

令和元年5月29日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19437

研究課題名(和文)ミトコンドリアオプトジェネティクス技術基盤の構築

研究課題名(英文)A novel approach to elucidate mitochondrial functions with mitochondria-targeted opsins

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：オプトジェネティクスツールのひとつとして用いられている光駆動プロトンポンプ・ArchTに新規に同定したミトコンドリアターゲティングシグナル(Mito-X)を付加した分子を培養細胞に発現させたところ、効率よくミトコンドリアに局在することが免疫組織化学的に明らかになった。予備的生理実験では、この分子が期待通りのトポロジーでミトコンドリア内膜に発現し、光照射によりプロトンを送っていることを支持するデータが得られたが、詳細についてはさらなる機能解析が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで主にニューロンの活動制御の手段として用いられてきたオプトジェネティクスが、本研究の成果により細胞内小器官のひとつであるミトコンドリアに効率よく分子ツールをターゲティングさせるシグナルの発見に成功し、新たな分子ツールを創出したことで、薬理学的手法では実現が困難であった可逆的かつ時空間分解能に優れた新たな次元のミトコンドリア細胞生理学研究やミトコンドリア変性に伴う様々な病態の原因解明・治療法の開発研究(ミトコンドリアオプトジェネティクス)への展開とその発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We successfully identified a novel mitochondria-targeting signal (tentatively named Mito-X signal). When the Mito-X signal was conjugated with a light-driven proton pump ArchT, the protein (ArchT(Mito)) was expressed effectively in mitochondria. Immunocytochemical staining revealed that the expression of ArchT(Mito) was well overlaid with that of the mitochondrial marker molecule such as TOMM22 and ATP5A1. A preliminary physiological experiment showed that the ArchT(Mito) was inserted into an inner membrane of mitochondria with an appropriate orientation. Further experiments requires that the ArchT(Mito) actually generates a proton gradient across the inner mitochondrial membrane with light.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア オプトジェネティクス プロトンポンプ ロドプシン ターゲティングシグナル

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、単細胞緑藻類の一種であるクラミドモナスの光走性を制御している光受容陽イオンチャネル・チャンネルロドプシン 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。この技術は今ではオプトジェネティクスと呼ばれ、ChR2 のみならず、光駆動プロトンポンプ、光駆動 Cl⁻ポンプ、光駆動 Na⁺ポンプなどの種々の微生物型ロドプシンを用いることで、脳神経回路網において遺伝学的あるいは空間的に同定されたニューロンのアクティビティーを自在に光で操作する技術として主に神経科学研究に広まっている。さらに研究代表者らは、オプトジェネティクスツールとしての ChR2 の最適化にも取り組み、細胞膜発現効率やコンダクタンスに優れ、脱感作が少なく、on/off キネティクスに優れた改変型チャンネルロドプシンの開発にも成功していた。時空間分解能に優れた制御・計測を得意とするオプトジェネティクスの新たな展開の場として、研究代表者らは細胞内小器官（オルガネラ）の光機能制御の技術的基盤構築を目指していた。

本研究では、オプトジェネティクスツール分子のミトコンドリアへの局在化技術の開発を提案した。ミトコンドリアは、ニューロンやグリアの生理・病態機序に深く関わっているオルガネラである。ミトコンドリアの働き（具体的にはプロトンや Ca²⁺の流出入、ミトコンドリア膜電位、ATP 産生）を光で操作できる分子ツールの開発が成功すれば、従前の薬理的手段では実現が困難であった可逆的かつ時空間的分解能に優れた新たな次元のミトコンドリアの細胞生理学研究や病態関連研究（ミトコンドリアオプトジェネティクス）への展開とその発展に貢献できる期待があった。

2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリアからのプロトンや Ca²⁺流出入、ミトコンドリア膜電位、ATP 産生を時空間分解能に優れた光で制御し、その効果や影響を解析する新たな研究を展開するための技術基盤の構築を目指す。技術基盤の要である分子ツール開発においては、光受容イオンチャネルや光駆動プロトンポンプ等の微生物型ロドプシンをツールとして用い、それらのミトコンドリアへの局在に必要なアミノ酸配列モチーフあるいはミトコンドリア膜貯留構造の探索と、局在効率を最大限にするための局在化構造の最適化を行う。ミトコンドリアからのイオン流出入制御、ミトコンドリア膜電位制御、ATP 産生の光制御を可能にする実用的なミトコンドリアオプトジェネティクスツールを創出することで、ミトコンドリアオプトジェネティクスの展開を盤石なものにする。

3. 研究の方法

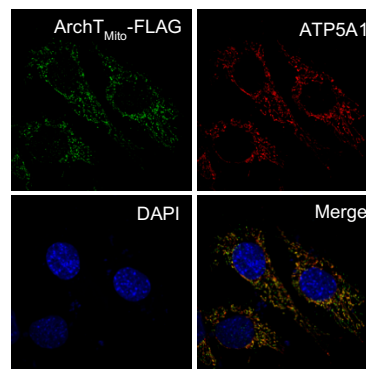
ミトコンドリアオプトジェネティクスを展開するための技術基盤を構築するために、以下の実験を実施した。

(1) 光受容イオンチャネルや光駆動イオンポンプなどの微生物型ロドプシンに、種々のミトコンドリア局在化シグナルあるいはミトコンドリア膜貯留構造を付加した組換えタンパク質遺伝子を作製し、培養哺乳類細胞に発現させることで、微生物型ロドプシンを効果的かつ効率よくミトコンドリアにターゲティングさせる局在化シグナル、あるいはミトコンドリア膜貯留構造を同定し、複数の候補分子ツールを作製する。

(2) 候補分子ツールを用いて、光刺激によるミトコンドリア内腔内の pH 変動の蛍光イメージング、光刺激によるミトコンドリア膜電位 (Ψ_m) 変動の計測、光刺激による細胞内 ATP 濃度変動の計測を行う。また、ミトコンドリアは細胞内カルシウムイオンストアとして重要は働きを担っていることから、光刺激による細胞内あるいはミトコンドリア内腔内の Ca²⁺濃度の変動を蛍光イメージングなども試みることで、実用的なミトコンドリア光制御ツールを選抜する。

4. 研究成果

(1) 7 回膜貫通光駆動プロトンポンプの一種である ArchT をミトコンドリアに局在させる新規ミトコンドリアターゲティングシグナル（ここでは仮に Mito-X と呼ぶ）の同定に成功した。Mito-X シグナルを付加した ArchT (以下、ArchT_{Mito} と呼ぶ) を培養細胞に発現させるため、数種類の哺乳類細胞発現プラスミドを作製し、培養細胞に遺伝子導入、組換えタンパク質を発現させた後に、その発現部位を免疫染色により同定したところ、ミトコンドリアマーカーとして知られているミトコンドリア外膜タンパク質 TOMM22 や、ミトコンドリア ATP 合成酵素サブユニットのひとつである ATP5A1 を特異的に認識する抗体を用いて得られた免疫染色画像とよく一致するものが得られた。ArchT_{Mito} の発現を確



認するために、黄色蛍光タンパク質 (eYFP) をタグとして用いた場合には、ミトコンドリアマーカーの発現と一致する免疫染色画像は得られなかったが、FLAG タグを用いた場合でよく一致する免疫染色画像が得られた。このことから、ArchT_{Mito} のタグとして蛍光タンパク質は不適であり、FLAG タグのような短いペプチドタグが適していることがわかり、アクチュエーターとしての ArchT_{Mito} の分子構成の最適化を行った。

(2) ミトコンドリア内腔の pH 変化を計測するために、pH レポーター分子 (COX8-eYFP) と ArchT_{Mito} を培養細胞に同時に発現させて光刺激を行うと、光刺激に同期して eYFP の蛍光強度が増加する傾向が予備実験において得られた。このことから、ArchT_{Mito} がミトコンドリア内膜に期待する配向で挿入、発現していることが期待された。さらなる詳細な解析を試みるための実験を計画していたが、2018 年 7 月以降からの実験室の大幅な改装改築工事等により、細胞培養や機能解析実験を継続して実施することが困難となり、最適化した ArchT_{Mito} の機能解析とその評価は十分には行えなかった。今後の研究によって、その詳細な機能解析を試みる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Liu Y, Ohshiro T, Sakuragi S, Koizumi K, Mushiake H, Ishizuka T, Yawo H (2019) Optogenetic study of the response interaction among multi-afferent inputs in the barrel cortex of rats. *Sci Rep* 9(1):3917. (査読有)
- ② Asano T, Igarashi H, Ishizuka T, Yawo H (2018) Organelle Optogenetics: Direct Manipulation of Intracellular Ca²⁺ Dynamics by Light. *Front Neurosci* 12:561. (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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：
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：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： 八尾寛

ローマ字氏名： YAWO, Hiromu

※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。