

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19299

研究課題名（和文）フォトスイッチ電位センサーの創製

研究課題名（英文）Invention of the photoswitchable voltage-sensor

研究代表者

藤原 祐一郎（Fujiwara, Yuichiro）

香川大学・医学部・教授

研究者番号：20532980

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：脳や心臓の機能をはじめとした私たちの生体機能は電気信号によって生み出されている。その電気信号を生み出すのが、電位依存性チャンネルという膜機能分子であることはよく知られている。生体の電気信号を操り人体の機能を操作する試みは現在盛んにおこなわれている。電位依存性チャンネルの電位センサーの構造と動作機構に基づき、新規の光駆動性イオンチャンネルおよび光駆動性膜機能蛋白質を創製することを試みた。高速で光異性化を起こすアゾベンゼンを利用して、イオンチャンネルの電位センサーヘリックスを動かし、光によるイオンチャンネル活性の制御や電位センサーに付加した酵素などの機能分子の制御を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

共通ドメインである電位センサーをターゲットにすることで、種々の電位依存性チャンネルに適用できるため、これまでの光駆動性ツールにはない、ネイティブチャンネルの高いイオン選択性と膜局在・分子会合を保つ光駆動チャンネルを次々に作成することが可能となる。これらにより、分子構造や動作機構に立脚して戦略的に光駆動チャンネル・光駆動性膜蛋白質を創製するプラットフォームを構築する。出来上がった光駆動分子は将来的に神経科学研究や細胞内小器官などの膜機能研究に柔軟かつ広汎に利用できる期待が持て、様々な光駆動性膜蛋白質をデザインする研究へ発展する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Our biological functions, including brain and heart functions, are generated by electrical signals. It is well known that these electrical signals are generated by voltage-gated channels. Attempts to manipulate the functions of the human body by manipulating the electrical signals of the body are currently being actively pursued. In this study, we attempted to create novel light-driven ion channels and light-driven membrane-functional proteins based on the structure and operation mechanism of the voltage sensor of the voltage-gated channel. Azobenzene, which undergoes photoisomerization at high speed, was used to move the voltage sensor helix of the ion channel to control the ion channel activity by light and to control functional molecules such as enzymes attached to the voltage sensor.

研究分野：生理学

キーワード：イオンチャンネル

## 1. 研究開始当初の背景

脳や心臓の機能をはじめとした私たちの生体機能は電気信号によって生み出されている。その電気信号を生み出すのが、電位依存性チャネルという膜機能分子であることはよく知られている。生体の電気信号を操り人体の機能を操作することは、人類の目標の一つとなっている。近年、チャネルロドプシンや、ハロロドプシンなどの光駆動性チャネルは *in vivo* に近い状態で神経回路機能を操作し解析するツールとして研究が進んでいる。光照射により構造が開状態へと変化しプロトン（陽イオン）を透すチャネルロドプシンを、生きたマウスの神経細胞に遺伝子導入にて発現し、脳内に届く光ファイバーによる光照射で、マウスの行動を人為的に操作するセンセーショナルな報告も多数行われている。一方これらツールには扱えるイオンに限られている、膜上で天然の局在・分子会合を取らないという弱点も存在する。近年の構造生物学の盛行によりチャネルロドプシンの立体構造も解かれたが、光サイクルに基づき複雑に構造を変化させ分子量も大きいと、分子の改変は必ずしも容易ではなく、より優れたツールを得るために、専ら変異スクリーニングや自然界から新しい光駆動ロドプシンを見つける取り組みが行われている。

それを解決するため、本研究では、電位依存性チャネルの電位センサーの構造と動作機構に基づき、新規の光駆動性イオンチャネルおよび光駆動性膜機能蛋白質を創製することを試みる。高速で光異性化を起こすアゾベンゼンを利用して、電位センサーを動かし、光によるイオンチャネル活性の制御や電位センサーに付加した酵素などの機能分子の制御を行う。共通ドメインである電位センサーをターゲットにすることで、種々の電位依存性チャネルに適用できるため、これまでの光駆動性ツールにはない、ネイティブチャネルの高いイオン選択性と膜局在・分子会合を保つ光駆動性チャネルを次々に作成することが可能となる。これらにより、分子構造や動作機構に立脚して戦略的に光駆動性チャネル・光駆動性膜蛋白を創製するプラットフォームを構築する。

一方で、本研究で用いるアゾベンゼンを利用した光駆動チャネルの研究も進んでおり、Glu や ACh を付加したアゾベンゼンを利用して光駆動性グルタミン酸受容体やアセチルコリン受容体の開発と応用が行われている。しかしリガンド型チャネルでは、本来リガンドの投与/除去により細胞に非侵襲的に活性を制御出来るため光駆動分子の開発メリットは少ない。

1950年代に Hodgkin-Huxley により電位依存性チャネルの概念が提唱されて以来、分子機能を解明する研究が発展し、現在では種々の電位依存性チャネルで原子構造が解かれ、分子動力学計算も発展し、駆動機構の全容も明らかになりつつある。申請者のこれまでの研究により得られた知識・研究ノウハウを活かして、従来の光駆動ツールの抱える種々の問題を解決する光駆動チャネルを作成する着想に至った。電位センサーをターゲットにすることで：

- ・ポアの高いイオン選択性が保証される。また変異導入で自在に透過イオンを改変できる。
- ・膜において天然の局在を取る。細胞内小器官の内膜や有毛細胞まで解析が可能となる。
- ・ネイティブの分子会合状態も保たれる。サブユニット機能などを維持したまま解析可能。
- ・構造を基盤とした駆動機構の理解が進んでいるため、戦略的なツール開発が可能。

となることが期待される。

また、上述した弱点の克服以上に、電位センサーを用いてのツール開発には幅広い汎用性・発展性が得られる。電位センサードメインは電位感受性分子が共通して有する構造であるため：

- ・電位センサーの駆動機構の共通性から、次々とツール開発を展開できることが期待される。
- 電位依存性  $K^+$ チャネル、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $H^+$ 、 $Cl^-$ と一つ出来ればドミノ倒し式に多くの光駆動性チャネルが得られる。 $Ca^{2+}$ 選択的透過型の光駆動チャネルはこれまでになく、その実現はニューロンでの局所の  $Ca^{2+}$ 濃度を上昇させる分子ツールとして神経科学全般への貢献が期待される。細胞生理学的観点からも、これまで局所の膜機能を直接的にコントロール出来ていない細胞内小器官の膜機能や有毛細胞の膜機能の詳細な解析が可能となる。

近年、電位センサードメイン単独で機能する  $H^+$ チャネルや酵素なども次々に発見され、電位センサーをターゲットにする利用価値が高まってきている。電位センサーは膜に垂直方向の構造変化を与える自立して駆動する希有な分子である。その機構を利用すれば：

- ・膜に垂直方向の力を光で制御し膜近傍で上下運動する種々の分子の開発への応用が期待される。

具体的には、膜近傍で働く膜脂質酵素や接着分子、裏打ち蛋白質の機能を光制御出来る。さらに多くの膜機能蛋白質が電位センサーと同様に4回膜貫通領域を有していることから、本研究の成果は今後、様々な光駆動性膜蛋白質をデザインする研究へ発展する可能性もある。

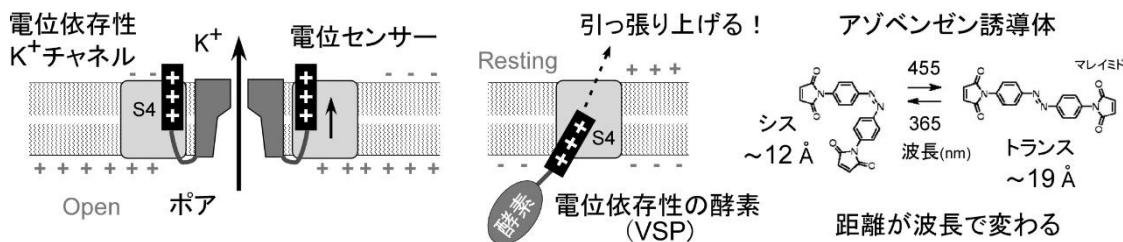
## 2. 研究の目的

電位依存性チャネルの電位センサーの構造と動作機構に基づき、新規の光駆動性イオンチャネルおよび光駆動性膜機能蛋白質を創製することを試みる。高速で光異性化を起こすアゾベンゼンを利用して、電位センサーを動かし、光によるイオンチャネル活性の制御や電位センサーに付加した酵素などの機能分子の制御を行う。共通ドメインである電位センサーをターゲットに

することで、種々の電位依存性チャネルに適用できるため、これまでの光駆動性ツールにはない、ネイティブチャネルの高いイオン選択性と膜局在・分子会合を保つ光駆動性チャネルを次々に作成することが可能となる。これらにより、分子構造や動作機構に立脚して戦略的に光駆動性チャネル・光駆動性膜蛋白を創製するプラットフォームを構築する。

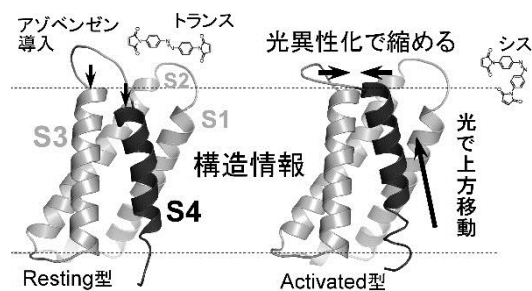
### 3. 研究の方法

生体の電気活動の発生と制御を担う電位依存性チャネルの分子構造は、イオン透過ドメイン（ポア）と電位センサードメイン（4回膜貫通：S1-S4）に大別される。電位センサードメインのプラスに帯電した残基を有するヘリックス（S4）が膜電位変化に応答して動き、その構造変化がポアに伝わりチャネルが開く。本研究ではアゾベンゼンの光異性化を利用してS4を上引っ張り上げ、光でチャネルを開かせることを目指した。電位センサーの下流に酵素が結合した電位感受性酵素（VSP）や電位センサーをH+が透過する電位依存性H+チャネル（Hvチャネル）などの分子が存在するように、電位センサーは単体で安定に上下動する機能素子である。



本研究では、機能-構造解析・分子動力学計算も含め最も理解の進んでいる電位依存性 K+チャネルと、扱いやすい最小ユニットで機能する Hv チャネルや VSP の電位センサーを対象に実験を進めた。これまでにない光駆動チャネルを開発することを目指した。電位感受性酵素（VSP）を改変しイオンを透過させる変異体を作成することを試み光駆動チャネルを開発することを目指した。Hv チャネルに変異を導入することで Cl- 選択性チャネルや Na+透過チャネルに改変出来る知見があるため、生理的イオン各種を揃えることを目指した。

構造解析情報を基に、電位センサーが Resting 構造から Active 構造に変化する際に変わる残基間距離を求めた。光異性化距離に相当する残基ペアに、アゾベンゼン誘導体を架橋するための Cys 変異を導入する。S3-S4 間距離、S2-S4 間距離、ドメイン間距離（2 量体構造の VSP、Hv では S4-S4 間、Kv では S4-ポアドメイン間）をアゾベンゼンの光異性化によりコントロールし、光により電位センサー（S4）を引っ張り上げることを目指した。網羅的に多くの変異体コンストラクトを作成し、効率的な解析を行った。



作成した変異体チャネルを Xenopus 卵母細胞に発現させ、アゾベンゼン誘導体をスルフヒドリル反応で付加し、光異性化波長を照射し、電気生理学的に（ポアを流れるイオン電流、センサー電荷の移動電流、VSP では酵素反応による応答電流を）測定した。

### 実験概要



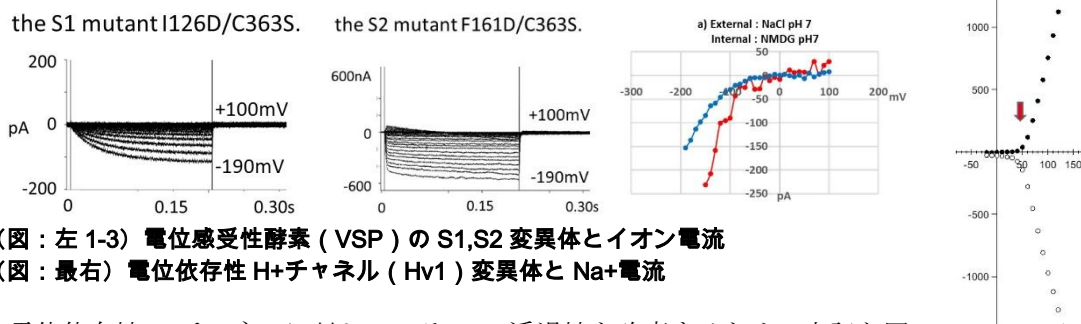
### 4. 研究成果

#### (1) イオン透過性の獲得と改変

本研究では、機能-構造解析・分子動力学計算も含め最も理解の進んでいる電位依存性 K+チャネルと、扱いやすい最小ユニットで機能する Hv チャネルや VSP の電位センサーを対象に実験を進めた。これまでにない光駆動チャネルを開発することを目指した。電位感受性酵素（VSP）を改変しイオンを透過させる変異体を作成することを試み光駆動チャネルを開発することを目指した。Hv チャネルに変異を導入することで Cl- 選択性チャネルや Na+透過チャネルに改変出来る知見があるため、生理的イオン各種を揃えることを目指した。

電位センサーの下流に酵素が結合した電位感受性酵素（VSP）はポア（イオン透過路）を有さない膜蛋白質で、その膜貫通ドメインは電位センサーとしてのみ機能する。本研究の目的である

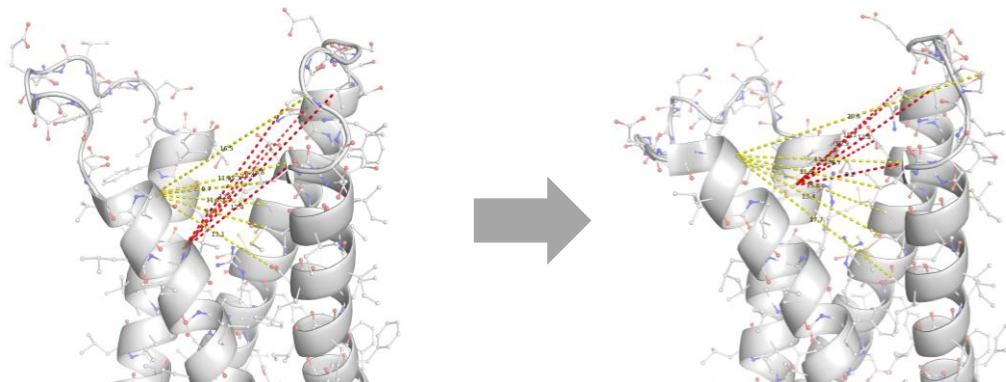
イオン選択性をコントロールした光駆動イオンチャネル作成のため、まずは VSP にイオン透過性を獲得させることを目論んだ。結晶構造を基に、細胞内外の疎水性バリアとして機能する部位に親水性残基を導入した。H<sup>+</sup>と Na<sup>+</sup>の透過性を有する電位センサーを獲得した。 NaOH7o / NMDG7i



(図：左 1-3) 電位感受性酵素 (VSP) の S1,S2 変異体とイオン電流  
(図：最右) 電位依存性 H<sup>+</sup>チャネル (Hv1) 変異体と Na<sup>+</sup>電流

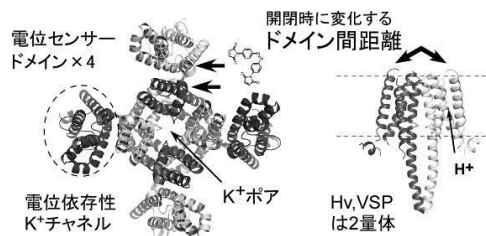
電位依存性 H<sup>+</sup>チャネルに対して、その H<sup>+</sup>透過性を改変するため、上記と同じアイデアで変異を導入し Na<sup>+</sup>を透過させる変異体を獲得した。

## (2) アゾベンゼン付加部位の設計



電位感受性酵素 (VSP) の原子構造を基に、resting 構造から open 構造に構造変化する際に、残基の距離がアゾベンゼン試薬のシス距離 12 Å からトランス距離 19 Å (またはトランスからシス距離) に相当する残基ペアをピックアップした。これをテンプレートとして、電位依存性 H<sup>+</sup>チャネル、電位依存性 K<sup>+</sup>チャネルに Cys 導入変異体を作成した。

また、電位依存性 H<sup>+</sup>チャネルに関しては、native で電位センサードメインが二つ近接した 2 量体の構造を呈するため、各サブユニット間でアゾベンゼン光異性化の距離と適合する残基ペアに Cys を導入した変異体を作成した。

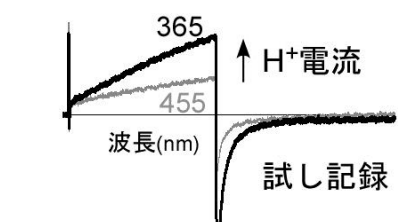


## (3) 光照射電気生理システムの構築と記録

作成した変異体チャネルを *Xenopus* 卵母細胞に発現させ、アゾベンゼン誘導体をスルフヒドリル反応で付加し、光異性化波長を照射し、電気生理学的に (ポアを流れるイオン電流、センサー電荷の移動電流、VSP では酵素反応による応答電流を) 測定した。LED を用いて光照射するシステムを作成した。365nm の UV 照射により、わずかに温度上昇がみられチャネル活性に影響を与えることに気が付いたため、温度コントローラーを作成し設置した。

電位感受性酵素 (VSP) に関しては、V219C-D136C, V219C-K142C, V219C-Q147C, V219C-S148C, V219C-D151C, G216C-D129C, G216C-M133C, G216C-D136C, G216C-L137C, G216C-P140C, G216C-A154C, L215C-M133C, L215C-D151C, L215C-A154C, L137C-G214C, L137C-R217C, D213C-Y200C, D213C-T201C の二重変異体に対して、光照射前後の電流値を解析したが、はっきりとフォトスイッチされた変異体は獲得できなかった。

電位依存性 H<sup>+</sup>チャネルに関しては、E241C~V252C, L172C~N181C, E241C/I248C, E241C/G249C, E241C/L250C, E241C/L251C など、サブユニット間駆動を目指した点変異体、サブユニット内駆動を目指した二重変異体を 56 個作成して実験を行った。光駆動されるチャネル変異体が複数個得られた。今後は、そのメカニズムの解明と応用を目指して詳細な解析を行う。



Hvチャネルにアゾベンゼン付加 (引き続き改良、探索が必要)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takagaki Natsune, Ohta Akane, Ohnishi Kohei, Kawanabe Akira, Minakuchi Yohei, Toyoda Atsushi, Fujiwara Yuichiro, Kuhara Atsushi	4. 巻 21
2. 論文標題 The mechanoreceptor DEG 1 regulates cold tolerance in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e48671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201948671	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 藤原 祐一郎, 近藤 寛子, 城田 松之, 木下 賢吾	4. 巻 58
2. 論文標題 アンキリンが生体膜に相互作用する構造基盤	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 152-154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.58.152	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 川鍋陽、藤原祐一郎
2. 発表標題 電位依存性プロトンチャネルの細胞内側からの制御 Intracellular regulation of the voltage-gated proton channel.
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会、群馬
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川鍋陽、藤原祐一郎
2. 発表標題 Patch Clamp fluorometry によるVSP 細胞内構造変化解析に向けて
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会 合同大会、名古屋
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原祐一郎
2. 発表標題 電位依存性プロトンチャネルがpHと膜電位を感じる機構
3. 学会等名 第11回日本生物物理学会 中国四国支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原祐一郎
2. 発表標題 What is the pH-gradient Sensing in the Voltage- Gated H+ Channel?
3. 学会等名 第9回アジアオセアニア生理学会（第96回日本生理学会合同大会）（国際学会）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片木絢子、藤原祐一郎
2. 発表標題 Ion Permeation of Voltage Sensor and its Foundation Structure
3. 学会等名 第9回アジアオセアニア生理学会（第96回日本生理学会合同大会）（国際学会）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原祐一郎
2. 発表標題 電位依存性H+チャネルの電氣的・化学的勾配センシング機構
3. 学会等名 蛋白研研究会「構造情報に基づいた膜イオン輸送タンパク質の生理機能の解明に向けて」（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

温度生物学トピックス「TRPV1の熱活性はポドメインに備わっている。」  
[http://www.nips.ac.jp/thermalbio/report/report2018\\_01.html](http://www.nips.ac.jp/thermalbio/report/report2018_01.html)

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
---------	---------