

光で「開く」イオンチャネルが「閉じる」仕組みを解明

～「開く」状態で強まる水素結合も捉え、開閉機構の理解へ～

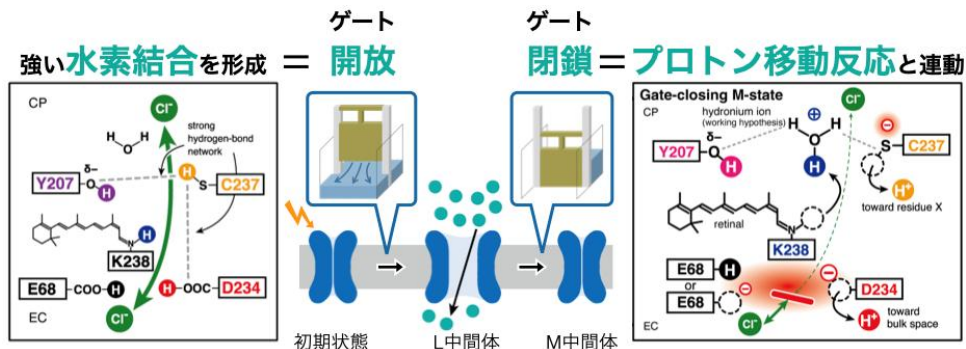
ポイント

- ・光で開くアニオンチャネルロドプシンが「閉じる」ときに起こる分子内化学反応を解明。
- ・連動したプロトン移動により、陰イオンが通りにくい電気的狀態が生じることを発見。
- ・「開く」状態で水素結合ネットワークが強まることを捉え、開閉機構の全容解明に期待。

概要

北海道大学大学院先端生命科学研究院の塚本 卓助教、名古屋工業大学生命・応用化学類の古谷祐詞准教授らの研究グループは、光で開くイオンチャネルがどのような分子内化学反応によって「閉じる」のかを明らかにしました。チャネルロドプシンは、光を受けるとイオンの通り道を開き、細胞膜を横切ってイオンを輸送する膜タンパク質です。神経活動を光で操作するオプトジェネティクスにも用いられていますが、イオンの通り道がどのような分子内化学反応によって開き、また閉じるのかには、未解明な点が多く残されていました。研究グループは、塩化物イオンなどの陰イオンを通すアニオンチャネルロドプシンである *Guillardia theta* anion channelrhodopsin 1 (*GtACR1*) を対象に、時間分解吸収分光測定^{*1}、ITO (酸化インジウムスズ) 電極を用いた電気化学的測定^{*2}、低温フーリエ変換赤外分光測定^{*3}、変異体解析を組み合わせました。その結果、ゲート閉鎖に対応する M 中間体の形成時に、イオン透過経路に沿って複数のプロトン移動反応^{*4}が連動して起こり、陰イオンが通りにくい電気的狀態が生じることが分かりました。さらに、ゲート開放に関わる L 中間体では、イオン透過経路周辺の水素結合ネットワーク^{*5}が強まることを示しました。ゲート開放は、陰イオンが実際に流れるために不可欠な過程であり、*GtACR1* のイオン輸送機能そのものに直結します。今回の成果は、ゲート開放とゲート閉鎖が共通の分子ネットワークを介して連動している可能性を示すものです。本成果は、光駆動型イオンチャネルの作動原理を、タンパク質内部で連動するプロトン移動反応と水素結合ネットワークの変化に基づいて説明するものです。微生物ロドプシンの分子機構の理解を深めるとともに、機能改変やオプトジェネティクスツール設計につながる基盤的知見となることが期待されます。

なお、本研究成果は、2026年5月12日(火)公開の *Journal of Molecular Biology* 誌にオンライン掲載されました。



GtACR1 のゲート開放・閉鎖モデル図。光を受けた *GtACR1* では、ゲート開放に関わる L 中間体で水素結合ネットワークが強まる。続く M 中間体では、複数のプロトン移動反応が連動して起こり、イオン透過経路に陰イオンが通りにくい電気的狀態が生じる。この変化が、ゲート閉鎖につながると考えられる。

【背景】

細胞膜には、イオンや小分子を細胞の内外へ輸送する膜タンパク質が存在します。これらは細胞内外の物質濃度や膜電位を調節し、生命活動を支えています。イオンチャネルはその代表例であり、イオンの通り道にある「ゲート」を開閉してイオンの流れを制御します。その機能を理解するには、ゲートがどのように開くのかだけでなく、どのように閉じるのかを明らかにする必要があります。

チャンネルロドプシンは、光を受けるとゲートを開き、細胞膜を横切ってイオンを輸送する膜タンパク質です。タンパク質内部にはレチナールと呼ばれる光受容分子が結合しており、光を吸収するとその構造が変化します。この変化を起点に、タンパク質の構造変化や内部の化学反応が連動し、イオンの通り道が開閉すると考えられています。しかし、光を受けた後に分子内部で何が起こり、それがどのようにゲート開放やゲート閉鎖につながるのかは、十分には分かっていませんでした。

アニオンチャネルロドプシンは、塩化物イオンなどの陰イオンを通すチャンネルロドプシンです。2015年にクリプト藻 *Guillardia theta* から発見され、神経活動を光で抑制するオプトジェネティクスツールとしても注目されてきました。*GtACR1* はその代表例であり、分子機構研究の重要なモデルです。

これまでの研究から、*GtACR1* は光照射後に K、L、M、N/O などの光反応中間体を形成し、ゲート開放・閉鎖が特定の間mediateへの移行過程と対応することが示唆されてきました。しかし、各過程でどのような分子内反応が起こり、それがイオンの流れの開始や停止にどうつながるのかは不明でした。本研究では、L 中間体から M 中間体へ進む過程に対応する速いゲート閉鎖過程に着目しました。

【研究手法】

研究グループは、*GtACR1* のゲート開閉に伴う分子内化学反応を明らかにするため、複数の手法を組み合わせました。まず、時間分解吸収分光測定 (図 1A) により、光照射後に形成される K、L、M などの光反応中間体の時間変化を追跡し、ゲート閉鎖に対応する M 中間体の形成と減衰を解析しました。

次に、ITO 電極を用いた電気化学的測定 (図 1A) により、*GtACR1* 外部へのプロトン放出と外部からのプロトン取り込みを時間分解的に検出しました。ロドプシンでは、M 中間体形成時に光受容部位であるレチナールシッフ塩基からプロトンが移動することが知られており、この反応がゲート閉鎖に関わる可能性が考えられていたためです。さらに、変異体解析により、プロトン移動やゲート開閉に関与するアミノ酸残基を調べました。加えて、低温フーリエ変換赤外分光測定 (図 1B、C) により、L 中間体や M 中間体を捕捉し、特定のアミノ酸残基のプロトン化状態や水素結合状態を解析しました。

これらにより、ゲート閉鎖に伴うプロトン移動反応のタイミング、反応に関わるアミノ酸残基、ゲート開放に関わる水素結合ネットワークの変化を対応づけました。

【研究成果】

本研究ではまず、*GtACR1* の速いゲート閉鎖に対応する M 中間体の形成と、*GtACR1* 外部へのプロトン放出が同じタイミングで起こることを見出しました (図 1A)。さらに、ゲート閉鎖が遅い変異体では M 中間体形成とプロトン放出も遅くなり、ゲート閉鎖が速い変異体ではこれらの反応も速くなりました。この結果から、速いゲート閉鎖は M 中間体形成に伴うプロトン移動反応と密接に結びついていることが示されました。

次に、M 中間体形成時に起こるプロトン移動反応の実体を調べました。その結果、Asp234 から *GtACR1* 外部へのプロトン放出 (図 1B)、光受容部位であるレチナールシッフ塩基の脱プロトン化、Cys237 の脱プロトン化 (図 1C) という複数の反応が連動して起こることが分かりました。これらの反応によってイオン透過経路に沿って負の電荷が生じ、同じく負の電荷を持つ陰イオンの通過を妨げ

る方向に働くと考えられます。すなわち、*Gt*ACR1 の速いゲート閉鎖は、単なる構造変化ではなく、プロトン移動反応によるイオン透過経路の電気的性質が変化することで実現されると考えられます。

さらに、レチナルシッフ塩基から移動したプロトンを直接受け取る分子、すなわちプロトン受容体についても調べました。従来、このプロトン受容体として Glu68 や Asp234 が候補に挙げられていました。しかし本研究では、これらの残基をプロトン受容に参与しにくい形に置換した変異体でも M 中間体が形成されることを示し、従来仮説の見直しが必要であることを示しました。そこで、ほかにプロトン移動に参与する部位がないかを調べたところ、レチナルシッフ塩基近傍の Tyr207 及び Cys237 が、レチナルシッフ塩基の脱プロトン化に参与することが分かりました。直接のプロトン受容体の正体は未解明ですが、本研究では、レチナルシッフ塩基近傍の水分子が参与する可能性を提案しています。

また、ゲート開放に関わる L 中間体についても重要な知見が得られました。低温赤外分光測定により、L 中間体では Cys237 が脱プロトン化せず、プロトン化状態を保ったまま水素結合を強めることが分かりました。この結果は、ゲート開放に対応する状態で Cys237 周辺の水素結合ネットワークが再編成され、より強い相互作用を形成することを示しています。このネットワークには、Cys237 に加えて Tyr207 や Asp234 も参与している可能性があります (図 1C)。

さらに、Tyr207、Asp234、Cys237 をそれぞれ置換した変異体では、塩化物イオン輸送機能が低下しました。このことは、これらの残基を含む水素結合ネットワークが、ゲート閉鎖だけでなくゲート開放にも重要であることを示しています。今回の結果は、ゲート開放の仕組みを直接すべて説明するものではありませんが、イオン輸送機能に直結するゲート開放過程で変化する分子ネットワークを示した点で、開閉機構の全体像を解き明かす重要な手がかりになります。

【今後への期待】

本研究により、*Gt*ACR1 の速いゲート閉鎖は、Asp234 からのプロトン放出 (図 1B)、Cys237 の脱プロトン化 (図 1C)、レチナルシッフ塩基の脱プロトン化を含む複数のプロトン移動反応によって制御されることが明らかになりました。また、ゲート開放に関わる L 中間体では、Cys237 周辺の水素結合ネットワークが強まることが示されました (図 1C)。

これらの成果は、*Gt*ACR1 のゲート開放とゲート閉鎖を、同じ分子ネットワーク上で連動する一連の反応として理解する道筋を示すものです。一方で、ゲート開放時に強まる水素結合ネットワークがイオン透過経路の形成にどう寄与するのか、またレチナルシッフ塩基や Cys237 から移動したプロトンを直接受け取る分子の正体は、今後の課題です。本研究では、少なくともレチナルシッフ塩基からのプロトン移動について、近傍の水分子が参与する可能性を提案しています。

今後、同位体置換実験、さらなる時間分解分光解析、構造解析、変異体解析を進めることで、ゲート開放からゲート閉鎖に至る分子機構の全体像が明らかになると期待されます。これは、アニオンチャンネルロドプシンが光エネルギーをどのようにイオン輸送機能へ変換しているのかという、タンパク質機能の本質的理解につながります。

また、アニオンチャンネルロドプシンは、オプトジェネティクスにおいて神経活動を光で抑制する重要な分子ツールとして利用されています。本研究で得られた知見は、光応答速度、開閉寿命、イオン輸送機能、イオン選択性を制御するための基盤情報となり、将来的には新たな光操作ツールの設計にもつながる可能性があります。

【謝辞】

本研究は、JSPS 科研費 JP18KK0194、JP22K06120、JP23K23843、JP23K05675、JP21H04969、秋山記念生命科学振興財団、文部科学省共同利用・共同研究システム形成事業「大学連携研究設備ネットワークによる研究基盤強化プログラム (CURE)」JPMXP1323015482、科学技術振興機構 (JST) CREST JPMJCR25B5 の助成を受けたものです。

論文情報

論文名 Proton-Coupled Gate Closing Mechanism in *Guillardia theta* Anion Channelrhodopsin 1
(*Guillardia theta* 由来アニオンチャンネルロドプシン 1 におけるプロトン共役型ゲート閉鎖機構)

著者名 須藤美羽^{1,†}、猪子咲陽^{2,†}、伊藤侑真^{3,†}、渡邊拓真^{2,†}、出縄ありさ¹、大木優也¹、小川景子²、出村 誠^{1,2,4}、神取秀樹^{3,5}、菊川峰志^{1,2,4}、古谷祐詞^{3,5,*}、塚本 卓^{1,2,4,*} (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専修、³名古屋工業大学大学院工学研究科、⁴北海道大学大学院先端生命科学研究院、⁵名古屋工業大学オプトバイオテクノロジー研究センター、[†]共同筆頭著者、^{*}責任著者)

雑誌名 Journal of Molecular Biology (分子生物学の専門誌)

D O I 10.1016/j.jmb.2026.169856

公表日 2026年5月12日(火)(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 <https://altair.sci.hokudai.ac.jp/infana/>

名古屋工業大学生命・応用化学類 准教授 古谷祐詞 (ふるたにゆうじ)

T E L 052-735-5127 F A X 052-735-5127 メール furutani.yuji@nitech.ac.jp

U R L <https://biophys-molsci.web.nitech.ac.jp/index.html>

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

名古屋工業大学企画広報課 (〒466-8555 名古屋市昭和区御器所町)

T E L 052-735-5647 メール pr@adm.nitech.ac.jp

【参考図】

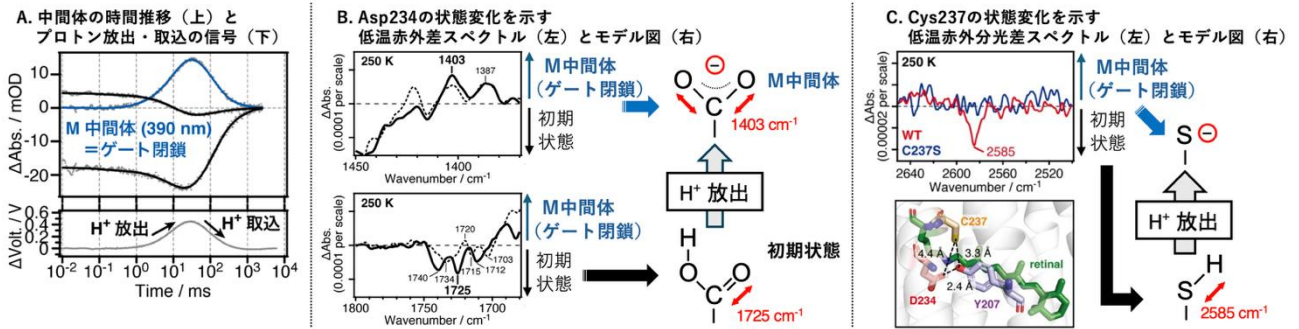


図 1. *GtACR1* のゲート閉鎖に伴って起こる主要なプロトン移動反応。(A)ゲート閉鎖状態に対応する M 中間体の生成 (上図) と同期して Asp234 からのプロトン放出が起こる (下図)。(B) M 中間体を捕捉した低温赤外分光測定から、Asp234 のプロトン化状態が明らかになった。(C) 同様に、Cys237 のプロトン化状態も変化することが明らかになった。また、ゲート開放状態に対応する L 中間体では、Cys237 を中心に Asp234 及び Tyr207 との水素結合が強まることが示唆された (左下図)。

【用語解説】

- * 1 時間分解吸収分光測定 … 光を当てた後のタンパク質の吸収スペクトルの変化を、時間分解的に測定する方法。本研究では、*GtACR1* が光を受けた後に形成する反応中間体の時間変化を調べた。
- * 2 ITO (酸化インジウムスズ) 電極を用いた電気化学的測定 … ITO は酸化インジウムスズのことで、透明で電気を通す性質を持つ。ITO 電極を用いることで、タンパク質外部へのプロトン放出や外部からのプロトン取り込みを検出できる。
- * 3 低温フーリエ変換赤外分光測定 … 低温条件でタンパク質の反応中間状態を捕捉し、赤外吸収スペクトルから分子の化学的状态を調べる方法。本研究では、L 中間体や M 中間体における水素結合状態やアミノ酸残基のプロトン化状態を解析するために用いた。
- * 4 プロトン移動反応 … 水素イオン、すなわちプロトンが、タンパク質内部のアミノ酸残基や水分子の間で受け渡される反応。ロドプシンの機能発現に重要な役割を果たす化学反応の一つ。
- * 5 水素結合ネットワーク … タンパク質内部で、アミノ酸残基や水分子が水素結合によって連結した構造。ロドプシンでは、光を受けた後の構造変化やプロトン移動反応と密接に関わり、機能発現に重要な役割を果たす。