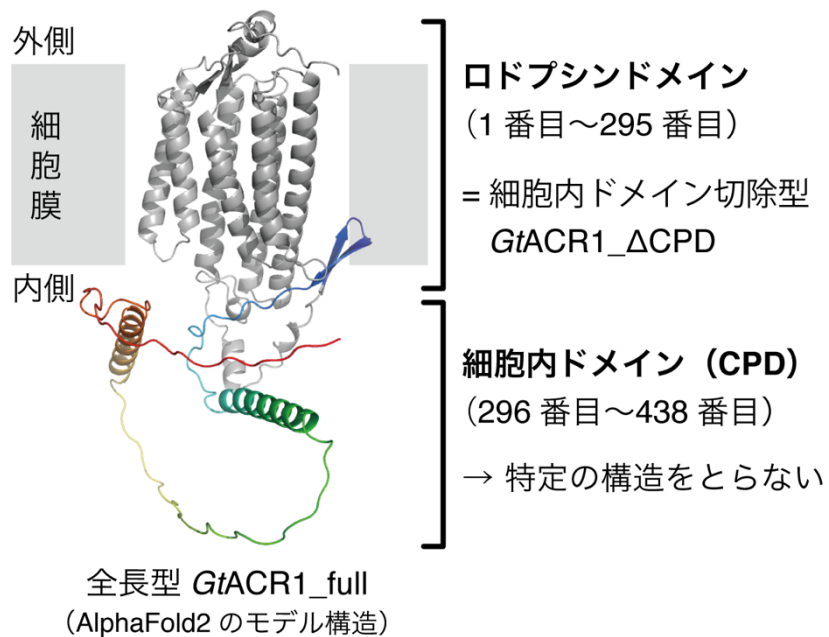


図 1. 本研究で対象としたアニオンチャンネルロドプシン (*GtACR1*) の構造モデル

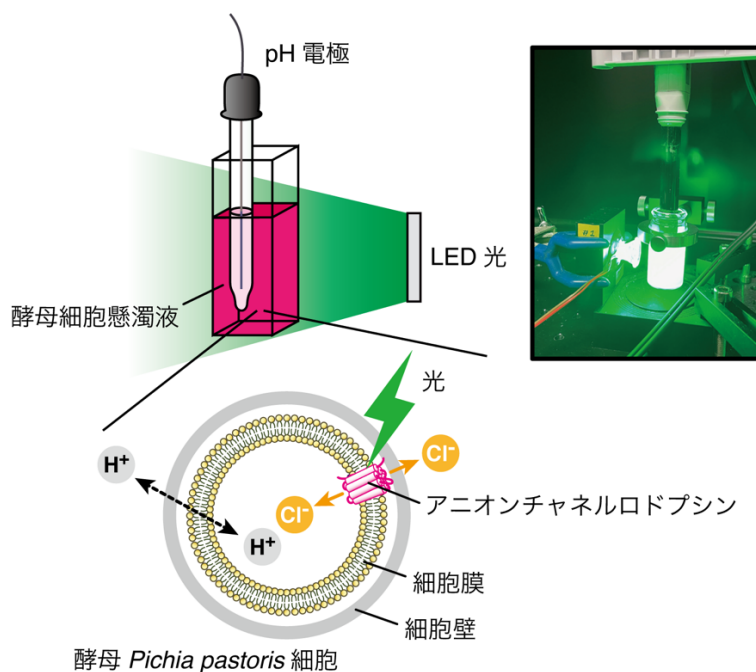


図 2. pH 電極法の概要

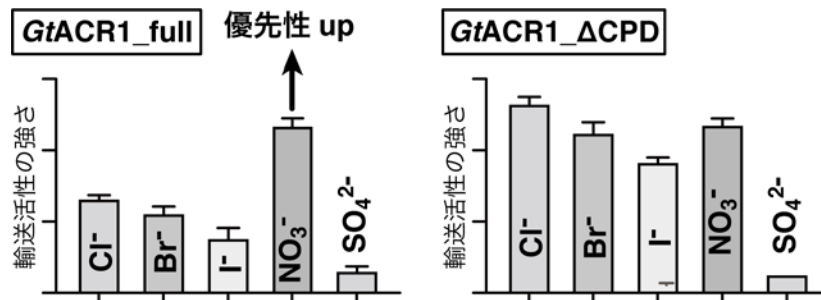


図 3. pH 電極法によるアニオンチャネルロドプシン (*GtACR1*) の陰イオン輸送活性のまとめ

【用語解説】

*1 pH 電極法 … pH 電極を使って、イオン輸送活性を測定する方法 (図 2)。この方法では、アニオンチャネルロドプシンを発現した酵母を各塩溶液 (NaF、NaCl、NaBr、NaI、NaNO₃、Na₂SO₄、アスパラギン酸 Na) に懸濁し、pH 電極を挿入する。光を当ててアニオンチャネルロドプシンが活性化すると、アニオンチャネルロドプシンを通して細胞外側から細胞内側へ陰イオンが流入する。これにより変化した細胞膜電位を補正するために、細胞外側から水素イオン (H⁺) も流入する。その結果、懸濁液の pH 変化が起こる。したがって、陰イオン輸送を pH の変化で検出できる。

イオンチャネルの輸送活性測定は、パッチクランプ法に代表される電気生理学的手法が用いられている。優れた定量性がある一方、熟練した手技と大掛かりな装置セットアップが必要なため、専門外の研究者や、もっと簡単に活性を測りたいと思っている研究者にとっては、ハードルが高い方法である。これに対して pH 電極法は、汎用されている pH 電極と光源だけの簡単な装置セットアップで、誰でも簡単に、迅速に測定できる。定量性ではパッチクランプ法には及ばないものの、スクリーニングには適している。