

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19230

研究課題名(和文)微生物型ロドプシタンパク質を用いた植物における膜電位操作系の開発

研究課題名(英文) Development of a regulatory system of membrane potential in plant using microbial rhodopsin

研究代表者

井上 雅恵(今野雅恵)(Konno, Masae)

東京大学・物性研究所・特任研究員

研究者番号：60459732

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):本研究は微生物型ロドプシンの光駆動イオン輸送能を利用した、植物の細胞膜電位を光で制御する系の確立を目的とした。膜電位操作ツールの候補として6種の微生物型ロドプシンと蛍光タンパク質Venusの融合タンパク質を植物培養細胞で一過的に発現したところ、外向きナトリウムポンプKR2、カチオンチャンネルGtCCR4、アニオンチャンネルGtACR1で原形質膜局在が確認された。また、KR2およびGtCCR4を発現した細胞では530nmの光照射に伴って光依存的な膜電位の過分極が観測された。さらに新奇微生物型ロドプシンとしてカチオンチャンネルGtCCR4及び内向きプロトンポンプSzRの分子特性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でKR2およびGtCCR4発現細胞における光依存的な膜電位の過分極が観測されたことは、微生物型ロドプシンが植物細胞の膜電位を操作するためのオプトジェネティクスツールとして機能することを示した初めての例である。また、新奇微生物型ロドプシンとしてカチオンチャンネルGtCCR4及び内向きプロトンポンプSzRの機能解析を行い、新たな膜電位操作ツールとしての可能性を提示した。特に、GtCCR4はこれまで利用されてきたChR2とは性質が異なるツールとしての可能性が期待されている。

研究成果の概要(英文): We aimed to construct a membrane potential regulatory system in plant cells by using light-dependent ion transport of the microbial rhodopsin. Six microbial rhodopsin were transiently expressed as fusion proteins with the fluorescent protein Venus in cultured plant cells. We observed the plasma membrane localization of the expressed protein in the outward-facing sodium pump KR2, the cation channel GtCCR4, and the anion channel GtACR1. Light-dependent hyperpolarization of the membrane potential was observed in cells expressing KR2 and GtCCR4 upon exposure to 530 nm light. We further characterized the molecular properties of the cation channel GtCCR4 and the inward-facing proton pump SzR as novel microbial rhodopsins.

研究分野：生物物理学

キーワード：オプトジェネティクス 膜電位 微生物型ロドプシン 植物細胞 イオン輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物細胞の膜電位は原形質膜、あるいは液胞膜に局在する H^+ -ATPase や複数のイオン輸送体によって制御されており、気孔開閉、病虫害に対する防御応答、形態形成、成長制御など、様々な生理現象に関わる。膜電位を人為的に操作することは膜電位応答の詳細を明らかにする上で有用な手法の一つであり、これまで植物の膜電位研究に用いられてきた手法としては薬剤処理による膜電位変化の誘導、微小電極による電気刺激、膜電位変化を引き起こす遺伝子を改変した変異体の作製といった手法があげられる。しかし、これら既存の手法では、膜電位を任意の部位・時間で可逆的に変化することが難しく、新規手法の開発が必要である。

同様に膜電位形成が重要な役割を果たしている動物の神経ネットワーク研究においては、オプトジェネティクスを用いた細胞の膜電位操作が注目を浴びている。この手法は、光応答性タンパク質を生体内に導入し、その光応答を利用して細胞の活動を操作する手法であり、細胞に対して非侵襲的に、高い時空間分解能で刺激を与えられる唯一の方法である。緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来の微生物型ロドプシンである光駆動カチオンチャネル ChR2 は光で開閉し、細胞内外へ様々なカチオンを輸送するカチオンチャネルとして、細胞膜電位の脱分極を引き起こし、神経細胞の興奮を誘導するツールとして使われている。また、神経細胞抑制ツールとして、内向き Cl^- ポンプ型 (NpHR) や外向き H^+ ポンプ型 (Arch) のロドプシン分子が使われている。神経活動の観察・制御において、これらのツールを組み合わせることで、神経活動を非侵襲的に制御することが可能になり、神経活動制御に関する研究は飛躍的に進展した。現在、微生物型ロドプシン分子を用いた神経細胞の電気化学的な制御に関しては既に個体の行動制御が可能レベルまで研究が進展している。しかし、植物細胞は内生の光受容体を複数持っているため、これらと利用する波長が競合することにより、目的以外の副次的な反応が起こる可能性があることが懸念される。このため、植物細胞の生理現象を可視光によるオプトジェネティクスで操作した例は未だない。

2. 研究の目的

先に述べた通り、植物細胞でオプトジェネティクスの適用が難しい理由として、植物の主要な光合成色素であるクロロフィルや光受容体であるフィトクロム・クリプトクロム・フォトロピンが利用する青色光・赤色光領域の可視光は、内生の光反応に影響を及ぼす可能性があることが挙げられる。一方、動物神経細胞の光操作に用いられている微生物型ロドプシンはこれらの光受容体がほとんど利用していない波長域で活性制御ができる。そこで本研究では、微生物型ロドプシンタンパク質を植物培養細胞に発現させ、微生物型ロドプシンの光駆動性イオン輸送を利用し、植物の細胞膜電位を光で制御する系を確立することを目的とする(図1)。さらに、この技術を用いて、植物細胞の生理現象を光で制御することを目指す。

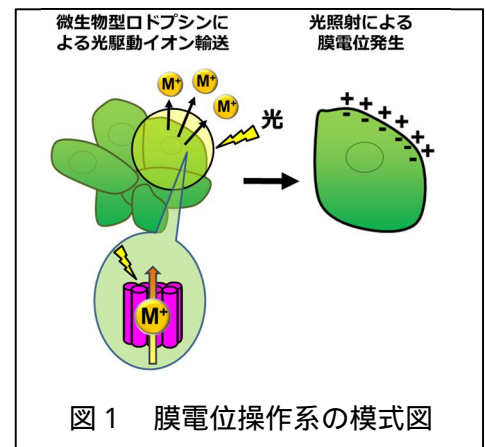


図1 膜電位操作系の模式図

3. 研究の方法

(1) 微生物型ロドプシンによる膜電位操作系の構築

本研究では、膜電位操作系を効率的に確立するため、材料にシロイヌナズナ T87 培養細胞を用いて各種微生物型ロドプシン分子の一過的発現系を作製した。T87 細胞に遺伝子を発現させるためにカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来 35S プロモーターの下流に目的の微生物型ロドプシン遺伝子と蛍光タンパク質である Venus 遺伝子を導入し、微生物型ロドプシンの C 末端側に Venus が付加された融合タンパク質として発現するコンストラクトを作製した。蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現させることにより、細胞内での発現量及び発現部位の可視化を可能にした。T87 細胞を酵素処理することにより細胞壁を分解処理したプロトプラストを作製し、ポリエチレングリコール法を用いて遺伝子導入を行った。遺伝子導入処理後に all-trans retinal を添加したプロトプラスト培養用培地中で一晩培養し、発色団を結合したタンパク質を発現させた。また、アグロバクテリウム法を用いて微生物型ロドプシンを恒常的に発現する T87 細胞の形質転換体作製を行った。

光による膜電位変化量の確認には膜電位指示薬 Bis (1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (DiBAC₄(3))を用いた。DiBAC₄(3)でプロトプラストを染色後、マイクロプレートリーダー内で光照射と DiBAC₄(3)由来の蛍光検出を行い、DiBAC₄(3)由来の蛍光強度変化から膜電位変化を検出した。

(2) 膜電位操作ツールとしての新奇微生物型ロドプシン分子の探索及び機能解析

膜電位操作ツールとして新たに利用可能な分子を探索する目的で、異種発現系を用いたタンパク質分子の機能解析を行った。メタゲノム解析及び公共データベース等に登録された遺伝子情報を元に微生物型ロドプシン様遺伝子の配列を取得し、人工遺伝子を合成した。これらの遺伝子を大腸菌・酵母 *Pichia pastoris*・哺乳類細胞に導入してタンパク質発現を誘導した。タンパク質発現が確認された分子については、光依存的なイオン輸送能の解析や精製タンパク質の光反応の解析を行った。イオン輸送能の解析方法としては、大腸菌懸濁液を用いた光依存的 pH 変化の測定、及び哺乳類細胞を用いたパッチクランプ測定を行った。光反応の解析には精製タンパク

質を用いた過渡吸収測定による光反応中間体の経時変化測定、及び赤外分光法を用いた光反応中間体の構造解析を行った。

4. 研究成果

(1)微生物型ロドプシンによる膜電位操作系の構築
微生物型ロドプシン遺伝子を導入する植物培養細胞として、*Arabidopsis thaliana* 由来 T87 株の培養系を新しく導入し、安定して継代できる培養系を構築した。膜電位操作ツールの候補として外向きプロトンポンプ GR・外向きナトリウムポンプ KR2・内向き Cl⁻ポンプ FR・カチオンチャンネル hChR2・GtCCR4・アニオンチャンネル GtACR1 の 6 種を選び、それぞれのタンパク質の C 末端側に蛍光タンパク質 Venus を付加した融合タンパク質として発現した。C 末端側に融合させた Venus の蛍光によりタンパク質局在を検出した結果、外向きナトリウムポンプ KR2、カチオンチャンネル GtCCR4、アニオンチャンネル GtACR1 で原形質膜への局在が確認された。また、膜電位指示薬 DiBAC4(3)を用いて、530nm の光照射に伴う膜電位変化を検出したところ、KR2 および GtCCR4 で、光依存的な膜電位の変化が観測された (図 2)。これらの分子はいずれも蛍光強度が光照射で増加していることから光依存的な膜電位の過分極が起きており、植物細胞においても微生物型ロドプシンを用いて光依存的な膜電位操作が可能であることを示した。

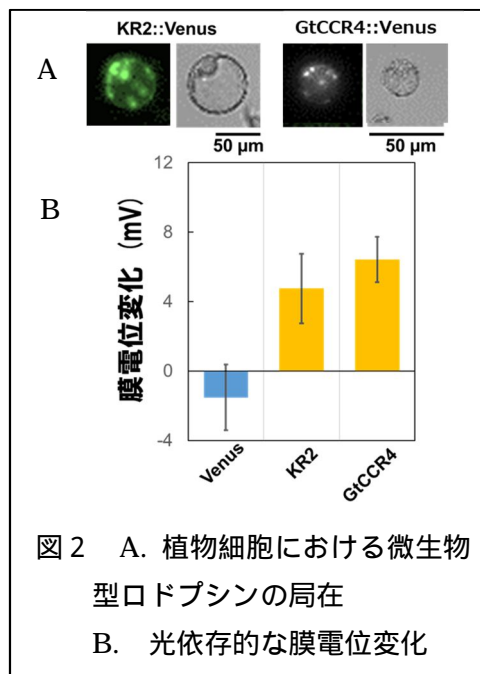


図 2 A. 植物細胞における微生物型ロドプシンの局在
B. 光依存的な膜電位変化

しかし、一過的遺伝子導入・タンパク質発現系では遺伝子の導入効率が細胞数全体の 1 割程度と非常に低かったため、検出された蛍光強度変化が非常に小さく、今回有意な蛍光強度変化が見られなかった分子では十分な感度で膜電位変化を観測できていない可能性が考えられた。また、このような低い遺伝子導入効率では、膜電位制御の詳細を観察するための電気生理学的測定が非常に困難であった。そこで、すべての細胞にタンパク質を発現した状態で膜電位変化を観測できるようにするため、アグロバクテリウム法を用いて微生物型ロドプシンを恒常的に発現する T87 細胞の形質転換体作製を行い、6 種すべての恒常的発現株を取得した。膜電位計測の詳細について明らかにするため、得られた発現細胞から調製したプロトプラストを用いてパッチクランプ測定による光電流の計測を試みたが、計測に必要なパッチ電極との接触面でのギガオームシールが形成されず、計測ができなかった。この原因として、プロトプラスト表面に細胞壁、特に多糖類で構成される二次細胞壁と思われる残渣があり、原形質膜がパッチ電極に密着するのを妨げていると考えられた。この点に関しては、プロトプラストの処理条件、特に酵素処理の条件について検討を行う必要がある。

今回光依存的な膜電位変化が観測できなかった理由として、一過的発現系・恒常的発現系のいずれにおいても、原形質膜での局在以外に細胞内にタンパク質が凝集していると思われる蛍光シグナルが観測されたことも挙げられる、この問題の解決にあたっては、膜移行効率を上げるためにシグナル配列等を付与する等、発現用コンストラクトの改良も必要である。

(2)膜電位操作ツールとしての新奇微生物型ロドプシン分子の探索及び機能解析

我々は新奇カチオンチャンネル GtCCR4 を海洋性クリプト藻 *Guillardia theta* から単離した。この分子はこれまで報告されてきたカチオンチャンネルとは構造上の特性が異なっており、イオン輸送や光反応に関する特性を解析した(Yamauchi et al., 2017, *Biophysics and Physicobiology*)。GtCCR4 は、動物細胞でのイオン輸送測定結果から、イオン輸送能や光による不活性化の点で、これまで最も広く用いられているクラミドモナス由来チャンネルロドプシン ChR2 よりも光遺伝学に有用であることが示されている。さらに、GtCCR4 は極大吸収波長が 536nm で、植物の内生光受容体の極大吸収波長と重複しない。従って本研究での植物細胞の膜電位制御においても GtCCR4 は重要な候補分子であり、実際に前述の植物細胞発現系で膜電位操作が可能であることが示された。また、環境メタゲノム解析で得られた配列情報を元に、アスガルド属古細菌が持つ内向きプロトンポンプ Shizorhodopsin が発見され、この分子のイオン輸送及び光反応特性を解析した (Inoue et al., 2020, *Science Advance*)。内向きプロトンポンプは、ミトコンドリアや葉緑体等のオルガネラに発現することでエネルギー生産の調節ツールとして利用できる。

また、我々は機能性メタゲノム解析から新奇のロドプシンファミリーとしてヘリオロドプシンを発見し、その構造・機能解析を行った (Pushkarev et al., 2018, *Nature*; Shihoya et al. 2019, *Nature*)。ヘリオロドプシンは未だ機能が不明の分子であるが、膜に対する配向性がこれまで知られていた動物ロドプシン及び微生物ロドプシンとは逆転しており、外部から発色団であるレチナールを取り込むことができる空隙が存在するなどの特徴が明らかになった。今後の研究の進展で機能が明らかにされれば、新たなオプトジェネティクスツールとしての応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 W. Shihoya, K. Inoue, M. Singh, M. Konno, S. Hososhima, K. Yamashita, K. Ikeda, A. Higuchi, T. Izume, S. Okazaki, M. Hashimoto, R. Mizutori, S. Tomida, Y. Yamauchi, R. Abe-Yoshizumi, K. Katayama, S.P. Tsunoda, M. Shibata, Y. Furutani, A. Pushkarev, O. Beja, T. Uchihashi, H. Kandori, O. Nureki	4. 巻 574
2. 論文標題 Crystal structure of heliorhodopsin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 132 ~ 136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1604-6	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 Inoue Keiichi, Tsunoda Satoshi P., Singh Manish, Tomida Sahoko, Hososhima Shoko, Konno Masae, Nakamura Ryoko, Watanabe Hiroki, Bulzu Paul-Adrian, Banciu Horia L., Andrei Adrian-Stefan, Uchihashi Takayuki, Ghai Rohit, Beja Oded, Kandori Hideki	4. 巻 6
2. 論文標題 Schizorhodopsins: A family of rhodopsins from Asgard archaea that function as light-driven inward H ⁺ pumps	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aaz2441	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 Pushkarev Alina, Inoue Keiichi, Larom Shirley, Flores-Urbe Jose, Singh Manish, Konno Masae, Tomida Sahoko, Ito Shota, Nakamura Ryoko, Tsunoda Satoshi P., Philosof Alon, Sharon Itai, Yutin Natalya, Koonin Eugene V., Kandori Hideki, Oded Beja	4. 巻 558
2. 論文標題 A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 595 ~ 599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-018-0225-9	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 該当する

1. 著者名 Yamauchi Yumeka, Konno Masae, Ito Shota, Tsunoda Satoshi P., Inoue Keiichi, Kandori Hideki	4. 巻 14
2. 論文標題 Molecular properties of a DTD channelrhodopsin from <i>Guillardia theta</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 57 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2142/biophysico.14.0_57	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23件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 16件）

1. 発表者名 M. Konno, K. Inoue, R. Ghai, O. Beja, H. Kandori
2. 発表標題 Characterization of the inward proton transport pathway in Schizorhodopsin
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Konno
2. 発表標題 Microbial rhodopsins leading to development of optogenetic tool.
3. 学会等名 Symposium “Dive into Brain Abyss by Optogenetics.” The 56rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Konno
2. 発表標題 Molecular properties of new type microbial rhodopsins
3. 学会等名 International Symposium on “Optobiototechnology” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今野雅恵, 神取秀樹
2. 発表標題 微生物型ロドプシンを用いた植物細胞の膜電位操作系の開発
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Yamauchi, M. Konno, S. Ito, Y. Kato, S. Tsunoda, K. Inoue, H. Kandori
2. 発表標題 Molecular properties of the light-gated cation channel from cryptophyta <i>Guillardia theta</i>
3. 学会等名 253rd American Chemical Society National Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Yamauchi, M. Konno, S. Ito, S. Tsunoda, K. Inoue, H. Kandori
2. 発表標題 Molecular properties of a DTD cation channelrhodopsin from marine algae
3. 学会等名 International Symposium on Biophysics of Rhodopsins (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Yamauchi, M. Konno, S. Ito, S. Tsunoda, K. Inoue, H. Kandori
2. 発表標題 Spectroscopic analysis of a light-gated cation channel GtCCR4 from marine algae
3. 学会等名 The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山内夢叶、今野雅恵、伊藤奨太、角田聡、井上圭一、神取秀樹
2. 発表標題 光駆動カチオンチャネルGtCCR4を対象とする光反応過程の解析
3. 学会等名 第7回CSJ化学フェスタ2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山内夢叶、今野雅恵、伊藤奨太、井上圭一、神取秀樹
2. 発表標題 海洋性真核藻類がもつ光駆動カチオンチャネルGtCCR4の光反応中間体の解析
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第43回討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山内夢叶、今野雅恵、伊藤奨太、井上圭一、神取秀樹
2. 発表標題 海洋性真核藻類がもつ光駆動カチオンチャネルGtCCR4の光反応解析
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018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
研究協力者	神取 秀樹 (Kandori Hideki) (70202033)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (13903)	
研究協力者	井上 圭一 (Inoue Keiichi) (90467001)	東京大学・物性研究所・准教授 (12601)	
研究協力者	角田 聡 (Tsunoda Satoshi) (00598857)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・研究員 (13903)	