

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K19630

研究課題名（和文）経頭蓋非侵襲光刺激を可能とする光遺伝学ツールの探索

研究課題名（英文）Exploring optogenetic tools that enable transcranial noninvasive photostimulation.

研究代表者

富岡 寛顕 (Tomioka, Hiroaki)

埼玉大学・教育学部・教授

研究者番号：50212072

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：2005年に報告され瞬く間に全世界に広まった光遺伝学的手法の根幹をなす光遺伝学のツールとしては微生物ロドプシンが用いられ、新規のもの選抜や変異体作成により改善が図られてきた。本研究は、新規のツールになりうる微生物型ロドプシンを求めて自然界、特に極限環境を探索するものである。高塩濃度環境からは有望な株は得られなかったが、別種の極限環境が有望であることを示唆するデータを得たので、候補地を絞り試料採取に成功した。有色の有望コロニーを3個得て、内2株はゲノム解析に成功した。微生物型ロドプシンと推測されるアミノ酸配列は既報のものとは異なるが、期待できるような新規機能はなかった。今後とも継続していきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

20年程前に開発された光遺伝学は遺伝学的手法と光による操作を組み合わせた細胞操作の手法である。標的とした神経細胞でツールと呼ばれる光感受性のイオン輸送タンパク質を発現させ、その細胞の膜電位を光で自在に操作することで細胞を操作するものである。本研究はこれまでは報告されていないタイプの光感受性のイオン輸送タンパク質を得るために自然界の中でも極限環境と呼ばれる環境から新規の微生物を得て、そこから新規のタンパク質のアミノ酸配列を得ようとするものである。これまでに報告のない新規の膜タンパク質を得ることで新しい方向性の光遺伝学の展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：A novel optogenetic method was first implemented in 2005. It is becoming a crucial technique in neural science. Microbial rhodopsins are used as optogenetic tools for optical control of electrical activity in target cells. The toolbox has expanded by selection and engineering. This research is to explore the natural world, especially extreme environments, in search of microbial rhodopsins that can serve as novel tools. Although we were unable to obtain promising strains from the high salt concentration environment where was one of our initial targets, we obtained bacterial samples from another extreme environments. Three colored colonies were selected and analyzed the genomes. The nucleotide sequences of two of the strains were successfully determined. The amino acid sequences presumed to be the microbial rhodopsins were different from the previously reported ones but did not show new functions. Isolation methods was improved and can be utilized in our future researches.

研究分野：ブレインサイエンス

キーワード：光遺伝学 脳科学 微生物ロドプシン 光受容蛋白質 イオンチャネル イオンポンプ 膜電位 イオン輸送

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1．研究開始当初の背景

微生物ロドプシンの研究は高度好塩性古細菌の一種、*Halobacterium salinarum* が持つロドプシンから始まった。紫色を有する細胞膜断片から、細胞外向きに H⁺ を輸送する光駆動ポンプであるバクテリオロドプシンが 1971 年に発見、続いて変異株の研究から細胞の内向きに Cl⁻ を輸送する光駆動ポンプであるハロロドプシンが 1977 年に見い出された。その後 *H. salinarum* の示す走光性のうち、光に集まる正の走光性の光受容体としてセンサーロドプシンが 1982 年に報告され、負の走光性のみを示す変異株の研究から、その受容体であるフォボロドプシンが 1985 年に発見された（実施者が発見命名）。フォボロドプシン発見の頃から *H. salinarum* 以外の高度好塩性の古細菌を自然界から単離し、その中のロドプシンの研究が行われるようになった。そして 1999 年以降、多くのゲノムプロジェクトにより多岐にわたる生物種、即ち真核生物ではカビや藻類、原核生物では古細菌だけでなく真正細菌も微生物ロドプシンを有することが配列の相同性から分ってきた。2002 年以降、光開口型陽イオンチャネルであるチャネルロドプシンも藻類から発見された。このような 40 年を超える微生物ロドプシン研究の成果を受け、光遺伝学は勃興してきた。日本では光遺伝学の応用の成果ばかりが報じられるが、この手法自体が発展途上で、より良いツールの開発が最も重要であることを光遺伝学の創始者達はよく理解しており、ツールの開発研究は精力的に行われている。申請者は自然界から高度好塩性の古細菌を単離し、新規の微生物ロドプシンの性質を調べてきた。2014 年に、それらの中から 2 種のハロロドプシン、SharkHR と PortHR が、光遺伝学の創始者の一人である MIT の E. S. Boyden 教授のグループによって神経細胞抑制ツールのスクリーニングにかけられた。SharkHR は従来のものより長波長の光でも強い光電流を示すことが分ったため、その二重変異体 (K206R, W214F) とし、その変異体に局在を見るための GFP と膜移行配列を加えたもの作り Jaws という名前を付けた。Jaws は従来の抑制ツールの 3 倍の光電流を示し、赤色光 (632 nm) でも十分な電流をもたらす。そして色素性網膜炎病態モデルマウスの網膜の錐体細胞で Jaws を発現させ、強い光反応を起こすことにも成功し、治療の可能性も示した。

2．研究の目的

光遺伝学の開始以降種々の微生物ロドプシンが用いられ、吸収の長波長化、光反応時間短縮、光感受性向上、発現量上昇、膜移行量の向上が変異体作成等により図られてきたが、特に吸収の長波長化に関しては変異体作成の限界が改めて認識され、新規のロドプシンを積極的に自然界に求める研究が行われるようになってきた。Jaws よりさらに長波長に吸収を持ち且つ光誘起電流も大きい光遺伝学の抑制ツールとしての新規ロドプシンの自然界からの探索を本研究の目的とする。SharkHR よりさらに長波長に吸収を持つ HR が得られると、組織のより深いところまで到達可能な赤色光によりツールの光励起が可能となる。現在は頭蓋骨を切開して光ファイバーから光照射を行っているが、切開することなく経頭蓋無侵襲光抑制への道を開く可能性を秘めている。

3．研究の方法

これら shark 株と port 株は実施者が天日塩中から通常の方法とは異なる独自の方法で単離し

た株である。その方法で同時期に単離した有望株は十株で、内二株の HR が長波長に吸収を持っていた。つまり 20% という確率で、長波長を吸収且つ大きな電流を示す HR を有する株を単離したことになる。この極めて高い確率をもたらした方法を用いて、多くの天日塩の中から高度好塩性の古細菌を単離し、その中の HR を調べることから始める。申請者が 30 年以上の経験の中で確立してきた方法でスクリーニングを行い、有望な株が得られたら、その株を培養、細胞破碎を行い、細胞膜分画の懸濁液を用いて分光学的測定により、吸収極大波長 (λ_{max}) とフォトサイクルの速度を求める。HR は光を受容するとフォトサイクルを回りその一回転中に塩素イオン一個を細胞外から内へ運ぶ。HR が起こす光誘起電流はイオンポンプの速度に依存し、その速度が速いほど光誘起の電流量は大きくなると考えられるので、速度が速く且つ λ_{max} の大きいものを選抜する。その後、必要に応じて細胞膜からの安定な可溶化剤の選択を試み、濃縮法や精製法も検討し、可能であれば、より正確な λ_{max} を求める。高度好塩菌の株中での発現量が少なかったり、他のロドプシンとの分離が困難であるなど、さらなる検討が困難な場合は、PCR により塩基配列の情報を得て、コドンの最適化をした遺伝子を人工合成し、ベクターに組み入れ、大腸菌での発現を試みる。塩基配列の情報を得ることで蛋白質のアミノ酸配列が得られたならば、その配列を従来のものと比較することで長波長化に關与するアミノ酸残基の推測ができる可能性がある。大腸菌での発現も成功しているならば、長波長化關与のアミノ酸の変異体作成も試みる。

4. 研究成果

極限環境の一つである高塩濃度から有望な株は得ることができなかったが、その過程の中であまり着目されてこなかった別種の極限環境から新規のツールを得られる可能性があることを示唆するデータを得たので、その極限環境の候補地を絞り込み試料採取に成功した。有色の有望コロニーを 3 個得て、ゲノム解析を試みた。内 2 株はゲノム解析に成功した。

菌株 1

抽出高分子ゲノム DNA を用いてのナノポアシーケンサー GridION によるシーケンシング時にナノポアが急速に死滅してしまい、ゲノム解析成功には至らず微生物ロドプシンのアミノ酸配列を得ることができなかった。

菌株 2

高分子ゲノム DNA の抽出も標準的な方法で順調に進み、シーケンシングに十分な質と量の DNA が得られたのでナノポアシーケンサー GridION によるシーケンシングを行った。アセンブルに必要な十分なリード数が得られていることが確認でき、de novo シーケンスアセンブラ Unicycler を用いてアセンブルを行った。他の菌の汚染などが無いことを blobtools により確認後、念のためアセンブルの特性によりごくわずかに出現する塩基置換やわずかな挿入/欠失を除くために polishing を行った。この polishing 作業では合計 21 部位の修正がなされた。さらなるアセンブルエラーがないかを調べたところエラー疑いのある部位は検出されず、全ゲノム配列を確定した。最終的な chromosome 配列の長さは 2,849,403-bp、plasmid 配列の長さは 2,350-bp であった。構築した chromosome 全長配列(dna)をクエリにして NCBI nr データベースへの blastn 解

析を行ったところ *Exiguobacterium mexicanum* strain A-EM 他いくつかの *Exiguobacterium* 属のゲノム配列と 84 %前後の塩基配列同一性を示した。互いに存在していない領域が多数見られた。ゲノムの順番が変わるようなりアレンジメントは観察されなかった。通常は ANI が 84.3 %と進化的に離れると大きな組み換えが起こり遺伝子の並びが変化するがそれが観察されず極めて特徴的であった。これらの結果はバクテリアのシーケンシングであり、データベースに無い新しい菌株のシーケンシングであることを示していた。DDBJ のアノテーションパイプライン DFAST を使い自動アノテーションを実施した。その結果、2873 の cDNA、27 の rRNA 遺伝子、67 の tRNA 遺伝子が検出された。

菌株 2 のアノテーションにより開始位置 939,180 終了位置 939,926 の 747 bp にバクテリオロドプシン様のタンパク質のコード領域が一つ見出された。248 アミノ酸残基から成り、分子量は 27.5 kDa であった。アミノ酸配列の特徴から膜 7 回貫通型のイオンポンプであることが推測され、特に機能に重要な 3 残基は DTK であり、レチナル結合位置を含む前方 5 残基は DLINK であり、これは H⁺ポンプ機能を有する微生物ロドプシンに特有のものであった。

菌株 3

高分子ゲノム DNA の抽出も標準的な方法で順調に進み、シーケンシングに十分な質と量の DNA が得られたのでナノポアシーケンサー GridION によるシーケンシングを行った。アセンブルに必要な十分なリード数が得られていることも確認でき、De bruijn graph を使ったアセンブラ Unicycler を用いて de novo アセンブルを実行した。他の菌の汚染などが無いことを blobtools により確認後、念のためアセンブラの特性によりごくわずかに出現する塩基置換やわずかな挿入/欠失を除くために polishing を行った。2 回の polishing により合計 124 部位の修正がなされた。さらなるアセンブルエラーがないかを調べたところエラー疑いのある部位は検出されず、全ゲノム配列を確定した。最終的な chromosome 配列の長さは 3,884,792-bp、5 種の plasmid 配列の長さは各々 191,973-bp、164,671-bp、29,671-bp、11,530-bp であった。構築した chromosome 全長配列 (dna) をクエリにして NCBI nr データベースへの blastn 解析を行ったところ *Sphingomonas taxi* strain ATCC55669 他いくつかの *Sphingomonas* 属のゲノム配列と 80 %前後の塩基配列同一性を示した。菌株 2 とは異なりこの株ではゲノムのリアレンジメントが多くの領域で起こっていた。これらの結果はバクテリアのシーケンシングであり、データベースに無い新しい菌株のシーケンシングであることを示していた。DDBJ のアノテーションパイプライン DFAST を使い自動アノテーションを実施した。その結果、4113 の cDNA、9 の rRNA 遺伝子、62 の tRNA 遺伝子が検出された。

菌株 3 のアノテーションにより開始位置 1,209785 終了位置 1,210504 の 720 bp にバクテリオロドプシン様のタンパク質のコード領域が一つ見出された。239 アミノ酸残基から成り、分子量は 25.5 kDa であった。アミノ酸配列の特徴から膜 7 回貫通型のイオンポンプであることが推測され、特に機能する上で重要な 3 残基は DTA であり、レチナル結合位置を含む前方 5 残基は DVVAK であり、これは H⁺ポンプ機能を有する微生物ロドプシンに特徴的なものであった。

以上新規の極限環境から 3 菌株を得て内 2 菌株のゲノム解析に成功した。何れの菌株も微生物ロドプシンのコード領域を一つずつ有していた。アミノ酸配列は既報のものとはなかったが、重要なアミノ酸残基はすでに知られているものと同じで新規性はなかった。初めてゲノム解析まで成功したのでこの経験を活かして探索を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------