

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290002

研究課題名(和文) イオン選択性に優れた次世代チャネルロドプシンの創出とオプトジェネティクスへの応用

研究課題名(英文) Engineering of channelrhodopsins with improved ion selectivity as next-generation optogenetic tools and their applications

研究代表者

石塚 徹 (ISHIZUKA, Toru)

東北大学・生命科学研究科・講師

研究者番号：10344714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：チャネルロドプシン-2(ChR2)の97番目のグルタミン酸残基は、種々のChRにおいて広く保存されており、静電的な相互作用により陽イオンの透過を促進していることが示唆されている。しかしMChR1では、その部分に相当するアミノ酸残基がアラニンに置換している。この意義について、MChR1の構造-機能解析、Gd(3+)によるチャネルブロックなどの研究から、MChR1のチャネルポア構造はChR2のものとは異なっていることが示唆された。また、光駆動Na(+)-ポンプの哺乳類細胞での発現最適化と光による培養ニューロン活動の抑制にも成功した。これらは次世代オプトジェネティクスツールとしての活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The five glutamate residues in the second transmembrane helix of channelrhodopsin-2 (ChR2) are conserved among various ChRs. One of them, E97, interacts with cations to facilitate their permeation and is also a primary binding site for Gd(3+). However, the counterpart of MChR1 is alanine. We investigated the ion flux and the Gd(3+)-dependent channel block of MChR1. We found that the high-affinity binding site for Gd(3+) was absent, but was dependent on the negativity. The ion flux was markedly interfered with a negative charge at the position. Based on these findings, it is suggested that the channel pore of MChR1 is differently organized from that of ChR2. *Krokinobacter rhodopsin 2 (KR2)* is a light-driven Na(+)-pump. We introduced a codon-optimized KR2 fused with eYFP and membrane trafficking signals into cultured cortical neurons. The generation of action potential was completely blocked while KR2 activation with green light. KR2 would be useful as a next-generation optogenetic tool.

研究分野：分子・細胞神経生物学

キーワード：オプトジェネティクス チャネルロドプシン 光遺伝学 微生物型ロドプシン ナトリウムイオン

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者らは、緑藻類の一種クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) の光走性に関わる光感受性イオンチャネル・チャネルロドプシン-2 (ChR2) に着目して、世界に先駆けて ChR2 をニューロンの光刺激に応用した。この技術は現在ではオプトジェネティクス (光遺伝学) と呼ばれ、ChR2 のみならず種々の微生物型ロドプシンを用いることで、*in vivo* 神経回路において遺伝学的に同定されるニューロンや、*in vitro* において顕微鏡下に同定されるニューロンの膜電位を光で自在に操作できるようになった。例えば、ChR2 は青色光の吸収により、 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} などの陽イオンを透過させる光感受性陽イオンチャネルとして機能する。ChR2 発現ニューロンを青色光で刺激すると、閾値を超える膜の脱分極を引き起こし、活動電位を発生させる事ができる。これに対して、高度好塩細菌由来のハロロドプシン (NpHR) は光エネルギーを用いて細胞外の Cl^- を細胞内へ取り込む光駆動 Cl^- ポンプとして、アーキアロドプシン (ArchT) は光エネルギーを用いて、細胞内の H^+ を細胞外に排出する光駆動プロトンポンプとして機能する。このため、NpHR や ArchT を発現させたニューロンでは、黄色光による刺激により膜の過分極が起こり、ニューロンの発火 (興奮) が抑制される。現在のオプトジェネティクスにおいて最もよく使われている微生物型ロドプシンは、ChR2、NpHR、ArchT であるが、これらの微生物型ロドプシンによるイオン輸送には以下の問題が残されている。

(1) 光刺激による細胞の応答が、微生物型ロドプシンの活性化による直接的なイオン流入により引き起こされた現象なのか、それとも膜電位等の変化に伴う電位依存性イオンチャネルの活性化を介した間接的な反応なのかを区別できない。このことは、生体機能メカニズムを解析していく上で大きな問題となる。

(2) 光駆動イオンポンプは、1 個の光子の吸収により 1 個のイオンを輸送する。そのため効果的な膜電位制御を実現させるためには、光駆動イオンポンプ分子を細胞膜上に効率よく高密度に発現させる必要がある。古細菌や緑藻などの微生物に由来する 7 回膜貫通タンパク質を哺乳類細胞に効果的かつ効率よく発現させるためには、発現タンパク質の構造の最適化が必須である。

(3) 光駆動 Cl^- ポンプ (NpHR) の場合、光刺激により細胞内 Cl^- 濃度の増加による過分極とそれによるニューロンの興奮抑制が起こるが、光刺激終了時に使用目的に反して脱分極とそれに伴うニューロンの発火を引き起こす。

(4) 光駆動プロトンポンプ (ArchT) を用いると、細胞内外の pH 変化が引き起こされるが、これが予期せぬ pH 依存的な細胞内反応を引き起こすことが指摘されており、生体機能メ

カニズムの解析において問題となる。

チャネルロドプシンは単一の分子で光受容とイオンチャネルの機能を合わせ持つ特異な一分子光電変換分子であるが、そのイオン透過や透過イオン選択性を制御している構造基盤は明らかになっていない。詳細な構造-機能解析により、イオン透過や透過イオン選択性を制御している構造基盤を解明し、イオン透過性や透過イオン選択性に優れた次世代チャネルロドプシンの開発とツールとしての最適化、そしてオプトジェネティクスへの利用・応用が強く求められていた。

2. 研究の目的

チャネルロドプシンは、単一の分子で光受容と陽イオンチャネルの機能を合わせ持つ特異な一分子光電変換分子である。しかし、イオン透過性や透過イオン選択性を制御しているメカニズムは未だに未解決の問題である。本研究では、チャネルロドプシンに特有のモチーフである第 2 膜貫通ヘリックスにある 5 つのグルタミン酸残基の機能を中心に、詳細な構造-機能解析を行い、チャネルロドプシンのイオン透過や透過イオン選択性の構造的基盤を明らかにする。また、この成果を基にして、イオン透過性や透過イオン選択性において多様なチャネルロドプシンを創出して、オプトジェネティクスに応用する。

3. 研究の方法

(1) チャネルロドプシンのイオン透過・透過イオン選択性の構造的基盤の解明

機能の異なる各種微生物型ロドプシンのアミノ酸配列を比較すると、第 2 膜貫通ヘリックス (TM2) ドメインにおいて、チャネルロドプシン類にのみ共通して認められる特徴的な配列が認められた。ChR2 の 82 番目、83 番目、90 番目、97 番目、101 番目のグルタミン酸残基 (以下、それぞれ E82、E83、E90、E97、E101 と略記する) に相当する 5 つのグルタミン酸残基は ChR1 やボルボックス (*Volvox carteri*) 由来の VChR1、VChR2 など多くの微生物に由来する ChR で広く共通に認められる。しかし、メソスティグマ藻 (*Mesostigma viride*) 由来の MChR1 では、ChR2 の E83 と E101 に相当するアミノ酸残基がそれぞれバリンとアラニンに置き換わっており、MChR1 のイオン透過や透過イオン選択性の構造的基盤が ChR2 のものと違っている可能性があった。そこでこれらのグルタミン酸残基に注目して、様々なアミノ酸置換を導入した点変異体を作製し、それらの光電流特性の解析、ガドリニウムイオン (Gd^{3+}) によるチャネルのブロック効果の検討などを行い、両者に共通するあるいは両者で異なるイオン透過メカニズムや透過イオン選択メカニズムの構造基盤を明らかにする。

(2) イオン透過性・透過イオン選択性において多様なチャネルロドプシンの創出とツ

ールとしての最適化

チャンネルロドプシンの構造-機能解析において作出した点変異体やキメラ分子、あるいは新種の微生物型ロドプシンなどの光電流特性において、既知のものとは異なる特性を有するロドプシン分子が得られた際には、それら分子に哺乳類細胞における発現効率の改善を目的とした種々の改変（N末端部シグナルペプチド様配列の最適化、種々の膜移行シグナル配列の付加など）を加える事で、ツールとしての最適化を図り、オプトジェネティクスに応用する。

4. 研究成果

(1) ChR2 のイオン透過・透過イオン選択性において重要な役割を果たしていると考えられる TM2 ドメインの5つのグルタミン酸残基の機能に関して、MChR1 では ChR2 の E97 に相当するアミノ酸残基がアラニン(A)に置き換わっている。その意義について、MChR1 のこのアラニン残基に対して A→E (グルタミン酸), A→D (アスパラギン酸), A→Q (グルタミン), A→R (アルギニン) といった一アミノ酸残基変異体を作製して、その光電流応答と Gd^{3+} によるチャンネルブロック効果の定量解析を行なった。ChR2 では、E97 に対して E→A, E→Q, E→R 変異を導入すると、その光電流は有意に減弱する。また、 Gd^{3+} によるチャンネルブロック効果もこれらの変異導入によって有意に減少した。これらのことから、ChR2 の E97 はチャンネルポア (孔) を形成しているアミノ酸残基のひとつで、チャンネルを透過する陽イオンと静電的に相互作用することでイオンの透過が促進されることが示唆された。一方、MChR1 では、ChR2 の E97 に相当するアミノ酸残基が A になっており、 Gd^{3+} によるチャンネルブロック効果も大きく減少していた (Gd^{3+} の高親和性結合部位が消失していた) が、この部分のアミノ酸残基を E や D に置換すると、ChR2 と同程度のブロック効果が現れた (Gd^{3+} の高親和性結合部位が出現した)。しかし、ChR2 とは違って、MChR1 の A→E, A→D 変異体の光電流は、置換前のものと比べて有意に減弱する。これらの結果から、MChR1 のチャンネルポアの構造は ChR2 のものとは異なっていることが示唆された。おそらく、ポアの大きさが MChR1 の方が ChR2 より大きく、透過イオンとその透過性が変化していることが予想されたが、この点については更なる追加検討が必要である。

この研究では、野生型の MChR1 と比べて約 10 倍も大きな光電流が生じる改変体の作製にも成功した。この改変体では、吸収波長特性、光電流の脱感作の大きさ、光電流の立ち上り (τ_{on}), 立ち下がり (τ_{off}) の時定数、逆転電位といった特性において、野生型の MChR1 と比べて有意な変化はなく、光電流の大きさのみが有意に増大していた。MChR1 のチャンネル特性には影響を与えず、細胞膜表面への発現効率の改善により大きな光電流が得られる

この改変体は、MChR1 のイオン透過・透過イオン選択性の構造基盤研究において非常に有用なツールであるとともに、オプトジェネティクスツールとしての活用も大いに期待できる。

(2) 2013 年に海洋細菌の一種 *Krokinobacter eikastus* から単離同定された新種の微生物型ロドプシン・KR2 は、光エネルギーを利用して、細胞内のナトリウムイオンを細胞外へ濃度勾配に逆らって輸送する光駆動ナトリウムイオンポンプ (NaR) として機能する。ヒトコドンに最適化した KR2 遺伝子に細胞膜移行シグナル、黄色蛍光タンパク質 (EYFP), 小胞体輸送シグナル等の配列を付加した発現コンストラクトをラット大脳皮質培養ニューロンに発現させたのち、電流注入により繰り返し発火を誘発させたニューロンに緑色光を照射すると、その光照射の間、持続的かつ効果的に発火を抑制した。この研究成果により、KR2 が新たな過分極型 (抑制型) オプトジェネティクスツールの選択肢のひとつになることを明らかにした。NaR の構造-機能解析とツールとしての更なる最適化を目的として、塩湖細菌由来の NaR と KR2 とのキメラ分子の作製とその機能解析を行った。培養哺乳類細胞における細胞膜発現効率が KR2 よりも優れ、また、KR2 とは異なる膜電位依存性な光電流特性を示すキメラ分子の作出に成功した。NaR は電位依存性ナトリウムチャンネル等を介したナトリウムイオンの細胞内流入と拮抗することで、膜電位が発火の閾値を超えることを抑制していると考えられる。KR2 やこれらの改変体は、過分極型オプトジェネティクスツールとして現在主流の NpHR や ArchT で見られる幾つかの副作用の問題を解消する新たなツールになり得る可能性が期待される。現在、その機能評価に向けた培養ニューロンを用いた実験が進行中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Watanabe S, Ishizuka T, Hososhima S, Zamani A, Hoque MR, Yawo H. The regulatory mechanism of ion permeation through a channelrhodopsin derived from *Mesostigma viride* (MvChR1). *Photochem Photobiol Sci*. 2016; 15: 365-374. (査読有)
doi:10.1039/C5PP00290G
- ② Hososhima S, Yuasa H, Ishizuka T, Hoque MR, Yamashita T, Yamanaka A, *et al*. Near-infrared (NIR) up-conversion optogenetics. *Sci Rep*. 2015; 5: 16533. (査読有)
doi:10.1038/srep16533
- ③ Notomi T, Kuno M, Hiyama A, Ezura Y, Honma M, Ishizuka T, *et al*. Membrane depolarization regulates intracellular RANKL transport in non-excitabile

osteoblasts. *Bone*. 2015; 81: 306-314. (査読有)

doi:10.1016/j.bone.2015.07.031

④石塚徹, 江川遼, 梅田桂子, 東海林互, 八尾寛, 生命機能の光エンジニアリング, 生物物理, 2015; 55: 311-316. (査読有)

doi:10.2142/biophys.55.311

⑤Kato HE, Inoue K, Abe-Yoshizumi R, Kato Y, Ono H, Konno M, Hososhima S, Ishizuka T, et al. Structural basis for Na⁺ transport mechanism by a light-driven Na⁺ pump. *Nature*. 2015; 521: 48-53. (査読有)

doi:10.1038/nature14322

⑥Inaguma A, Tsukamoto H, Kato HE, Kimura T, Ishizuka T, Oishi S, et al. Chimeras of Channelrhodopsin-1 and -2 from *Chlamydomonas reinhardtii* Exhibit Distinctive Light-induced Structural Changes from Channelrhodopsin-2. *J Biol Chem*. 2015; 290: 11623-11634. (査読有)

doi:10.1074/jbc.M115.642256

⑦Hososhima S, Sakai S, Ishizuka T, Yawo H. Kinetic evaluation of photosensitivity in bi-stable variants of chimeric channelrhodopsins. *PLoS ONE*. 2015; 10: e0119558. (査読有)

doi:10.1371/journal.pone.0119558

⑧Asano T, Ishizuka T, Morishima K, Yawo H. Optogenetic induction of contractile ability in immature C2C12 myotubes. *Sci Rep*. 2015; 5: 8317. (査読有)

doi:10.1038/srep08317

[学会発表] (計 8 件)

①細島頌子, 湯浅英哉, 菅野江里子, 富田浩史, 石塚徹, 八尾寛, 近赤外オプトジェネティクスを用いたニューロンの制御, 第93回日本生理学会大会, 2016年3月22日~2016年3月24日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

② Ishizuka T, Hososhima S, Hoque MR, Yoshida K, Inoue K, Kandori H, Yawo H. Optogenetic silencing of neuronal activity using a light-driven sodium ion pump in marine bacteria. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), 2015年12月15日~2015年12月20日, ホノルル (アメリカ合衆国)

③ Yawo H, Asano T, Ishizuka T. Optogenetic induction of contractile ability in C2C12 myotubes. 8th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress, 2015年11月22日~2015年11月25日, バンコク (タイ)

④Hoque MR, 細島頌子, 吉田一帆, 石塚徹, 井上圭一, 神取秀樹, 八尾寛, Optogenetic silencing of neural activity using a

light-driven Na⁺ pump from marine bacteria. 第38回日本神経科学大会, 2015年7月28日~2015年7月31日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市)

⑤ 八尾寛, 細島頌子, 阿部健太, 湯浅英哉, 菅野江里子, 富田浩史, 石塚徹, ランタニドナノ粒子のアップコンバージョンを利用した近赤外オプトジェネティクス, 第38回日本神経科学大会, 2015年7月28日~2015年7月31日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市)

⑥ Hososhima S, Ishizuka T, Yawo H. Bi-stable variants of chimeric channelrhodopsins: kinetics-dependent activation of neurons. 16th International Conference on Retinal Proteins, 2014年10月5日~2014年10月10日, 長浜ロイヤルホテル (滋賀県長浜市)

⑦ Zamani A, Ishizuka T, Yawo H. Light-induced membrane depolarization by two-component optogenetics. 16th International Conference on Retinal Proteins, 2014年10月5日~2014年10月10日, 長浜ロイヤルホテル (滋賀県長浜市)

⑧ Ishizuka T. Modification of ion selectivity in channelrhodopsins. Channelrhodopsin et al. Optogenetic Tools and Applications, 2014 Conference, 2014年9月28日~2014年10月1日, ビュルツブルク (ドイツ)

[図書] (計 1 件)

①日本光生物学協会 光と生命の事典 編集委員会編, 編集委員-真嶋哲朗, 飯野盛利, 七田芳則, 藤堂剛, 執筆者-石塚徹 他, 朝倉書店, 光と生命の事典, 2016年, 436 (150-151)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石塚 徹 (ISHIZUKA, Toru)
東北大学・大学院生命科学研究科・講師
研究者番号: 10344714

(2) 連携研究者

八尾 寛 (YAWO, Hiromu)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号: 00144353

(3) 研究協力者

細島 頌子 (HOSOSHIMA, Shoko)
渡部 翔太 (WATANABE, Shota)
アレメ ザamani (ZAMANI, Alemeh)
モハンマド ラズアヌル ホーク (HOQUE, Mohammad Razuanul)