

令和元年6月14日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11314

研究課題名(和文) 視細胞保護のための光作動性ペプチド誘導ベクターの開発

研究課題名(英文) Optogenetic vector for inhibition of photoreceptor degeneration

研究代表者

菅野 江里子 (Sugano, Eriko)

岩手大学・理工学部・准教授

研究者番号：70375210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光作動性ペプチド誘導ベクターの開発を目的とした。光受容体SyPixDとSyPixEに対する結合ドメインの検索を行ったが、両タンパク質の情報が少なく、Swiss modelingを用いた3次元構造では、タンパク質の結晶構造を予測できなかった。立体構造による機能予測をRobetta beta model解析により行ったが、実証実験と合致しなかった。

そこで、ドメイン予測を行うモデルの検討として、ハロロドプシン(NpHR)を用いて、機能予測と実証実験を行った。この結果、Swiss model、CAVER、MD simulationを用いることで、重要なアミノ酸が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オプトジェネティクスは、光によりタンパク質の機能を制御する方法である。網膜は光の届く神経細胞層であり、オプトジェネティクスを応用するに優れた領域である。今回、実験によりSwiss model、CAVER、MD simulationを用いることで、重要なアミノ酸を同定可能であった。オプトジェネティクスに応用される遺伝子は、ヒトと発生学的に離れた動植物であるため、機能を亢進させるには、該当するタンパク質を検索する必要がある。複数のモデリングを用いターゲットを絞り込むことにより、新たなオプトジェネティクス遺伝子の創出に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Purpose of this study is to develop the light-activated inducible peptide vector. The domains of SyPixe which bind to Light-activated receptor, SyPixD were investigated.

However, 3-dimensional structure was not predicted by Swiss modeling. Three-dimensional structure analysis by Robetta beta model also showed different results compared with experimental results of the N-terminal protein analysis.

To study the domain prediction, halorhodopsin (NpHR) protein was analyzed by Swiss model, CAVER and MD simulation. These predicted domains were also analyzed by in vitro study. As the results, key proteins were identified.

研究分野：眼科学

キーワード：光感受性遺伝子 オプトジェネティクス 構造予測

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

網膜病変に対し、可溶性レセプターや抗体を用いたサイトカインや種々の因子の抑制が保護効果を挙げている。黄斑変性症については、低分子である VEGF 抗体の一部 (Fab fragment, Ranibizumab, 48kDa) のみならず、VEGF 抗体の全アミノ酸 150kDa (Bevacizumab, Avastin, Genentech 社) においても硝子体投与により網膜全層に薬物動態が示され、新生血管増殖抑制効果が得られる。日本発の核酸医薬品、pegaptanib (28bp の 1 本鎖 RNA) も新生血管増殖抑制効果を挙げている。これら黄斑変性の治療薬は、低分子ペプチド、核酸などの有効性を示している。しかしながら、視細胞変性に対して、有効な治療薬はない。

### 2. 研究の目的

本研究では、視細胞変性に有効なペプチド等の検索に応用できるベクターの開発を目指した。通常、投与物質を長期的に評価する場合には頻回投与が必要となる。実際上記の Ranibizumab 等は 1~2 ヶ月の頻度で硝子体投与を行うケースが多い。そこで、オプトジェネティクスの制御によるペプチドの誘導を可能にするベクターを開発し、頻回投与やペプチド合成の必要なく、ペプチドの効果を検討できるシステムの構築を目標とした。

本研究においては、フラビンを発色団とし光受容を行う受容体 SyPixD とそれに結合する SyPixE の 2 つを利用する。ペプチドを遊離せるシステムを構築するにあたり、光により解離する SyPixE の結合ドメインの検索をシュミレーションにより行い、ドメイン予測を行う。タンパク質の特性および構造からの予測がオプトジェネティクスの機能を変化させるか、実験モデルを用い、検証することも本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

SyPixE の SyPixD に対する結合ドメインの検索を行うため、Accelrys Draw 4.1 等を用いて、結晶構造を予測した。また、Swiss modeling を用いた 3 次元構造立体構造の予測を行った。

上記検討において、予測が困難であったため、まず、ドメインの検討手法が適切であるか、我々が開発した光感受性遺伝子である改良型ボルボックス由来チャンネルロドプシン 1 (mVChR1) を用いた実験系で調べた。タンパク質としての構造は、既存の報告よりクラミドモナスチャンネルロドプシン 2 (ChR2) を参考に、立体構造予測を行った。その結果、チャンネルロドプシンのタンパク質の発現及び機能に重要である膜貫通領域において、通常の膜タンパク質の構造である 7 回膜貫通型ではなく、8 回膜貫通型と予測された (Robetta beta model)。そこで mVChR1 タンパク質を免疫沈降により得て、タンパク質の末端解析を行った。

上記検討において、ドメイン予測が困難であると考えられたため、予測手段を追加し検討するため、オプトジェネティクス遺伝子、ハロロドプシン (NpHR) を用いて実験を行うこととした。NpHR は、光感受性が低いことが報告されており、光感受性亢進を検討することは、予測解析に有効であると考えられたため、機能の予測と実証実験を行った。

Caver により、イオン輸送経路とその近傍のアミノ酸について解析を行い、イオン輸送量を向上させるためのタンパク質について検索した。イオン輸送を向上させると予想されたタンパク質が得られたため、NpHR 遺伝子にアミノ酸変異を与え、HEK293 細胞に遺伝子導入を行い、パッチクランプ法によりイオン通過量の変化を膜電位の測定により検討した。

得られた結果をモデリングに還元するため、MD simulation によるイオン通過のシュミュレーションを行った。

### 4. 研究成果

SyPixE の SyPixD について、ドメインを検討するために必要な報告が少なく、絞り込みが困難であった。SyPixD については、Accelrys Draw 4.1 を用いて、結晶構造が予測された。

青色光受容体 BLUF タンパク質 TePixD の可逆的な光反応については、TePixD の光反応に Gln50 と Tyr8 が必須であり、Gln50 とフラビンの間の水素結合が光照射により増強されるとの既報告から、この領域に關与するタンパク質部位解析を行った。立体構造の Active site とフラビン近傍の残基を照らし合わせ、キーになる残基の位置を検討した。その結果、水素結合が光刺激により増強される領域が推察された (図 1)。

ドメインの絞り込みが行えなかったため、ドメインの検討手法が適切であるか、我々の開発した光感受性遺伝子 mVChR1 を用いた解析を行うこととした。mVChR1 はボルボックス由来チャンネルロドプシン 1 の改変体である。ボルボックス由来の遺伝子は、ヒトの培養で発現させた場合、その発現が顆粒状となり、光感受性チャンネルの働きも少ない。我々は、本来発現すべき膜タンパク質として機能させるため、遺伝子改変を行い、光感受性チャンネルの機能を亢進させることに成功している。この遺伝子改変前と後を解析し、機能亢進が得られることをシュミュレーションでも予測できるか、検討を行った。まず、タンパ

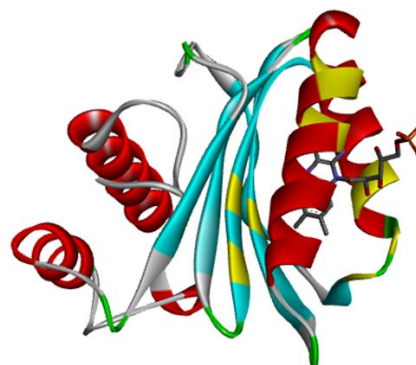


図1. Accelrysを用いて、TePixDの立体構造におけるActive siteを予測を行った。図は、TePixDの予測に基づき予測されたActive site (黄色表示)

ク質の構造としては、既報告のある、クラミドモナス由来チャンネルロドプシン2(ChR2)を参考に立体構造予測を行った。その結果、チャンネルロドプシンのタンパク質の発現及び機能に重要である膜貫通領域において、通常の膜タンパク質の構造である7回膜貫通型ではなく、8回膜貫通型と予測された(図2)。そこで、mVChR1タンパク質のN末構造解析を行った。その結果は、構造予測とは違い、我々が当初想定していたシグナルペプチドの切断が確認され、N末の切断が行われた7回膜貫通型タンパク質として機能していることが確認できた(図3)。

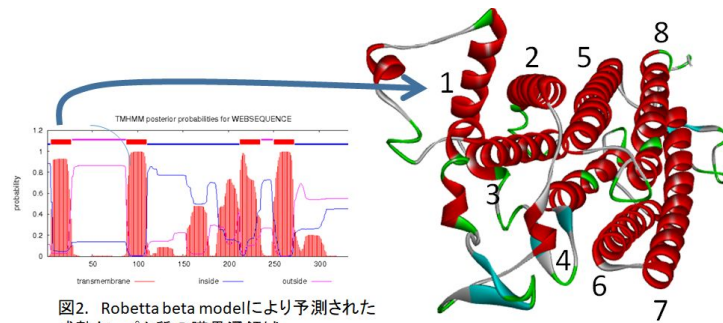


図2. Robetta beta modelにより予測された成熟タンパク質の膜貫通領域

そこで、どのモデルを用いれば、ドメインが予測できるか検討を行うため、光感受性が低いNpHRを用いて、機能予測と実証実験を行った。NpHRのモデリングとモデリングに基づくイオン輸送経路の予測を行った。Caverにより、イオン輸送経路が狭くなるボトルネック現象の予測が得られた。そこで、このボトルネックを解消すべく、NpHR遺伝子にアミノ酸変異を行った。このアミノ酸変異NpHRをHEK293細胞に遺伝子導入し、イオン透過量をパッチクランプ法により確認したところ、予想に反し、光刺激後に流入するクロライドイオン透過量の減少を起こした。1つのアミノ酸変異のみで、光刺激による細胞の過分極が顕著に減少したことは、このアミノ酸部位における重要性を示している。この理由を解明するため、MD simulationによる予測を行ったところ、アミノ酸変異により、クロライドイオンのイオン輸送経路からの離脱がみられ、これがイオン輸送量の減少を起こしたと考えられた(Sakajiri et al., 2018)。

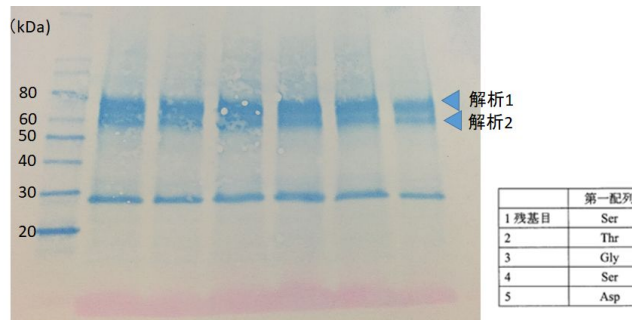


図3. mVChR1(venus融合)タンパク質のN末アミノ酸解析  
mVChR-Venus発現細胞からタンパク質を抽出し、Venusタグで免疫沈降を行った。得られたタンパク質からバンドを切り出し、アミノ酸解析を行った。その結果、N末がS-T-G-S-Dのアミノ酸であった。

以上の検討から、Swiss model, CAVER, MD simulationを用いた解析により、重要なアミノ酸を同定することができた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

**Sugano E**, Edwards G, Saha S, Wilmott LA, Grambergs RC, Mondal K, Qi H, Stiles M, **Tomita H**, Mandal N. "Overexpression of acid ceramidase (ASAH1) protects retinal cells (ARPE19) from oxidative stress." *J Lipid Res.* 査読有, 2019 Jan. 60(1):30-43. doi: 10.1194/jlr.M082198.

Sakajiri Y, **Sugano E**, Watanabe Y, **Sakajiri T**, **Tabata K**, Kikuchi T, **Tomita H**. "Natronomonas pharaonis halorhodopsin Ser81 plays a role in maintaining chloride ions near the Schiff base." *BBRC.* 査読有, 2018 Sep. 18;503(4):2326-2332. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.156.

Fukuda T, Ishizawa Y, Donai K, **Sugano E**, **Tomita H**. "The poly-cistronic expression of four transcriptional factors (CRX, RAX, NEURO-D, OTX2) in fibroblasts via retro- or lentivirus causes partial reprogramming into photoreceptor cells." *Cell Biol Int.* 査読有, 2018 May. 42(5):608-614. doi: 10.1002/cbin.10942.

Watanabe Y, **Sugano E**, **Tabata K**, Ozaki T, Saito T, Tamai M, **Tomita H**. "Kinetic profiles of photocurrents in cells expressing two types of channelrhodopsin genes." *BBRC.* 査読有, 2018 Feb. 12;496(3):814-819. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.149.

Hong Li, Changqing Xu, Quanfeng Li, Xiuxiang Gao, **Erkio Sugano**, **Hiroshi Tomita**, Liming Yang, Sa Shi. "Thioredoxin 2 offers protection against mitochondrial oxidative stress and hypertrophy induced by hyperglycemia in H9c2." *Int. J. Mol. Sci.* 査読有, 2017 Oct. 18, 1958; doi:10.3390/ijms18091958

Komatsu M, **Sugano E**, **Tomita H** and Fujii N. "A Chronically Implantable Bidirectional Neural Interface for Non-human Primates." *Front Neurosci.* 査読有, 2017 Sept. 11: 514.

doi: 10.3389/fnins.2017.00514

You M, Yamane T, Tomita H, Sugano E, Akashi T. “A novel rat head gaze determination system based on optomotor responses.” PLoS One. 査読有, 2017 Apr. 26;12(4):e0176633. doi: 10.1371/journal.pone.0176633.

Sato M, Sugano E, Tabata K, Samnnohe K, Watanabe Y, Ozaki T, Tamai M, Tomita H. “Visual Responses of Photoreceptor-Degenerated Rats Expressing Two Different Types of Channelrhodopsin Genes.” Sci Rep. 査読有, 2017 Jan. 7: 41210. doi: 10.1038/srep41210

Ozaki T, Yamashita T, Tomita H, Sugano E, Ishiguro S. “The protection of rat retinal ganglion cells from ischemia/reperfusion injury by the inhibitory peptide of mitochondrial  $\mu$ -calpain.” BBRC. 査読有, 2016 Sep. 30;478(4):1700-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.006.

Tabata K, Sugano E, Murakami F, Yamashita T, Ozaki T, Tomita H. “Improved transduction efficiencies of adeno-associated virus vectors by synthetic cell-permeable peptides.” BBRC. 査読有, 2016 Sep. 30;478(4):1732-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.014.

Tomiyama Y, Fujita K, Nishiguchi KM, Tokashiki N, Daigaku R, Tabata K, Sugano E, Tomita H, Nakazawa T. “Measurement of Electroretinograms and Visually Evoked Potentials in Awake Moving Mice.” PLoS One. 査読有, 2016 Jun. 3;11(6):e0156927. doi: 10.1371/journal.pone.0156927.

Tomita H, Tabata K, Takahashi M, Nishiyama F, Sugano E. “Light induces translocation of NF- $\kappa$ B p65 to the mitochondria and suppresses expression of cytochrome c oxidase subunit III (COX III) in the rat retina” BBRC. 査読有, 2016 May. 13;473(4):1013-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.04.008.

[学会発表](計13件)

澁谷仁寿、渡邊京祐、奈良篤樹、田端希多子、前野哲輝、菅野江里子、田村勝、富田浩史、城石俊彦、山本博章. “脈絡膜メラノサイト機能の遺伝学的解析” 日本色素細胞学会第28回大会, 2018.10.

澁谷仁寿、渡邊京祐、奈良篤樹、田端希多子、前野哲輝、菅野江里子、田村勝、富田浩史、城石俊彦、山本博章 “Mitf 変異体マウスを用いた眼球におけるメラノサイトの機能解析” 日本遺伝学会第90回大会, 2018.9.

村里湧人、佐藤亮、菅野江里子、富田浩史. “失明後の視覚野の可塑性” 眼薬理学会, 2018.9.

田端希多子、菅野江里子、富田浩史. “光感受性遺伝子を導入した遺伝性網膜変性ラット網膜への光障害の影響” 眼薬理学会, 2018.9.

山根峻維、田端希多子、菅野江里子、富田浩史. “網膜局所障害ラットの視機能評価” 眼薬理学会, 2018.9.

E Sugano, K Tabata, Y Sakajiri, Y Watanabe, M Tamai, H Tomita. “Protein structural prediction of modified Volvox channelrhodopsin-1 and the verification by amino acid sequence” ARVO, 2018.5.

H Tomita, E Sugano, K Tabata, T yamane, E nagasaka, H kudo, D yoshikawa, M yoshikawa, F nakazawa, N kitaura, M tamai “Induction of local photoreceptor degeneration by a subretinal injection of N-Methyl-N-nitrosiourea in rats” ARVO, 2018.5.

富田浩史、菅野江里子. “オプトジェネティクスを利用した視覚再生研究” The 10th Retina Research meeting, 2017.12.

菅井晶久、富田浩史、菅野江里子. “GGA によるマウス海馬由来神経細胞株のグルタミン酸毒性に対する保護効果” 第88回動物学会, 2017.9.

佐藤亮、菅野江里子、田端希多子、竹沢翼、富田浩史. “失明後および視覚回復後の視覚野の機能変化に関する研究” 第88回動物学会, 2017.9.

白取 洲、田端希多子、菅野江里子、竹沢翼、富田浩史. “新規認知症モデルの確立と保護薬の検討” 平成29年度動物学会東北支部大会, 2017.9.

山根峻維、田端希多子、菅野江里子、富田浩史. “多局所網膜電図検査(mfERG)による網膜局所変性ラットの視機能評価” 平成29年度動物学会東北支部大会, 2017.9.

Sugano E, Nawajes AM, Tabata K, Tamai M, Tomita H. “Protective effect of N-Acylsphingosine Amidohydrolase 1 (acid Ceramidase) in RPE cells against oxidative stress” ARVO, 2017.5.

H Tomita, E Sugano, K Tabata, Y watanabe, T ozaki, M tamai. “Ion Channel Properties of Cells Expressing Two Different Types of Channelrhodopsin Genes” ARVO, 2017.5.

E Sugano “Analysis of adverse effect caused by AAV-2 encoded modified Volvox channelrhodopsin-1 gene therapy” 10th international Conference CLINICAL & EXPERIMENTAL OPHTHALMOLOGY, 2016.11.



〔図書〕(計 1件)

H Tomita, E Sugano, Cambridge University Press. "Optogenetics; From Neuronal Function to Mapping and Disease Biology" 2017, p382-392

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 改変チャンネルロドプシン

発明者: 富田浩史、菅野江里子、田端希多子、渡邊義人

権利者: 国立大学法人岩手大学

種類: 特願

番号: 2018-176671

出願年: 2018

国内外の別: 国内

取得状況(計 1件)

名称: 可視光波長変換部を有する東部装着型映像提示装置

発明者: 富田浩史、菅野江里子、藤井剛

権利者: 国立大学法人岩手大学

種類: 特願

番号: 2016-249858

取得年: 2017

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

岩手大学視覚科学研究室

失明に光を取り戻す NEW Vision

<http://web.cc.iwate-u.ac.jp/~htomita/vis-neurosci/>

<https://www.newvision-prj.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 富田 浩史

ローマ字氏名: Tomita Hiroshi

所属研究機関名: 岩手大学

部局名: 理工学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 40302088

研究分担者氏名: 田端 希多子

ローマ字氏名: Tabata kitako

所属研究機関名: 岩手大学

部局名: 理工学部

職名: 特任准教授

研究者番号(8桁): 80714576

研究分担者氏名: 坂尻 徹也

ローマ字氏名: Sakajiri tetuya

所属研究機関名: 盛岡大学

部局名: 栄養学部

職名: 助教

研究者番号(8桁): 40412928

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：坂尻 由子  
ローマ字氏名：Sakajiri Yuko

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、研究者個人に帰属されます。