

令和元年6月24日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14778

研究課題名(和文)ロドプシン類の発色団変換を利用した新規光遺伝学の確立

研究課題名(英文)Optogenetic potentials of animal opsin bound to 3,4-dehydroretinal

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：光受容タンパク質(ロドプシン類)を神経細胞に導入し、神経活動や行動を光制御する光遺伝学において、組織深部にまで到達する長波長の光に感受性のあるロドプシン類の利用が期待されている。本研究においては、ロドプシン類の波長感受性を長波長シフトさせる発色団(A2型)を生成する酵素とロドプシン類を培養細胞で発現させ、より長波長を感受できるロドプシンを効率よく生成させる条件を見出した。また、光遺伝学に貢献すると期待されるロドプシン類の可視光受容に必須なアミノ酸残基の決定にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光遺伝学は、神経科学のみならず生命現象の理解に大きく貢献している。脳や組織の深部まで到達する長波長の光を吸収できるロドプシン類変異タンパク質が創生されてきた。しかし、ロドプシン類は多様かつ膨大な数が存在するため、それぞれの種類に対して変異タンパク質を作製するには限界がある。今回の研究成果は、生体内において遺伝子導入された全てのロドプシン類を長波長シフトできる可能性を示しており、光遺伝学技術の進歩を大きく加速し、脳や神経活動の理解に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Optogenetics is a biological technique that involves the use of light to control living cells/neurons, which have been genetically modified to express light-sensitive protein, rhodopsins. Rhodopsins sensitive to longer-wavelength of light, which can reach deep regions of tissues is useful for optogenetics. Therefore, in this study, enzymes that convert the normal chromophore (A1-type) to A2-type chromophore, which forms rhodopsins sensitive to longer wavelength of light. When the enzyme and rhodopsin genes are expressed in cultured cells, we found that high ratio of the expressed rhodopsin was bound to A2-type chromophore, indicating the chromophore-conversion enzyme works in cultured cells to supply rhodopsins with A2-type chromophore. We also successfully identified the amino acid residues essential for visible light absorption, in some rhodopsins that would be useful for optogenetic applications.

研究分野：分子生理学、動物生理化学、生物物理学、光生物学

キーワード：光受容タンパク質 オプシン 発色団 光遺伝学

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

1. 研究開始当初の背景

光遺伝学は、ロドプシンなどの光受容タンパク質を神経細胞等に導入し、光依存的にその細胞の活動を制御する技術で、神経細胞や行動を非接触で制御できることから、近年非常に注目されている[1]。用いるロドプシン類としては、光イオンチャネルである微生物型と3量体Gタンパク質を活性化する光感受性のGタンパク質共役型受容体である動物型がある。光遺伝学において、光を脳深部に到達させるためには、「生体の窓」とよばれる深紅～近赤外の長波長光が有用であることは周知であるので、これまで様々な変異体が作製されたが、光遺伝学的な利用において、深紅～近赤外の光をキャッチできるロドプシン類は限定的である。一方、ロドプシン類はタンパク質部分と発色団レチナールからなるが、淡水魚やカエルでは、発色団レチナールとして、A2レチナール(図1、3,4-デヒドロレチナール、3,4位に二重結合)が利用され、赤感受性のロドプシンの場合は、通常発色団レチナール(A1レチナール)を結合している場合より約50nm程度長波長シフトしており、700-750nm付近の光に十分に反応できる(図2)。さらに、微生物型ロドプシンもA2レチナールを結合して50nm程度長波長シフトする。そのような背景のもと、近年A1レチナールをA2レチナールに変換する酵素が硬骨魚類とカエルで同定され(*Cyp27c1*)、培養細胞でそのレチナール変換酵素活性が報告された[2]。

2. 研究の目的

上述のA1/A2レチナール変換酵素を利用し、遺伝子導入して発現させた微生物型や動物型ロドプシン類に、生きた細胞内で生成したA2レチナールを結合させることができれば、吸収極大の赤色シフトが起こり、生体の窓の光に反応するロドプシン類の光遺伝学的利用が可能になると考えられた。そこで、本研究では、細胞中で、A1/A2レチナール変換酵素により生成したA2レチナールが効率よくロドプシン類に結合する条件を見出すことを目的の一つとした。

一方で、A2レチナールの結合と変異体を組み合わせることさらに長波長シフトさせることが可能であると考えられるので、多様な動物ロドプシン類の可視光域の波長シフトに必須なアミノ酸残基(対イオンと呼ばれる)について明らかにすることも重要である。光遺伝学においては、cAMPを上昇させるGs型Gタンパク質やイノシトールリン脂質やカルシウム濃度を变化させるGq型Gタンパク質と共役するロドプシン類の必要性が高い。しかし、それらの対イオンがどのアミノ酸残基が担うのかは解明されていないので、これら2つのロドプシン類の対イオンの決定を行うことも目的とした。

3. 研究の方法

モデル動物への導入を想定して、哺乳類培養細胞にロドプシン類遺伝子とA1/A2レチナール変換酵素を同じ細胞あるいは異なる細胞に発現させ、ロドプシンがA2レチナールを結合する割合が高くなるような系を構築する。そのために、遺伝子コンストラクトの改変や多様な動物のA1/A2レチナール変換酵素を試用し、A2レチナールの生成効率を高めることも試みる。

cAMPを上昇させるGs型Gタンパク質と共役するアンドクラグロドプシン及びイノシトールリン脂質やカルシウム濃度を变化させるGq型Gタンパク質と共役するハエトリグモロドプシンについて、変異体遺伝子を培養細胞で発現させ、分光学的あるいは細胞生物学的な方法[3]により対イオンを解析した。

4. 研究成果

動物培養細胞にA1/A2レチナール変換酵素を発現させ、A1レチナールからA2レチナールへの変換の効率を解析した。その結果、硬骨魚類由来のA1/A2レチナール変換酵素を発現させ、基質であるA1レチナールを低濃度で加え培養を続けると、A1レチナールからA2レチナールへの変換が効率よく起こることを見出した。次に、培養細胞において、ロドプシン類とA1/A2変換酵素を同時に発現させた。ロドプシン類として、生体内や培養細胞中に存在する発色団である全トラ

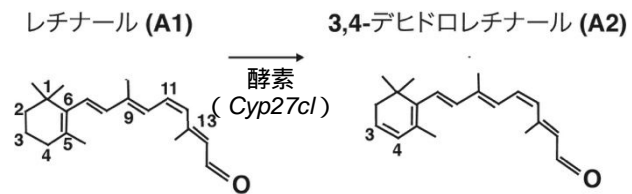


図1: A1/A2レチノイド変換酵素によるA1型からA2型への変換。3と4位間の結合が還元され、二重結合に変換される。

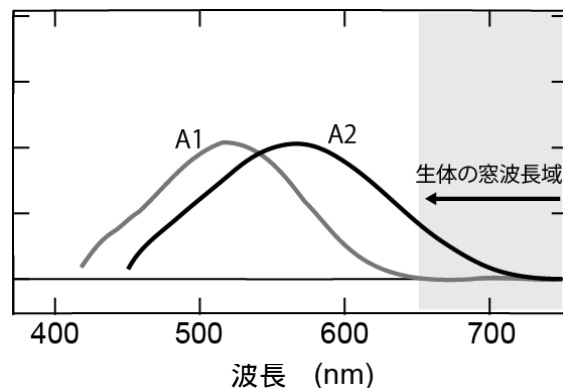


図2: A1とA2レチナールを結合した同一ロドプシン類の吸収スペクトルの模式図(縦軸は相対吸光度)。A2型発色団を結合することで、より超波長(赤色側)に吸収領域がシフトする。

ンス型を結合できる脊索動物ナメクジウオ由来のロドプシン類を用いた（一般のロドプシン類は11シス型という特別な発色団の形しか結合できない）。その結果、2つの遺伝子を同時に発現させた場合、A1レチナルからA2レチナルへの変換が最も効率よく起こる条件下においても、A2レチナルを発色団とするロドプシン類の割合は数パーセント程度であった。このことは、ロドプシン類の発現速度がA1レチナルからA2レチナルへの変換速度を上回っていたためである可能性が考えられた。そこで、A1/A2レチナル変換酵素を十分発現している培養細胞とロドプシン類遺伝子を導入した培養細胞と一緒に培養したところ、高い割合のロドプシン類にA2レチナルを結合させることに成功した。すなわち、実際に生体内でA2レチナルを結合したロドプシン類を効率よく生成させるためには、ロドプシン類の発現を時間的に制御し、A1/A2レチナル変換酵素活性が高い状態でロドプシン類の発現を開始させる必要があると考えられた。

Gs型Gタンパク質と共役するアンドククラゲロドプシンを培養細胞で発現させ、細胞内のcAMP上昇を指標として、そのロドプシン変異体の波長シフトを解析した。その結果、アンドククラゲロドプシンにおいては、N端から数えて94番目のアミノ酸残基（ウシロドプシンにおける対応する番号を使用）が対イオンとして働いていることを見出した [4]。この位置に存在する対イオンは初めてであり、波長制御を考える上で極めて重要であると考えられ、注目された。また、Gq型Gタンパク質と共役するハエトリゲモロドプシンの変異体の吸収スペクトルを詳細に検討した結果、このロドプシンの対イオンは他の多くのロドプシン類と同じN端から数えて181番目のアミノ酸残基であることを見出した [5]。さらに、186番目のアミノ酸残基が、対イオンが機能する際に必須であることも発見し、多くのロドプシン類で共通の181番目の対イオンが機能する際には、186番目のアミノ酸残基がパートナーとして機能していることが示唆され、ロドプシンの波長制御の基本的な理解に大きく貢献した。

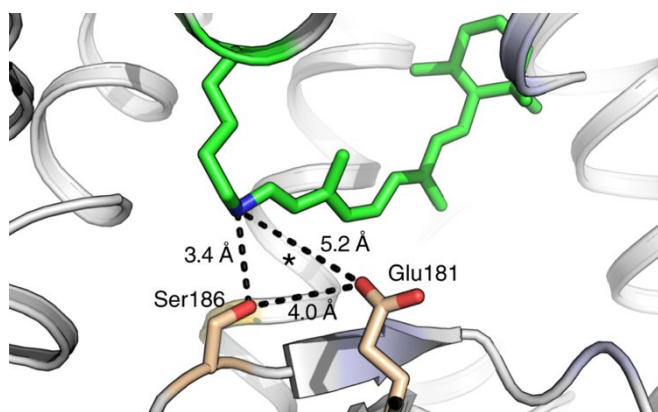


図3: ハエトリゲモロドプシンにおける対イオン (Glu181) と186番目のアミノ酸 (Ser186) との発色団レチナル (緑色) への協調したはたらき。点線は水素結合を示す。

< 引用文献 >

- Deisseroth et al., Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *Journal of Neuroscience* 26,10380-10386, 2006
- Enright et al., Cyp27c1 Red-Shifts the Spectral Sensitivity of Photoreceptors by Converting Vitamin A1 into A2, *Current Biology* 25, 3048-3057, 2015
- Sugihara et al., Absorption Characteristics of Vertebrate Non-Visual Opsin, Opn3, *PLOS ONE* 11, e0161215, 2016
- Gerrard et al., Convergent evolution of tertiary structure in rhodopsin visual proteins from vertebrates and box jellyfish, *Proceedings of the National Academy of Sciences, The United States of America* 115, 6201-6206, 2018
- Nagata et al., An all-trans-retinal-binding opsin peropsin as a potential dark-active and light-inactivated G protein-coupled receptor, *Scientific Reports*, 3535, 2018

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- Seiji Wada, Baoguo Shen, Emi Kawano-Yamashita, Takashi Nagata, Masahiko Hibi, Satoshi Tamotsu, Mitsumasa Koyanagi, Akihisa Terakita: Color opponency with a single kind of bistable opsin in the zebrafish pineal organ, *Proceedings of the National Academy of Sciences, The United States of America* 115, 11310-11315, 2018, 査読あり, DOI: 10.1073/pnas.1802592115
- Elliot Gerrard, Eshita Mutt, Takashi Nagata, Mitsumasa Koyanagi, Tilman Flock, Elena Lesca, Gebhard F. X. Schertler, Akihisa Terakita, Xavier Deupi, Robert J. Lucas: Convergent evolution of tertiary structure in rhodopsin visual proteins from vertebrates and box jellyfish, *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

The United States of America 115, 6201-6206, 2018, 査読あり, DOI: 10.1073/pnas.1721333115

Takashi Nagata, Mitsumasa Koyanagi, Robert Lucas, Akihisa Terakita: An all-trans-retinal-binding opsin peropsin as a potential dark-active and light-inactivated G protein-coupled receptor, Scientific Reports, 3535, 2018, 査読あり, DOI: 10.1038/s41598-018-21946-1

〔学会発表〕(計5件)

Akihisa Terakita: Contribution of opsin bistability to color opponency in the zebrafish pineal organs, 18th International Conference on Retinal Proteins, Ontario, Canada (招待講演), 2018年

寺北 明久: 視覚や非視覚の光受容機構に関する比較生理学的研究、日本比較生理生化学会第39回大会(招待講演)、2017年

Akihisa Terakita: Contribution of opsin properties to non-visual photoreception, 2017 FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES (招待講演), 2017年

Akihisa Terakita: Light-responses of photoreceptor cells expressing UV-sensitive opsin, parapinopsin in the zebrafish pineal wavelength discrimination, The 8th Asia & Oceania Conference on Photobiology (招待講演), 2017年

Akihisa Terakita: Pineal photoreception involving bistable pigment parapinopsin in lower vertebrates, XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research (招待講演), 2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 新規な光受容タンパク質

発明者: 永田崇, 小柳光正, 寺北明久

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2017-226272

出願年: 2017年

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名: 小柳 光正

ローマ字氏名: Mitsumasa Koyanagi

研究協力者氏名: 永田 崇

ローマ字氏名: Takashi Nagata

研究協力者氏名: ロバート・ルーカス

ローマ字氏名: Robert J. Lucas

研究協力者氏名: ゲブハルト・シャートラー

ローマ字氏名: Gebhard F. X. Schertler

研究協力者氏名: ザビエール・デュピ

ローマ字氏名: Xavier Deupi

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。