

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450146

研究課題名(和文)長い共役系を有するレチナール様発色団による新規チャンネルロドプシンの開発

研究課題名(英文)Development of new channelrhodopsin having the long conjugated chromophore

研究代表者

和田 昭盛(WADA, Akimori)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80158683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、チャンネルロドプシン(ChR)を脳のニューロンに発現させ、ニューロンを光で操作する技術が開発されてオプトジェネティクスと呼ばれ、従来の青色光および緑色光よりより長波長光で応答する新規モデルの創製が求められている。

そこで、発色団を基盤として、塩基部分、側鎖およびシクロヘキセン環状に二重結合を導入した化合物を種々合成した。新規合成した発色団は、タンパク質オプシンとの結合実験をしたところ、すべてがタンパク質中に取り込まれ新たなChRが生成した。新規ChRのUV-vis吸収スペクトルにおける吸収極大は、いずれも長波長シフトしていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Optogenetics is a powerful new tool, which allows control of neuronal activity by light. Channelrhodopsins are light-gated cation channels and have been used for optogenetics. In order to construct a new type of channelrhodopsin having the chromophore responding to the longer wavelength, we prepared the novel retinal analogs with double bond-elongated at the Schiff base, side chain or cyclohexene ring of retinal and 3,4-dehydretinal. All analogs synthesized here bound to apo-protein to afford the new channelrhodopsins. Although the red shift values of λ_{max} were only 10-20 nm, these channelrhodopsins exhibited the half of absorption maximum at about 560-580 nm, which were about 50-80 nm red shifted than that of native channelrhodopsin.

研究分野：生物有機化学

キーワード：チャンネルロドプシン 発色団 長い共役系 赤色光 レチナール ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

近年、チャンネルロドプシン (ChR) を脳のニューロンに発現させ、ニューロンを光で操作する技術が開発されてオプトジェネティクスと呼ばれ、多くの注目を集めている。オプトジェネティクスは、脳神経の機能解明と密接にかかわり、記憶における脳の制御や脳神経変性疾患、精神神経疾患の発病メカニズムの解明が期待できるなど非常に有用な研究分野となっている。神経科学において、他の細胞に影響を与えることなく脳内の特定の細胞だけを制御することが直面する大きな課題となっていた。オプトジェネティクスは、神経細胞をコントロールするために光を用いているため、従来からある電極を用いた電気刺激による方法と比較して周りの細胞への影響が少なくできることから、選択的な細胞の制御において革命的な方法となっている。

これまでのオプトジェネティクスには、ChR1 と ChR2 が用いられるが、これらは青色光および緑色光にのみ応答するという限界がある。青色光や緑色光は、組織中の神経細胞に光が到達しにくく、光に対する応答が小さくなるという欠点が存在している。

そこで、今回、光の組織中への到達度ならびに応答性を高めるために発色団を基盤として赤外線などの長波長光による制御ができるような新規 ChR の活性化モデルを構築することを目的とした研究を企画した。

2. 研究の目的

ChR は、視物質ロドプシンと同様に、発色団であるレチナールとタンパク質オプシンから成り立っており、その吸収極大波長は発色団やオプシンにより異なることが判明している。これまでの研究では、オプシンであるタンパク質部分のミューテーションにより、発色団との相互作用による長波長光での制御を模索している例が、活発におこなわれている。しかしながら、現時点では緑色光での制御が限界となっている。

本研究では、この欠点を打破すべく、プロトン化シッフ塩基部分あるいは、レチナールのシクロヘキセン部分の発色団共役系を延長することにより、長波長光で ChR を制御しようとするものである。

3. 研究の方法

長波長光による ChR の制御するため発色団部分の改変として以下の三種類の方法を計画した (図 1、2)。

第一の方法は、シッフ塩基のアルキンアミン部への二重結合の導入である。

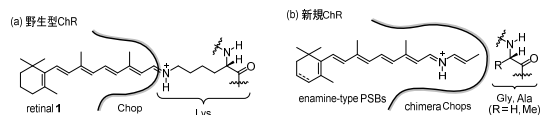


図 1

第二の方法は、3,4-デヒドロレチナールの側鎖部分への二重結合を導入することである。

第三の方法は、レチナールのシクロヘキセン部分を足がかりとして、C3 位あるいは C4 位に共役系を伸ばした化合物へ誘導することである。

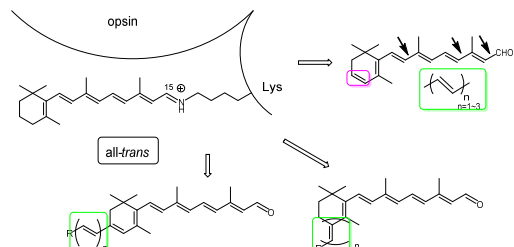


図 2

4. 研究成果

1)レチナール 1 および 3,4-デヒドロレチナール 2 にアリルアミンを反応させたのち、クラウンエーテル中、tert-ブトキシカリで異性化させることにより、エナミン型シッフ塩基へと誘導することができた (図 3)。

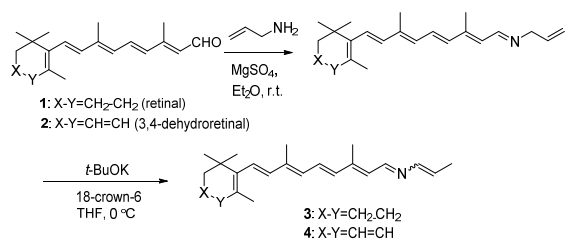


図 3

まず予備実験として、ChR2 オプシンのリジン残基をグリシンあるいはアラニンに変えたミュータントを作成し、レチナールとエチルアミンおよびエチルアミンから作成したシッフ塩基との結合実験を検討したが、いずれのシッフ塩基もタンパク質中に取り込まれないことが判明した。そこで他のオプシンとの結合実験を行うことにした。

C1C2ChR は 7 回膜貫通型のヘリックス 1 番目から 5 番目までを ChR 1 から、6 番目と 7 番目を ChR2 から由来するアポタンパク質であり、再生率および安定性に優れていることが知られている。また C1C2ChR の X 線構造解析が既になされ、タンパク質の三次元構造が明らかにされており、タンパク質中での発色団との相互作用についてもコンピューターによる検討ができる環境となっている。そこで C1C2ChR のリジン残基をアラニンに変えた C1C2-K296A およびグリシンに変えた C1C2-K296G を用いた。

まず、エナミン型シッフ塩基 3 とキメラオプシン C1C2-K296A および C1C2-K296G との反応について、コンピューター解析ソフト MOE を用いたドッキングシミュレーションを行った。その結果、それぞれの再安定コンホ

メーション解析における E-値(リガンドコンホメーションエネルギー)は、C1C2-K296A で 38.07 kcal/mol、C1C2-K296G で -56.58 kcal/mol であった。また、ドッキングシミュレーションにおける発色団の末端メチル基炭素と変異させたアラニンメチル基炭素、およびグリシンの炭素間の距離はそれぞれ 3.34 Å と 4.32 Å と、前者で約 1 Å 短くなっていた。この結果は、C1C2-K296A では発色団末端のメチル基とアラニンメチル基との立体的な反発が大きくなることが予想され、結合実験に用いるアポタンパク質としては、C1C2-K296A よりも C1C2-K296G が有利なることを示唆していた。

実際、3 と 2 つの変異体との結合実験をしたところ、C1C2-K296G とは反応してあらたな吸収極大を持つ新規 ChR を生成したのに対して、C1C2-K296A とは結合しなかった。エナミン型シッフ塩基類 4 もキメラオプシン C1C2-K296G との結合実験したところ、容易にタンパク中に取り込まれ、あらたな吸収極大を持つ ChR を与えた(図 4)。

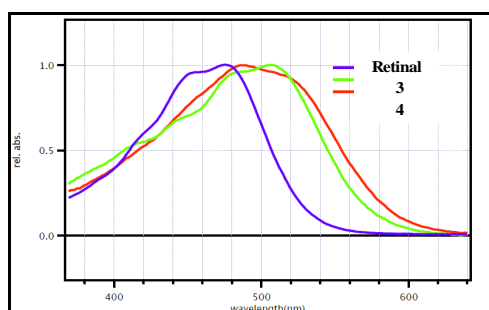


図 4

吸収スペクトルを比較すると、レチナールを含めいずれの発色団においても、吸収極大付近にショルダーを持つ形状をしているものの、3 ではレチナールと同様吸収極大の左側にショルダーを持つものに対して、4 では右側にショルダーを持つ、対照的な形状を示すことが判明した。

表 1 ChR 類の吸収極大データ

chromophore	λ_{\max} nm	$\lambda/2_{\max}$ nm
Retinal 1	452sh, 476 ^{a)}	507 ^{a)}
3	488sh, 508	545
4	488, 520sh	554

a) C1C2ChR の吸収極大値

吸収極大値を比較すると、その長波長シフト値は、レチナールの場合に比べて 3 で 30 nm であるのに対して、4 では、二重結合が 2 つ多い構造を持つ発色団にもかかわらずわずか 10 nm であった。しかし、4 のショルダー

部分での波長を比較すると、レチナール 1 を発色団とする場合の吸収極大 に比べて約 45 nm 長波長シフトしていることが判った。吸収スペクトルのもう一つの特徴として、スペクトルのブロードバンド化がみられたことである。すなわち、吸収極大の 2 分の 1 ($1/2_{\max}$) での長波長側で波長を比較するとレチナール 1 の時に比べて 3 で 40 nm、4 で 50 nm 長波長シフトしており、吸収極大における長波長シフトより大きな値を示した。これらの結果は、より長波長での照射により活性化が可能なことを示しており、シッフ塩基部分での二重結合導入により期待した効果が得られることが明らかとなった(表 1)。

2) 3,4-デヒドロレチナール(A2 アルデヒド) 2 の側鎖に二重結合を一個導入した化合物は、サフラナールを原料として合成した。A2 アルデヒドの 8 位部分へ二重結合を導入した化合物 5 は、C2 ホスホネートとの Emmons-Horner 反応後、官能基変換により対応するアルデヒドとし、さらに 2 回の C5 ホスホネートとの縮合を経て合成した。12 位部分に二重結合を導入した化合物 6 および 14 位部分に二重結合を導入した化合物 7 は、C2 ホスホネートおよび C5 ホスホネートとの縮合順序を変えることにより合成することができた(図 5)。

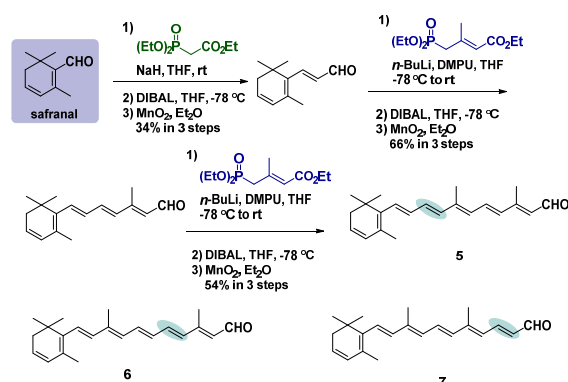


図 5

これら合成したアルデヒド類を C1C2 のオプシンと反応したところ、いずれもタンパク質中に取り込まれ、図 6 に示す吸収極大を与える新規 ChR を与えた。

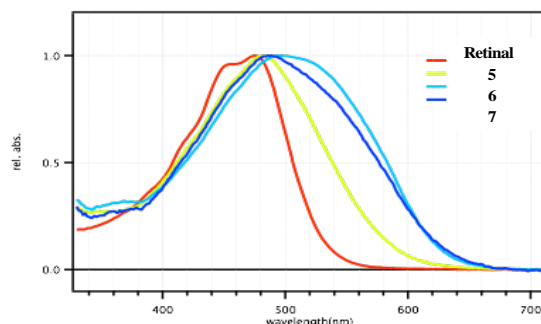


図 6

吸収スペクトルを比較すると、レチナルを発色団とする C1C2ChR は、452 nm にショルダを持つものに対して新規 ChR 類は、いずれも単純なベル型で、ブロードバンド化がエナミン型の場合より顕著化した形状を示した。ブロードバンド化の指標として、長波長側の $\lambda/2_{max}$ 値を表 2 に示した (表 2)。

表 2 ChR 類の吸収極大データ

chromophore	λ_{max} nm	$\lambda/2_{max}$ nm
Retinal 1	452sh, 475	507
5	482	538
6	497	583
7	487	576

新規発色団による吸収極大の長波長シフトは、レチナルの場合に比べ二重結合が 2 個増加しているにもかかわらず、わずか 5~20 nm となっているのに対して長波長側での $\lambda/2_{max}$ の長波長シフトは 30~70 nm と大きくなっているのが特徴となっている。更に、MOE を使用したドッキングシミュレーションでの 5、6、7 の E 値を比較すると、より安定な発色団のコンホメーションの場合ほど $\lambda/2_{max}$ の長波長シフト値が大きくなることが判明した。

3)レチナルの 4 位および 3,4-デヒドロレチナルの 3 位に二重結合を延長した化合物は、 α -イオンあるいはアクチノールを出発原料として合成することができた (図 7)。

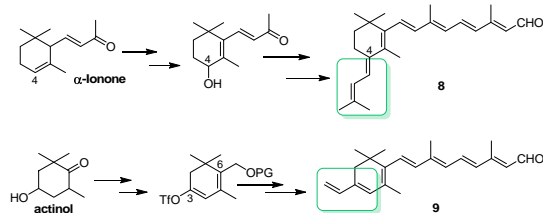


図 7

ここで合成した発色団 8、9 とオプシンとの結合実験を行ったところいずれもタンパク質中に取り込まれ、新規 ChR アナログを与えたが、これまでのアナログの場合と同様ブロードバンド化した吸収曲線を与えた (図 8)。

吸収極大値を比較するとレチナル 1 に比べ二重結合が 2 個多い発色団であるにもかかわらず、長波長シフト値はわずか 10 nm ばかりであった。また、 $\lambda/2_{max}$ のシフト値は、A2 アルデヒドの側鎖に二重結合を 1 個導入した化合物である 6、7 の場合よりもより小さくなっていた (表 3)。

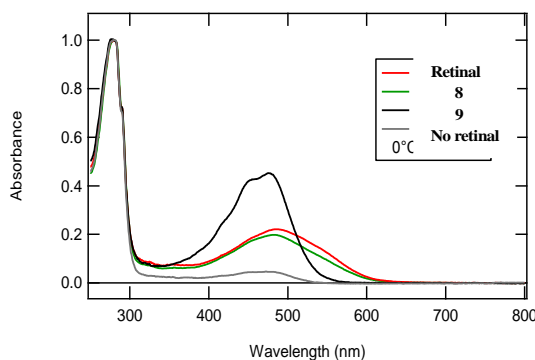


図 8

表 3 ChR 類の吸収極大データ

chromophore	λ_{max} nm	$\lambda/2_{max}$ nm
Retinal 1	452sh, 476 ^{a)}	507 ^{a)}
8	483	562
9	487	551

以上、発色団の二重結合を延長した化合物を各種合成することに成功し、オプシンとの結合実験を行い、新規 ChR を得ることができた。現在これら新規 ChR の光反応挙動について、機能が維持されるかどうかを検討している。

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 17 件)

T. Okitsu, T. Matsuyama, T. Yamashita, T. Ishizuka, H. Yawo, Y. Imamoto, Y. Shichida, A. Wada

Alternative Formation of Red-Shifted Channelrhodopsins: Noncovalent Incorporation with Retinal-Based Enamine-Type Schiff Bases and Mutated Channelopsin
Chem. Pharm. Bull. **2017**, 65(4), 356-358.

査読有 DOI: 10.1248/cpb.c17-00054

H. L. Luk, N. Bhattacharyya, F. Montisci, J. M. Morrow, F. Melaccio, A. Wada, M. Sheves, F. Fanelli, B. S. W. Chang, M. Olivucci

Modulation of thermal noise and spectral sensitivity in Lake Baikal cottoid fish rhodopsins
Sci. Rep. **2016**, 6, 38425.

査読有 DOI: 10.1038/srep38425

K. Katayama, T. Okitsu, J. Imai, A. Wada, H. Kandori

Identical Hydrogen-Bonding Strength of the Retinal Schiff Base between Primate Green-

and
Red-Sensitive Pigments: New Insight into
Color Tuning Mechanism
J. Phys. Chem. Lett. **2015**, 6(7), 1130-1133.
査読有 DOI:
10.1021/acs.jpcllett.5b00291
M. Yanagawa, K. Kojima, T. Yamashita, Y.
Imamoto, T. Matsuyama, K. Nakanishi,
Y. Yamano, A. Wada, Y. Sako, Y. Shichida
Origin of the low thermal isomerization rate
of rhodopsin chromophore
Sci Rep., **2015**, 5, 11081.
査読有 DOI: 10.1038/srep11081
Y. Suhara, Y. Hirota, N. Honda, S. Nishina, S.
Eguchi, R. Sakane, K. Nakagawa, A. Wada,
K. Takahashi, H. Tokiwa, T. Okano
Synthetic Small Molecules Derived from
Natural Vitamin K Homologues that Induce
Selective Neuronal Differentiation of
Neuronal Progenitor Cells
J. Med. Chem., **2015**, 58, 7088-7092.
査読有 DOI:
10.1021/acs.jmedchem.5b00999
Y. Yamano, K. Ematsu, H. Kurimoto, T.
Maoka, A. Wada
Total Synthesis of Gobiuxanthin
Stereoisomers and Their Application to
Determination of Absolute Configurations of
Natural Products: Revision of Reported
Absolute Configuration of Epigobiuxanthin
Marine Drugs, **2015**, 13, 159-172.
査読有 DOI: 10.3390/md13010159
和田 昭盛
ビタミン A 誘導体を用いた生物有機化学
的研究
ビタミン **2014**, 88(2), 72-81.
査読有
H. Yamada, Y. Makino, Y. Tomonaga, T.
Hidaka, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, Y.
Sudo, A. Naito
Color-Discriminating Retinal
Configurations of Sensory Rhodopsin I
by Photo-Irradiation Solid-State NMR
Spectroscopy
Angew. Chem. Int. Ed. **2014**, 53(27),
6960-6964.
査読有 DOI: 10.1002/anie.201309258
T. Okitsu, K. Nakata, K. Nishigaki, N.
Michioka, M. Karatani, A. Wada
Iodocyclization of Ethoxyethyl Ethers to
Ynamides: An Immediate Construction
to Benzo[b]furans
J. Org. Chem. **2014**, 79(12), 5914-5920.
査読有 DOI: 10.1021/jo500903y
Synthesis of (3*S*,3'*S*)- and *meso*-
stereoisomers of alloxanthin and
determination of absolute
configuration of alloxanthin isolated
from aquatic animals
Mar. Drugs **2014**, 12(5), 2623-2632.

査読有 DOI: 10.3390/md12052623
R. Maeda, M. Hiroshima, T. Yamashita, A.
Wada, S. Nishimura, Y. Sako, Y. Shichida,
Y. Imamoto,
Single-Molecule Observation of the
Ligand-Induced Population Shift of
Phdopsin, A G-Protein-Coupled
Receptor
Biophys. J. **2014**, 106(4), 915-924.
査読有 DOI:
10.1016/j.bpj.2014.01.020
C. Sakane, T. Okitsu, A. Wada, H. Sagami, Y.
Shidoji,
Inhibition of lysine-specific
demethylase 1 by the acyclic
diterpenoid geranylgeranoic acid and
its derivatives
Biochem. Biophys. Res. Commun. **2014**,
444(1), 24-29. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.144

〔学会発表〕(計 31 件)
和田 昭盛、山野 由美子、沖津 貴志、
山下 高廣、今本 泰、七田 芳則
レチナール環構造に共役系を導入したア
ナログの合成とタンパク質オプシンとの
相互作用
日本レチノイド研究会第 27 回学術集会
(2016.10.21 町田)
神崎 さくら子、石井 菜紬子、沖津 貴
志、和田 昭盛
共役したクロメン環を有するレチナール
アナログの合成研究
日本ビタミン学会第 68 回大会
(2016.06.18 富山)
山野 由美子、吉武 亮人、高木 純一、
沖津 貴志、和田 昭盛
3位および4位に共役鎖を導入したレチナ
ールアナログの合成
日本薬学会第 136 年会 (2016.03.28 横
浜)
石井 菜紬子、神崎 さくら子、沖津 貴
志、和田 昭盛
クロメン環含有レチナールアナログの合
成
日本薬学会第 136 年会 (2016.03.28 横浜)
沖津 貴志、水谷 卓史、山野 由美子、
和田 昭盛
近赤外光を吸収する人工 ChR2 作製を指
向したインドリン含有発色団の開発
日本薬学会第 136 年会 (2016.03.28 横
浜)
A. Wada, T. Okitsu, Y. Yamano, Y.
Kobayashi, T. Ishizuka, H. Yawo, T.
Matsuyama, T. Yamashiya, Y. Imamoto, Y.
Shichida
Preparation of New ChR with One Double
Bond-elongated 3,4-Dehydroretinals The
3rd International Conference on Retinoids
(2015.10.21, Gifu/Japan)

松谷優樹、小島慧一、柳川正隆、山下高廣、今元泰、山野由美子、和田昭盛、七田芳則

両生類の緑桿体に含まれる青色錐体視物質の熱活性化頻度

日本動物学会第86回大会(2015.9.19.新潟)

小島慧一、柳川正隆、山下高廣、松谷優樹、今元泰、松山オジヨス武、中西香爾、山野由美子、和田昭盛、佐甲靖志、七田芳則

視物質の低い熱活性化頻度をもたらす分子メカニズム

日本生物物理学会第53回年会(2015.9.13.金沢)

佐藤恵太、山下高廣、大内淑代、友成さゆり、酒井佳寿美、今元泰、和田昭盛、七田芳則

Opn5L1は光サイクル性の反応で制御されるGタンパク質共役型受容体である

第53回日本生物物理学会年会(2015.9.13.金沢)

和田昭盛、山野由美子、笠原奈那子、脇本友絵、中川公恵、岡野登志夫

7-ヒドロキシレチノイン酸の合成と生物活性

日本レチノイド研究会第25回学術集会(2014.10.11 秋田)

山野由美子、大畑雅裕、和田昭盛 β-ジケトン構造を有するアセチレンカロテノイド mytiloxanthin の立体選択的全合成

第40回反応と合成の進歩シンポジウム(2014.11.10 仙台)

沖津貴志、小林恵子、吉田淳美、吉田裕司、和田昭盛

3-メチレン-4-アミド-1,2-ジアゼチジンの求核的開環反応

第40回反応と合成の進歩シンポジウム(2014.11.10 仙台)

A. Wada, Y. Okitsu, N. Futamura, Y. Niimi, T. Ishizuka, H. Yawo, T. Matsuyama, T. Yamashiya, Y. Shichida

Preparation of Red-Shifted PSB of Retinal Having Enamine Structure”, 16th International Conference on Retinal Proteins

(2014.10.5-10, Nagahama/Japan)

沖津貴志、中田康平、西垣賢志、道岡直幸、柄谷光章、和田昭盛

イナミドのヨード環化反応を利用したベンゾフランの即時合成

第17回ヨウ素学会シンポジウム(2014.09.19 千葉)

山野由美子、大畑雅裕、和田昭盛 mytiloxanthin の立体選択的全合成

第28回カロテノイド研究談話会(2014.09.05 金沢)

〔図書〕(計 1 件)

和田 昭盛 他、廣川書店、薬学機器分析、第2版、pp73-131

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

神戸薬科大学生命有機化学研究室

<http://www.kobepharma-u.ac.jp/ocls/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 昭盛 (WADA, Akimori)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 80158683

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

七田 芳則 (SHICHIDA, Yoshinori)

京都大学大学院・理学研究科・教授

研究者番号: 60127090