

藻類学最前線



吉川伸哉：クラミドモナスで発見された古細菌型ロドプシンと光信号伝達

単細胞緑藻クラミドモナスには光の方向性を感じて遊泳方向調節する走光性反応と、光強度の変化を感じ一瞬の遊泳停止とその直後の遊泳方向の転換を伴う光驚動反応が見られる。この両方の反応において、クラミドモナスは私達ヒトと同様に発色団レチナール（ビタミンAアルデヒド）を使って光の強さや方向を“見ている”。ここでは最近分子的な実体が急速に明らかになりつつあるクラミドモナスの光受容体について紹介します。

クラミドモナスの遊泳における光応答反応

クラミドモナスを光学顕微鏡で観察すると、眼点と呼ばれるオレンジ色に見えるカロチノイドを多く含んだ小点が葉緑体の端に確認できる。しかし、眼点は光受容体ではなく光受容体の遮蔽あるいは光受容体への集光機能を持つとされ、光受容体は眼点近傍の細胞膜中に存在すると言われている（図1）。クラミドモナスの細胞を2次元的に見ると、眼点は細胞の片側にあり光受容体が隣接している。光受容体と逆方向からの光は、葉緑体と眼点に遮蔽されるため、光受容体に到達しづらくなる。一方、光受容体の方向からの光は、直接光受容体に吸収されるだけでなく、眼点の反射板としての作用により光受容体周辺を透過した後、再び光受容体に集められる。この光受容体と、眼点、葉緑体の位置関係によりクラミドモナスは光の方向を認識すると言われている。

細胞が光を感じて遊泳方向を変化させるためには、光受容体で受けた光刺激が信号伝達経路を介して鞭毛運動を調節する必要がある。クラミドモナスでは光刺激受容後に眼点に隣接する細胞膜を経て細胞内に Ca^{2+} が流入し、内向きの電流（光受容体電流）が生じる⁽¹⁾。

Spudichのグループは、光受容体電流の解析から、光照射後30 μ 秒以内に生じる速い反応系と光照射後数百 μ 秒の潜伏期を経て生じる遅い反応系の2つの異なった光信号伝達系が存在すると主張している⁽²⁾。光受容体電流は鞭毛打を調節し、細胞の遊泳方向を変化させることにより走光性反応に関与する。また光受容体電流が一定の閾値を超える時は、鞭毛膜に存在する電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} の流入（鞭毛電流）が引き起こされ、脱分極により急激に鞭毛打が変化し、光驚動反応を起すとされている。

クラミドモナスにおけるロドプシンの研究

ロドプシンと言うと一般的にはヒトなどの網膜を構成する視細胞に含まれる物質が連想される。しかし生物界全体を見渡すとロドプシンは2つのグループに分けられ、動物の視細胞に含まれるType IIロドプシンと、約30年前に好塩性古細菌で発見されたType Iロドプシン（古細菌型ロドプシン）からなる。Type Iロドプシンは、最近真正細菌や藻類・菌類などの真核生物からも遺伝子が発見されている。Type IロドプシンとType IIロドプシンは、レチナールを発色団として持つこと、7回膜貫通型のヘリックス構造を持つこと、レチナールが7番目のヘリックスの中間にあるリジン残基と結合することにおいて共通性が見られる。しかしType Iロドプシンでは、レチナールのオールトランス型から13-シス型への光異性化が、Type IIロドプシンでは11-シス型からオールトランス型への光異性化が光受容初期反応であることの大きな違いがあり、またType IロドプシンとType IIロドプシンとは、タンパク質の1次構造上の類似性が見いだせない。従って、Type IとType IIロドプシンが分子進化的にどのような繋がりがあがるかは、興味深い課題である。

クラミドモナスの走光性反応と光驚動反応の光受容体はその作用スペクトルからレチナールを発色団として持つロドプシンであることは予測されていた。Fosterらによる光感受性が低いカロチノイド合成変異株にレチナールアナログを取り込ませると光感受性が野生型と同程度まで回復することを示す実験から、走光性反応にレチナールが関与することが示唆された⁽³⁾。その後の独立した3つのグループ（高橋, Hegemann, Spudich）によりレチナールアナログを用いた解析が行なわれ、クラミドモナスの走光性反応および光驚動反応は、オールトランス型レチナールから13-シス型への光異性化を伴うことが示され、クラミドモナスのロドプシンはType Iロドプシンに類似することが予測された⁽⁴⁻⁶⁾。

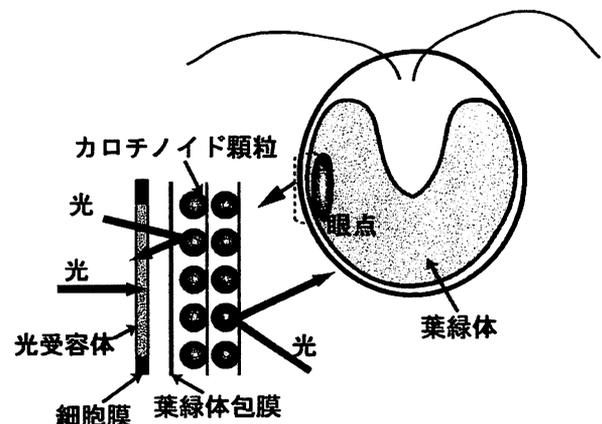


図1. クラミドモナスの眼点の位置と、眼点による光の遮断と集積の仕組み。カロチノイドを主成分とする顆粒は、光受容体の反対方向からの光に対して遮蔽効果を示すとともに、光受容体を通じた光に対しては1/4反射板として作用し、再び光受容体に光を集める。

クラミドモナスにおけるロドプシンの発見

1995年にHegemannのグループはクラミドモナスの眼点部分を含む膜分画から、 ^3H で放射標識したレチナルに結合するタンパク質を同定し、その遺伝子の塩基配列を決定した。そのタンパク質はレチナル結合能をもつこと、分子質量(約30 kDa)が既知のロドプシに近いこと、眼点近傍に局在すること、さらにわずかではあるが動物のType IIロドプシに類似したアミノ酸配列を持つことから、“Chlamyrodopsin”と名付け、走光性反応、光驚動反応の光受容体であると主張していた⁽⁷⁾。しかし、2001年に同じHegemannのグループにより、RNA干渉を用いた発現抑制実験から、“Chlamyrodopsin”は走光性反応や光驚動反応には関与せず、真の光受容体は他に存在することが示唆された⁽⁸⁾。

2000年から公開が開始された、かずさDNA研究所のクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) EST (Expressed Sequence Tag) 解析のデータベース中に、Type I (古細菌型)ロドプシと類似する部分配列が見いだされたことが契機となり、2002年から2003年にかけてSpudich, Hegemann, 高橋の3つの研究グループから同一のType Iロドプシが相次いで報告された⁽⁹⁻¹²⁾。各グループが独立して遺伝子を登録したため2種類の古細菌型ロドプシは、CSOA, CSOB (*Chlamydomonas sensory opsin A, B*)とchannelopsin-1, channelopsin-2, ならびにAcop-1, Acop-2 (Archaeal type *Chlamydomonas opsin-1, -2*)の3つの異名を持つこととなった。ここでは混乱を避けるため、Acopに統一して紹介する。クラミドモナスで新しく発見されたAcop-1, 2の遺伝子はそれぞれ712, 737残基のアミノ酸配列をコードしており、既知のType Iロドプシ(約260-280アミノ酸残基程度)と比べると明らかに大きい。Acop-1, 2ともにN末側にある約300残基のType Iロドプシと共通性のあるアミノ酸配列に加え、C末側領域に約400残基の機能未知のアミノ酸配列を含んでいた。Type Iロドプシと類似性のある領域では7箇所の膜貫通ヘリックス構造が予測され、発色団と相互作用するアミノ酸残基がよく保存されていた。

高橋のグループは、光受容体が存在すると考えられていた

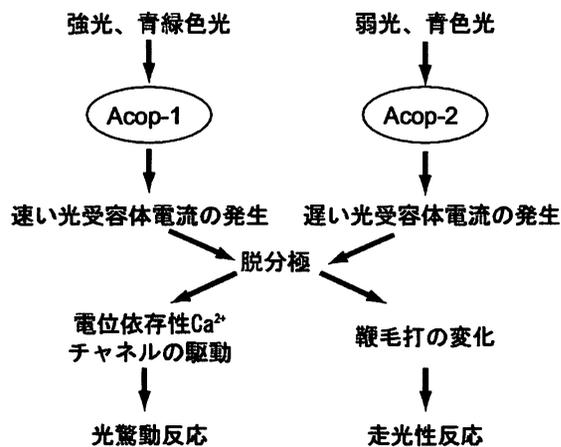


図2. Spudichらが提案している光受容体Acop-1, -2と光信号伝達経路の関係。参考文献(9)。

眼点近傍にAcop-1が局在することを明らかにすると共に、ホモロジーモデリングによるヘリックス予測に基づきAcop-1, 2の2番目の膜貫通領域に親水性のアミノ酸であるグルタミン酸が多い特徴に着目し、膜貫通領域において分子内あるいは分子間の相互作用が存在する可能性を主張している⁽¹²⁾。

Spudichのグループは、RNA干渉を用いAcop-1, 2それぞれの発現制御からAcop-1, 2と光受容体電流の相関性を検討している^(9, 13)。クラミドモナス細胞ではAcop-1とAcop-2の発現量は互いに干渉しており、Acop-1の発現量を抑制するとAcop-2リッチな細胞が得られ、反対にAcop-2の発現量を抑制するとAcop-1リッチな細胞が得られる。Spudichのグループは、これらの細胞を用いた実験から以下のことを主張している。2つの光受容体電流、速い光受容体電流と遅い光受容体電流は、それぞれ異なった光受容体の下流に存在し、Acop-1は500-510 nm (青緑色)の光に感受性のピークをもつ強光反応の光受容体として速い光受容体電流を制御する。一方Acop-2は460-470 nm (青色)の光に感受性のピークをもつ弱光反応の光受容体として光刺激後数百 μ 秒の潜伏期を経て生じる遅い光受容体電流を制御する。従って、Acop-1はそれ自身がイオンチャネルとして直接的に光受容体電流を制御し、Acop-2は他の分子との相互作用を経て光受容体電流を制御すると考えられる。つまり、2つの光信号伝達経路は共に膜の脱分極を介し、走光性反応、光驚動反応の双方に作用しうるが、通常の生理条件下ではAcop-1を光受容体とする系は強光回避の光驚動反応に関与し、Acop-2を光受容体とする系は光の方向を感知する走光性反応に関与すると言える(図2)。しかし、Spudichのグループの実験から、Acop-1リッチな細胞とAcop-2リッチな細胞では、光感受性や光受容体電流が異なっていることは示されたものの、走光性反応や光驚動反応を完全に失う、もしくは光感受性が顕著に低下するような結果は示されておらず、細胞内でのAcopの機能分化に関してはまだ議論の余地がある。

Hegemannのグループはゼノパス卵母細胞を用いたAcop遺伝子の異種発現を行い、Acop-1, 2がそれ自身でイオンチャネルとして機能しうることを明らかにした。Acopは7回膜貫通領域だけでイオンチャネルとして機能しており、光により膜貫通領域の構造が変化しイオンを通過させると考えられる。彼等は、Acop-1は H^+ を選択的に透過させるため光依存性 H^+ チャネル⁽¹⁰⁾、Acop-2は H^+ 以外に陽イオンに対して幅広い透過性があり Li^+ , Na^+ , K^+ や Ca^{2+} などを通過させるため光依存性陽イオンチャネルと定義している⁽¹¹⁾。ゼノパス卵母細胞と同様にAcop-1, 2がクラミドモナス細胞内でもイオンチャネルとして機能しているのであれば、Acop-1, 2の両方が光受容体電流の発生に直接関わることとなる。また、Acop-1, 2は共に直接的に光受容体電流を制御し、Acopにより起される電位変化が電位依存性の Ca^{2+} チャネルを刺激し光受容体電流が生じると述べている。このようにAcopがイオンチャネルであるという解釈は、ロドプシによる光受容と光受容体電流を直接的に結び付けるものではあるが、上述したSpudichのグループの実験結果や、これまでの電気生理学的な研究から得

られている光受容体電流のイオン透過性において齟齬が見られる。これまで光受容体電流にCa²⁺流入が関与するとされてきたが、Hegemannのグループの考えが正しければCa²⁺流入の前にH⁺イオンの流入が起こることとなる。しかしながら、クラミドモナスは細胞外液のpHが4以下では光によるH⁺流入が確認されたものの、生理条件下のpHではH⁺の流入による光受容体電流の発生は確認されていない⁽¹¹⁾。Acop-1, 2のイオンチャネルとしての機能は、卵母細胞だけでなく哺乳類の培養細胞でも確認されているため、Acop分子が単独で存在する場合のイオンチャネル特性はHegemannのグループの実験結果^(10, 11)に疑いの余地は無いが、クラミドモナスの細胞におけるAcop本来の分子機構については、細胞内に存在する他の分子との相互作用などについても精査する必要がある。今後Acopノックアウト株を使った光受容と光受容体電流の信号伝達の研究と、大量発現させたAcop分子を用いた分光学的、構造学的な解析を包括的に組み合わせることにより、クラミドモナスの“光を見る”仕組みが見えてくるのではないだろうか。

最近になり、古細菌型のロドプシンは真核藻類において、クラミドモナスだけでなく渦鞭毛藻類やクリプトモナス(クリプト藻類)でも発見されている⁽¹⁵⁾。系統の異なる藻類で見つかっているロドプシン分子の類縁関係や、クラミドモナスと同様に走光性反応における光受容体であるか、イオンチャネルとしての機能を持っているのかなど、真核藻類のロドプシンの研究には興味深い話題が多く残されている。

参考文献

(1) Harz, H. & Hegemann, P. 1991. *Nature* 351: 489-491.

- (2) Sineshchekov, O.A. & Spudich, J.L. 2005. In *Hand book of Photosensory Receptors*. 25-42.
- (3) Foster, K.W., Saranak, J., Patel, N., Zarilli, G., Okabe, M., Kline, T. & Nakanishi, K. 1984. *Nature* 311: 756-759.
- (4) Takahashi, T., Yoshihara, K., Watanabe, M., Kubota, M., Johnson, R., Derguini, F. & Nakanishi, K. 1991. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178: 1273-1279.
- (5) Hegemann, P., Geartner, W. & Uhl, R. 1991. *Biophys. J.* 60: 1477-1489.
- (6) Lawson, M.A., Zack, D.N., Derguini, F., Nakanishi, K. & Spudich, J.L. 1991. *Biophys. J.* 60: 1490-1498.
- (7) Deininger, W., Kröger, P., Hegemann, U., Lottspeich, F. & Hegemann, P. 1995. *EMBO J.* 14: 5849-5858.
- (8) Fuhrmann, M., Stahlberg, A., Govorunova, E. Simone, R. & Hegemann, P. 2001. *J. Cell Sci.* 114: 3857-3863.
- (9) Sineshchekov, O.A., Jung, K-H. & Spudich, J.L. 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 8689-8694.
- (10) Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S. Musti, A. M. Bamberg, E. & Hegemann, P. *Science* 296: 2395-2398.
- (11) Nagel, G., Szellas, T. Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Olling, D., Hegemann, P. & Bamberg, E. 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 13940-13945.
- (12) Suzuki, T., Yamasaki, K., Fujita, S., Oda, K., Iseki, M., Yoshida, K., Watanabe, M., Daiyasu, H., Toh, H., Asamizu, E., Tabata, S., Miura, K., Fukuzawa, H., Nakamura, S. & Takahashi, T. 2003. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301: 711-717.
- (13) Govorunova, E.G., Jung, K-H., Sineshchekov, O.A. & Spudich, J.L. 2004. *Biophys. J.* 86: 2342-2349.
- (14) Ehlenbeck, S., Gradmann, D., Braun, F-J. & Hegemann, P. 2002. *Biophys. J.* 82: 740-751.
- (15) Marin, I. & Ruiz-Gonzales, M.X. 2004. *J. Mol. Evol.* 58: 348-358.

(福井県立大学)