

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K21848

研究課題名（和文）細胞を赤外線で作るためのチャンネルロドプシンの創製

研究課題名（英文）Development of channelrhodopsin for infrared control of cells

研究代表者

今元 泰（Imamoto, Yasushi）

京都大学・理学研究科・准教授

研究者番号：80263200

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：赤外線で作る細胞を操作することを目的として、近赤外光で駆動するチャンネルロドプシンの創製を試みた。長波長シフトしたチャンネルロドプシンのバリエーションであるChrimsonRやReaChRに共役二重結合系を延長したレチナルアナログを発色団として導入することで、天然に存在するものよりも長波長シフトしたチャンネルロドプシンが生成した。効率よく色素が生成したReaChRアナログの光反応サイクルを時分割紫外可視分光によって詳細に検討したところ、イオン透過状態と考えられる中間体が生じるアナログ色素を見出すことができた。電気生理学的測定により、このアナログ色素によって細胞膜に光電流が生じることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞の興奮や抑制を光で制御できるオプトジェネティクスは、生物学全般で欠くことのできない技術となっている。一般的なチャンネルロドプシンは青色光に最も感受性が高いが、青色光は組織での拡散・吸収や細胞の損傷などを引き起こす可能性があるため、非侵襲的な赤外光で駆動できるチャンネルロドプシンの開発が望まれている。本研究では人工的に共役二重結合系を延長したレチナルアナログを発色団として用いることで、長波長シフトしたチャンネルロドプシンが生成し、細胞に光電流を発生させることができることを示した。本技術をさらに改良することで、細胞を赤外線リモコンで制御することも可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To manipulate the cells by non-invasive infrared light, the channelrhodopsin driven by near infrared light was produced. The long-conjugated retinal analogs were incorporated into the red-shifted channel rhodopsin variants, ChrimsonR and ReaChR, resulted in the generation of channelrhodopsin analogs showing red-shifted absorption spectra relative to ChrimsonR and ReaChR. The flash photolysis experiments for ReaChR analogs demonstrated that the intermediate similar to ion-conducting state of ReaChR was produced in the photocycle of some of ReaChR analogs. It was confirmed that they induced the photocurrent of the cell by electrophysiological measurement.

研究分野：生物物理学

キーワード：光遺伝学 オプトジェネティクス レチナルアナログ 脱分極 膜電位 光反応サイクル 共役二重結合系 ロドプシン

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

動物の基本的な構成要素である細胞を人工的に操ることができれば、基礎生命科学だけでなく疾病の診断や治療など、幅広く応用することが期待される。近年、広く普及しているオプトジェネティクス(光遺伝学)は、光で開くイオンチャネル蛋白質(チャネルロドプシン)の遺伝子を神経細胞に導入し、光照射によってイオンチャネルを開放する技術である。その結果、カチオン透過性のチャネルロドプシンでは脱分極(興奮)、アニオン透過性のチャネルロドプシンでは過分極(抑制)させることができるので、神経系を自由に操ることが可能になっている。チャネル蛋白質以外にも、転写活性や酵素活性を光制御できる光活性蛋白質が開発されており、いろいろな細胞活性を光で制御できるようになってきた。光を用いた操作は、従来の機械的、電氣的、あるいは化学的(薬学的)な操作よりも部位特異性、非残留性、非侵襲性などですぐれており、飛躍的な進歩をとげている。

多くのチャネルロドプシンは青色光(470~480 nm)に最も感受性が高いが、青色光は散乱・吸収のため内部の組織に届きにくくだけでなく細胞にダメージを与える可能性がある。そのため、さまざまな微生物のゲノム探索や遺伝子工学により、黄色~赤色光で励起できるチャネルロドプシンが発見・開発され、実際に応用されるようになってきた。しかし、それよりもさらに長波長の「生体の窓」とよばれる近赤外領域(おおむね700~1,500 nm)の光でチャネルロドプシンを駆動することができれば、非侵襲的、かつ高効率に細胞を操ることができると期待された。

チャネルロドプシンはレチナールを発色団として含んでいる。そのため、ゲノム探索や遺伝子工学によって蛋白質部分を改変しても、発色団の化学構造が同じである限り長波長シフトには限界があると考えられた。一方、レチナールのように共役二重結合系を持つ分子は、一般に共役二重結合系が長くなると吸収波長が長波長にシフトする(1)。そこで、全トランス型レチナールの共役二重結合系を有機化学的に延長したレチナールアナログを合成し、最も安定で広く用いられているチャネルロドプシン(C1C2)に導入したところ、吸収極大が青色領域(477 nm)から緑色領域(510 nm)にまでシフトした(2)。また、複数の光反応中間体が現れる光反応サイクルが見られることがわかり(2)、共役二重結合系を有機化学的に延長したレチナールアナログの活用が有望であると考えられた。

2. 研究の目的

以前用いたC1C2の吸収帯は青色光領域にある。そのため、C1C2よりも長波長シフトしたチャネルロドプシンのバリエーションを用いることで、さらなる長波長シフトが実現できると期待された。そこで、ChrimsonR(587 nm)、あるいはReaChR(538 nm)と共役二重結合系を延長したレチナールアナログと組み合わせることで、これまでにない長波長光で駆動できるチャネルロドプシンを創製することを目指した。本研究では、吸収スペクトルだけでなく光反応サイクルや光電流の測定から、作製したチャネルロドプシンアナログを評価した。

3. 研究の方法

共役二重結合系を延長したレチナールアナログを合成した(図1)。全トランス型レチナール(A1)のイオン環部分に二重結合を追加した3,4-デヒドロレチナール(A2)およびA2をベースにポリエン部分のC6、C10、C14の位置に二重結合を追加したレチナール(それぞれA2-6ex、A2-10ex、A2-14ex)を合成した。A2-6ex、A2-10ex、A2-14exは共役二重結合系の長さは同じであるがメチル基の位置が異なっており、C1C2では蛋白質との相互作用に大きな影響が見られた(2)。そのため、本研究でもこれらのレチナールアナログを用いて最適なメチル基の位置を検討した。ChrimsonR、およびReaChRの遺伝子をHEK293細胞で発現させ、これらの蛋白質を含む膜断片にレチナールアナログを加えてチャネルロドプシンアナログを再構成した。チャネルロドプシンアナログをドデシルマルトシドで可溶化し、抗体カラムによる精製後、分光測定に用いた。

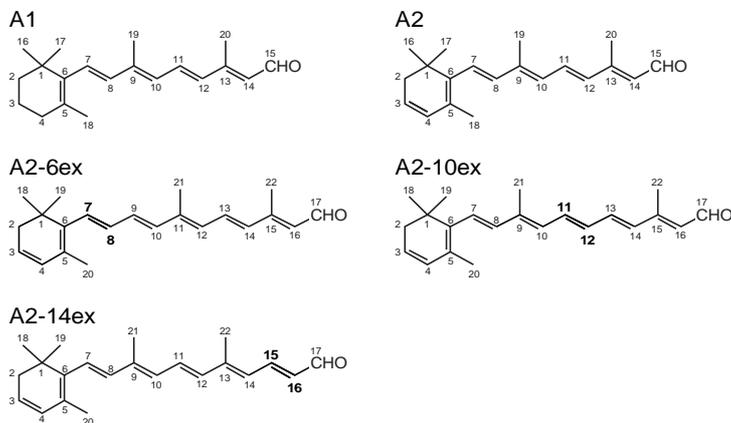


図1 本研究で用いたレチナールアナログ。

時間分解測定には、時間分解能 200 μs の高速マルチチャネル分光光度計を用いた。光励起にはキセノンフラッシュ光を用いた。得られた過渡吸収スペクトルのデータセットを特異値分解法(SVD)によって解析し、変

化成分にあたるスペクトル変化を抽出した。

チャンネルロドプシンアナログの光活性測定では、ReaChR 遺伝子を発現した HEK293T 細胞にレチナルアナログを加えてチャンネルロドプシンアナログを再構成し、ホールセルパッチクランプ法により光電流を測定した。

4. 研究成果

(1) 発色団の共役二重結合系を延長したチャンネルロドプシンの吸収スペクトル

長波長シフトしたバリエーションである ReaChR や ChrimsonR に共役二重結合系を延長したレチナルアナログを導入し、可視吸収スペクトルを測定した。その結果、ChrimsonR ではレチナルアナログとの親和性が低く、内在性の A1 由来の色素が多く生成した。内在性の A1 由来のスペクトルを差し引くことで、A2 アナログを発色団とする ChrimsonR の吸収スペクトルが大きく長波長シフトすることは確認できたが (表 1)、これらを実用化するためには、結合効率

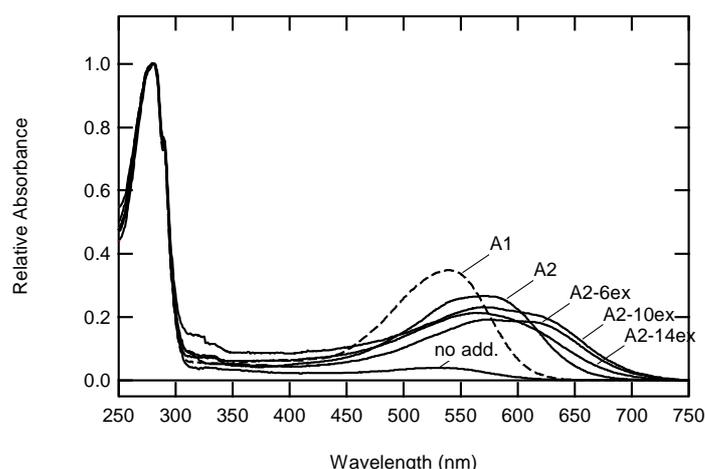


図 2 ReaChR アナログの紫外可視吸収スペクトル。

を向上させるアミノ酸残基の変異を導入することが必要であると考えられた。

一方、ReaChR は効率よくレチナルアナログと結合し、長波長シフトしたチャンネルロドプシンアナログが生成した (図 2、表 2)。A2 アナログでは A1 を含む ReaChR よりも吸収極大波長 (λ_{max}) が 41~69 nm 長波長シフトしていた。また、吸収スペクトルの長波長側のすそを示す $1/e \lambda_{max}$ (吸光度が λ_{max} の吸光度の $1/e$ になる波長) は 68~85 nm 長波長シフトしており、700 nm の光に対しても吸光度を示した (図 2) (3)。

表 1: ChrimsonR アナログの吸収スペクトルの性質

	A1	A2	A2-6ex	A2-10ex	A2-14ex
λ_{max} (nm) ^{a)}	587	636	651	654	634
$1/e \lambda_{max}$ (nm) ^{b)}	644	703	746	756	702
Rel. abs. ^{c)}	0.26	0.26	0.23	0.24	0.28

表 2: ReaChR アナログの吸収スペクトルの性質

	A1	A2	A2-6ex	A2-10ex	A2-14ex
λ_{max} (nm) ^{a)}	538	580	607	596	579
$1/e \lambda_{max}$ (nm) ^{b)}	588	634	672	673	656
Rel. abs. ^{c)}	0.35	0.28	0.20	0.24	0.21

a) 吸収極大波長。b) 吸光度が λ_{max} の吸光度の $1/e$ になる波長。c) 280 nm の吸光度に対する比吸光度。

(2) ReaChR アナログの閃光分解測定

長波長シフトした色素が効率よく生成した ReaChR アナログの光反応サイクルを、時分割紫外可視分光によって詳細に検討した。A2-6ex、A2-10ex、A2-14ex を発色団とする ReaChR アナログの光反応を比較すると、二重結合を追加した位置 (メチル基の位置) によって光反応が大きく異なることがわかった。A2-6ex と A2-10ex では、吸収スペクトルの長波長シフトは大きかったが、光反応の効率は著しく低下していた。一方、A2-14ex では、吸収スペクトルの長波長シフトはやや小さかったが、通常

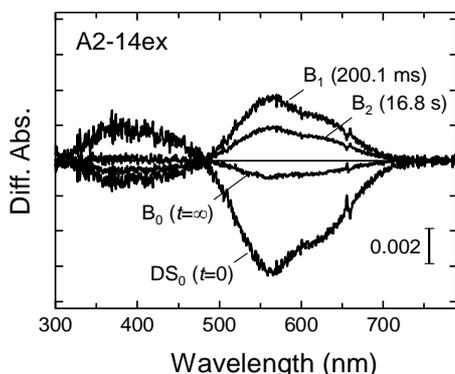


図 3 A2-14ex ReaChR の過渡吸収スペクトル。

の A1 レチナルを発色団とする ReaChR と同等の光反応の効率を示した (図 3)。SVD 解析によって得られたスペクトル変化では、光励起後 1 ms 以内に M 中間体に対応する中間体 (380 nm) の生成がみられた (図 3、 DS_0)。M 中間体は時定数 200 ms と 16.8 s の 2 段

階の反応で暗状態に戻ることがわかった（図 3、B₁ と B₂）。ReaChR では、M 中間体と N 中間体がイオン透過状態であると考えられている。そのため、A2-14ex でも光依存的にイオンを透過できることが強く示唆された。

（3）ReaChR アナログの光活性の電気生理学的解析

A2 アナログを発色団とする ReaChR アナログが細胞中で光電流を生じることができるかを電気生理学的に確認した。HEK293T 細胞に ReaChR と蛍光蛋白質である Venus の遺伝子を組み込んだプラスミドを導入して培養した後、レチナールアナログを加えて ReaChR アナログを生成させた。Venus の蛍光をマーカーとしてプラスミドが導入された細胞を選択し、光によって生じる電流をホールセルパッチクランプ法で測定した。その結果、光電流の大きさはレチナールアナログの種類によって異なることがわかった。さまざまな波長の光に対する光電流を測定して作用スペクトルを作製し、A1 を発色団とする ReaChR の作用スペクトルと比較したところ、A2-14ex の作用スペクトルに長波長シフトが見られた。A2-14ex は通常の ReaChR と同様の光反応効率を示すことから、中間体の生成効率がイオン輸送効率を制御すると考えられた。

（4）結論

オプトジェネティクスにおける光透過性や非侵襲性の向上のため、チャンネルロドプシンの長波長シフトを目指した研究が広く行なわれている。本研究では共役二重結合系を延長したレチナールアナログを使用した。従来このようなかさ高いレチナールアナログでは、立体障害のために機能が損なわれると考えられてきた。本研究では、レチナールがかさ高くなっても、メチル基の位置が適当であれば必要な蛋白質と発色団の相互作用が保たれ、正常に機能することが示された。本研究によって、長波長シフトしたチャンネルロドプシンアナログの作製に成功しただけでなく、レチナールアナログの有用性を示すことができた。

< 引用文献 >

1. Okitsu, T., Matsuyama, T., Yamashita, T., Ishizuka, T., Yawo, H., Imamoto, Y., Shichida, Y., and Wada, A. (2017) Alternative formation of red-shifted channelrhodopsins: noncovalent incorporation with retinal-based enamine-type Schiff bases and mutated channelopsin. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **65**, 356-358
2. Shen, Y.-C., Sasaki, T., Matsuyama, T., Yamashita, T., Shichida, Y., Okitsu, T., Yamano, Y., Wada, A., Ishizuka, T., Yawo, H., and Imamoto, Y. (2018) Red-tuning of the channelrhodopsin spectrum using long conjugated retinal analogues. *Biochemistry* **57**, 5544-5556
3. Okitsu, T., Yamano, Y., Shen, Y.-C., Sasaki, T., Kobayashi, Y., Morisawa, S., Yamashita, T., Imamoto, Y., Shichida, Y., and Wada, A. (2020) Synthesis of one double bond-inserted retinal analogs and their binding experiments with opsins: Preparation of novel red-shifted channelrhodopsin variants. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **68**, 265-272

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kojima Keiichi, Matsutani Yuki, Yanagawa Masataka, Imamoto Yasushi, Yamano Yumiko, Wada Akimori, Shichida Yoshinori, Yamashita Takahiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Evolutionary adaptation of visual pigments in geckos for their photic environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabj1316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abj1316	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 Fujiyabu Chihiro, Sato Keita, Nishio Yukimi, Imamoto Yasushi, Ohuchi Hideyo, Shichida Yoshinori, Yamashita Takahiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Amino acid residue at position 188 determines the UV-sensitive bistable property of vertebrate non-visual opsin Opn5	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03010-x	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 Sakai Kazumi, Shichida Yoshinori, Imamoto Yasushi, Yamashita Takahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Creation of photocyclic vertebrate rhodopsin by single amino acid substitution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e75979
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.75979	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 Otsuka Hiroaki, Mitsui Hiromasa, Miura Kota, Okano Keiko, Imamoto Yasushi, Okano Toshiyuki	4. 巻 59
2. 論文標題 Rapid Oxidation Following Photoreduction in the Avian Cryptochrome4 Photocycle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 3615 ~ 3625
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.0c00495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okitsu Takashi, Yamano Yumiko, Shen Yi-Chung, Sasaki Toshikazu, Kobayashi Yuka, Morisawa Shoko, Yamashita Takahiro, Imamoto Yasushi, Shichida Yoshinori, Wada Akimori	4. 巻 68
2. 論文標題 Synthesis of One Double Bond-Inserted Retinal Analogs and Their Binding Experiments with Opsins: Preparation of Novel Red-Shifted Channelrhodopsin Variants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 265 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-01005	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 Imamoto Yasushi, Sasayama Hiroaki, Harigai Miki, Furutani Yuji, Kataoka Mikio	4. 巻 124
2. 論文標題 Regulation of Photocycle Kinetics of Photoactive Yellow Protein by Modulating Flexibility of the α -Turn	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 1452 ~ 1459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.9b11879	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imamoto Yasushi, Kojima Keiichi, Oka Toshihiko, Maeda Ryo, Shichida Yoshinori	4. 巻 123
2. 論文標題 Conformational Differences among Metarhodopsin I, Metarhodopsin II, and Opsin Probed by Wide-Angle X-ray Scattering	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 9134 ~ 9142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.9b08311	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 今元 泰
2. 発表標題 無脊椎動物ロドプシンの光構造変化
3. 学会等名 日本生物物理学会第59回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今元 泰
2. 発表標題 共役二重結合系を延長したレチナルアナログによる赤色感受性チャネルロドプシンの更なる長波長シフト
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今元 泰
2. 発表標題 高角X線散乱法による光活性化ロドプシンの活性構造安定化メカニズムの解析
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

〔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