

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650117

研究課題名(和文)動物の多様なロドプシン類を利用した新しい光遺伝学的技術の確立

研究課題名(英文)Optogenetic application by using diverse rhodopsins of animals

研究代表者

寺北 明久(TERAKITA, Akihisa)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：30212062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：光受容タンパク質を神経細胞に導入し、その細胞の興奮を光により人為的に操作する光遺伝学的な技術が注目されている。光再生能を持つ3種類のロドプシン類が光遺伝学的な利用に適していることが、培養細胞を用いた実験により明らかになった。特に、ハマダラカのエンセファロプシン(Opn3)は、体内に広く存在する13シス型レチナールを結合できることを見出し、その性質が光遺伝学的な利用に極めて有効であることを発見した。ハマダラカエンセファロプシンは、細胞内cAMP濃度を減少させるが、その変異体を作成することにより、光依存的にcAMPの上昇やカルシウム濃度変化を引き起こすことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Optogenetics is a technology that can control neural activity by light. Optogenetic potentials of three kinds of animal rhodopsins having the photoregeneration ability were investigated in the cultured cells. The results indicated that the rhodopsins having the photoregeneration ability were suitable for optogenetic tools. In addition, we found that mosquito Opn3 bound to 13-cis-retinal, which is ubiquitously present in animal bodies. The experimental data showed that the 13-cis-retinal binding ability and photoregeneration ability contributed to optogenetic application of mosquito Opn3.

研究分野：動物生理・行動

キーワード：光遺伝学 Gタンパク質共役型受容体 ロドプシン Gタンパク質

1. 研究開始当初の背景

近年、光受容タンパク質を神経細胞に導入し、その細胞の興奮を光により人為的に操作する光遺伝学的な技術が注目されている。細菌由来のイオンチャネル型的光受容タンパク質(チャネルロドプシン)は、全身に存在するレチナル(普遍型レチナル、全トランス型や13シス型)を発色団として結合し、光反応した後に元の状態に戻る性質を持つことから、光遺伝学的ツールとして良く利用されている。動物のGタンパク質と共役する受容体タイプ(GPCR型)の光受容タンパク質(ロドプシン類)は、GPCRが関わる機能の光による人為操作を可能とする光遺伝学的ツールとして期待されている。しかし、これまで用いられて来た脊椎動物の視物質(視覚ロドプシン)は、目で特別に生成する特殊なレチナル(11シス型)を発色団として結合し、一度光を吸収すると分解することから再利用されないため、光遺伝学への利用には制限があると考えられて来た(図1)。近年、申請者は、Gs型Gタンパク質(Gs)を介してcAMP濃度を上昇させるロドプシン類(アンドクラグ由来)、Gi/Goを介してcAMP濃度を減少させるロドプシン類(脊椎動物松果体由来)等を見出した。さらに、これらのロドプシン類の中には、全身に存在する普遍型レチナルを結合し、光再生能を有するものがあることも発見した。すなわち、申請者が発見したこれらのロドプシン類は、従来用いられて来た脊椎動物の視物質がもつ光遺伝学への利用の問題点を克服する可能性があると考えられた。

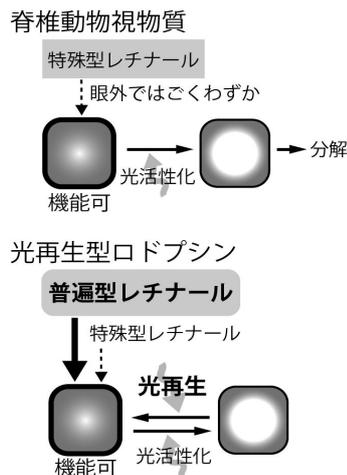


図1 ロドプシン類の性質の比較

2. 研究の目的

これらの光再生型の動物のロドプシン類を光遺伝学的技術のツールとできれば、単に細胞の興奮を引き起こすだけでなく、目的とするGPCRの機能を模倣してさらに詳細な細胞機能の光による人為的操作が可能であると考えられる。そこで、全身に存在する発色

団を結合できるのか、再利用可能なロドプシン類であるか等の分子特性を解析し、光遺伝学ツールに適しているロドプシン類を選別することを目的とした。さらに、それらの野生型および変異体が実際に光遺伝学ツールとして有用であることを示すことを目指した。

3. 研究の方法

(1)ハマダラカ Opn3 (Gi/Go 共役) の分子特性を明らかにするために、ハマダラカ Opn3 を培養細胞で発現し、発色団レチナルを加えたのち、精製し、分光光度計を用いて光反応を解析した。また、結合できる発色団が特殊型(11シス型)のみであるのか、普遍型(全トランス型等)も結合できるのかを明らかにするために、高速液体クロマトグラフィーを用いて発色団の異性体型を解析した。
(2)ハマダラカ Opn3、松果体の光受容タンパク質パラピノプシン(Gi/Go 共役)、アンドンクラグロドプシン(Gs 共役)を培養細胞に遺伝子導入し、異なる波長の光を照射し、細胞内 cAMP の実時間変化を定量的に測定した。細胞内 cAMP 濃度は、cAMP 感受性のルシフェラーゼ(GloSensor, Invitrogen)をロドプ

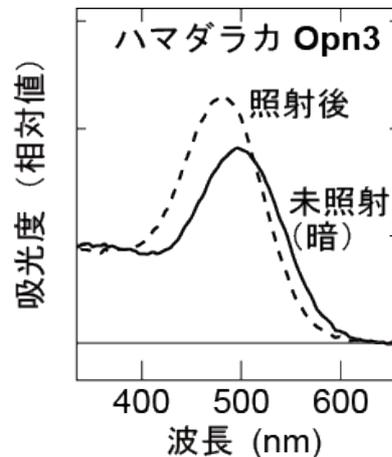


図2 ハマダラカ Opn3 の光反応

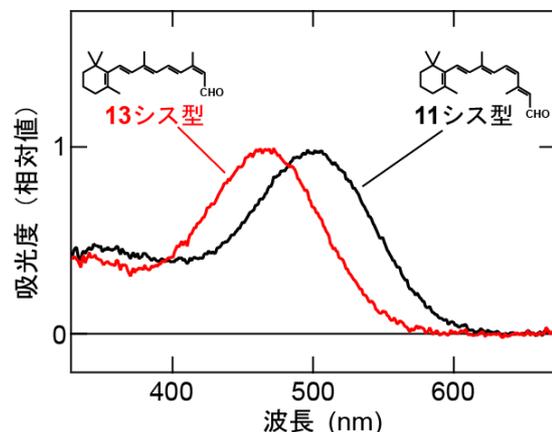


図3 13シス型レチナルと11シス型レチナルを結合したハマダラカ Opn3 の吸収スペクトル

シン類と共発現させ、光照射に依存した発光強度の実時間測定により解析した。

4. 研究成果

(1) ハマダラカ Opn3 の分子特性

発色団として 11 シス型レチナールを結合したハマダラカ Opn3 は、吸収極大がおよそ 500nm にあり、光照射すると安定な光産物を生じた (図 2)。この光産物が再び光を吸収するともとの状態に戻った。すなわち、ハマダラカ Opn3 は光再生型であることが明らかになった。また、ハマダラカ Opn3 は、13 シス型レチナールを発色団として結合できることを発見した (図 3)。これまで、13 シス型レチナールを結合できる動物ロドプシンは知られていなかったため、注目される発見と言える。13 シス型は全トランス型レチナールと熱的な平衡関係にある。すなわち、普遍的なレチナールである全トランス型が存在すると必ずその一部は 13 シス型レチナールとして存在することになる。したがって、13 シス型レチナールは、全身どこにでも存在するので、ハマダラカ Opn3 は、全身のどのような組織においても機能できると考えられる。

(2) 光遺伝学的利用の有用性

11 シス型レチナールを添加した場合、アンドンクラゲロドプシンを発現している培養細胞

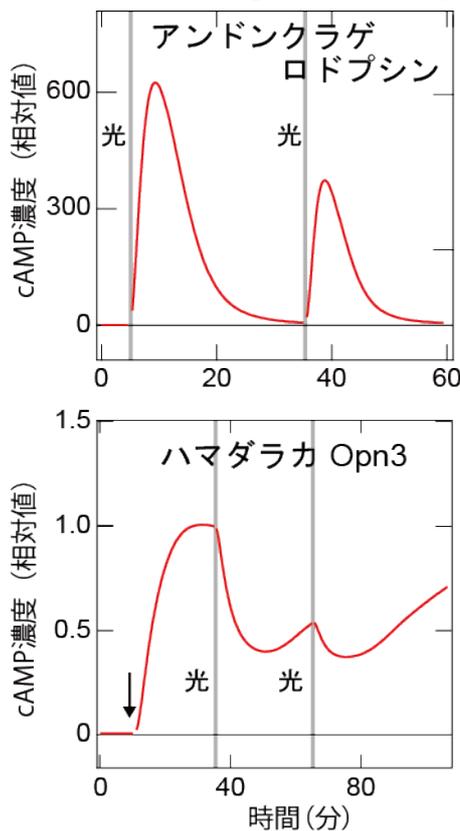


図 4 アンドンクラゲロドプシンとハマダラカ Opn3 を発現している培養細胞の光依存的な細胞内 cAMP 濃度変化。図中の矢印でフォールスコリンを加え、cAMP 濃度を上昇させている。

胞では、緑色光照射により細胞内 cAMP 濃度が増加した。一方、ハマダラカ Opn3 を発現している培養細胞を緑色光照射した場合およびパラピノプシンを発現している培養細胞を紫外光照射した場合については、細胞内 cAMP の減少が起こった (図 4)。パラピノプシンについては、紫外光照射に続いて、光再生を起こさせる緑色光を照射すると、cAMP が元のレベルに素早く回復することを見出した。この性質は、光の「色」により細胞内の状態をコントロールできる可能性を示唆しており、光遺伝学のツールとして、優れた分子特性であると考えられた。

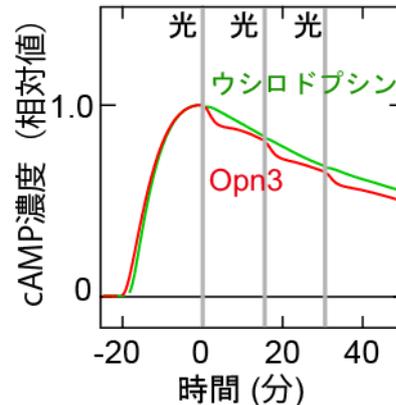


図 5 ハマダラカ Opn3 あるいはウシロドプシンを発現している培養細胞の光依存的な細胞内 cAMP 濃度変化。図中の -20 分でフォールスコリンを加え、cAMP 濃度を上昇させている。

一方、ハマダラカ Opn3 の 13 シス型レチナールの結合能の光遺伝学における有用性を確認するために、図 4 と同様にハマダラカ Opn3 を培養細胞で発現させ、レチナールの添加なしに、光依存的な cAMP 濃度変化を調べた。すなわち、血清を含む培地中の培養細胞で発現している Opn3 が、血清 (血液) に含まれるレチナール (一般には全トランス型と 13 シス型) を結合して機能できるかを調べた。その結果、図 5 に示すように、光再生能がなく特別な 11 シス型レチナールしか結合できないウシロドプシン (緑) では、光照射により cAMP の変化は起こらないが、ハマダラカ Opn3 (赤) では、光照射に伴い明らかな cAMP 変化が起こることを見出した。このことは、普遍型である 13 シス型レチナールの結合能と光再生能を持ち合わせたハマダラカ Opn3 がどの細胞においても、血液中のレチナールを結合し、機能できることを示している。すなわち、ハマダラカ Opn3 は、光遺伝学的なツールとして有用であることが明らかとなった。また、ハマダラカ Opn3 の G タンパク質相互作用部位を様々なロドプシン類のものとの交換することにより、細胞内 cAMP 濃度を上昇させたり、細胞内カルシウム濃度を上昇させたりできることも、同様の測定により確かめた。このハマダラカ Opn3 を導入したゼブラフィッシュ変異体やマウス変異体を

作製することにより、ハマダラカ Opn3 の光遺伝学ツールとして有用性をさらに示せると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計16件)

L. Sun, E. Kawano-Yamashita, T. Nagata, H. Tsukamoto, Y. Furutani, M. Koyanagi and A. Terakita: Distribution of Mammalian-like melanopsin in cyclostome retinas exhibiting a different extent of visual functions. *PLoS One* 9, e108209 (2014) 査読あり

M. Koyanagi, E. Takada, T. Nagata, H. Tsukamoto and A. Terakita: Homologs of vertebrate Opn3 potentially serve as a light-sensor in nonphotoreceptive tissue. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 110, 4998-5003 (2013) 査読あり

T. Nagata, M. Koyanagi, H. Tsukamoto, S. Saeki, K. Isono, Y. Shichida, F. Tokunaga, M. Kinoshita, K. Arikawa and A. Terakita: Depth perception from image defocus in a jumping spider. *Science* 335, 469-471 (2012) 査読有り

[学会発表](計63件)

A. Terakita: Molecular basis of wavelength discrimination in the pineal organs of lower vertebrates. 16th International Conference on Retinal Proteins (長浜ロイヤルホテル・滋賀県・長浜市) 2014年10月8日

A. Terakita: Homologues of vertebrate OPN3 as a potential light-sensor in non-photoreceptive tissue. 6th Asia and Oceania Conference on Photobiology (Sydney, Australia) 2013年11月11日

A. Terakita: Molecular and functional properties of non-visual opsins. 15th International conference on Retinal Proteins (Ascona, Switzerland) 2012年10月3日

寺北明久: 視物質の吸収特性が生み出す意外な視覚機能: ハエトリグモのピンぼけ像による奥行き知覚 日本動物学会第82回大会(旭川市大雪クリスタルホール・北海道・旭川市) 2011年9月21日

A. Terakita: Diversity of opsin-based photopigments in non-visual function. The 5th Asia and Oceania Conference on Photobiology.(Nara New Public Hall・奈良県・奈良市) 2011年7月31日

[図書](計3件)

E. Kawano-Yamashita, M. Koyanagi, S. Wada and A. Terakita: The evolution and diversity of pineal and parapineal photopigments. In "Evolution of Visual and

Non-visual Pigments" ed. by D. M. Hunt, M. W. Hankins, S. P. Colin and N. J. Marshall, Springer Series in Vision Research, Springer, 2014, 21

寺北明久: 動物のロドプシン類の多様性と機能解析「オプトジェネティクス(光遺伝学)」(エヌ・ティー・エス) 2013、14

[その他]

新聞報道

共同通信 2012年1月27日 “クモ、目のピンぼけで距離つかむ”、朝日新聞 2012年1月27日 “ピンぼけでも捕獲”、読売新聞 2012年1月27日 “ピンぼけ度で距離測定”、日経新聞 2012年1月27日 “ピンぼけ具合で距離測る”、産経新聞 2012年1月27日 “ハエトリグモピンぼけ測定”、読売新聞 2014年3月17日 “光受容たんぱく質”

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺北 明久 (TERAKITA, Akihisa)
大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 30212062