

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06168

研究課題名（和文）細胞内イオン環境の光制御のための新規光感受性イオンチャネルの創製

研究課題名（英文）Creation of photo-activated ion channel for regulating intracellular ionic environment by light

研究代表者

平野 美奈子（Hirano, Minako）

岡山大学・ヘルスシステム統合科学学域・准教授

研究者番号：80585167

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、非侵襲な光での細胞内イオン環境制御による細胞機能操作を目指して、特定の波長の光で活性が制御される新規光感受性イオンチャネルを創製することを目的とした。光感受性イオンチャネルの構成要素となる光活性化アデニル酸シクラーゼ（PAC）の構造機能相関を調べ、光感受性に関与する部位を同定したほか、特定の部位の光依存的な構造変化を明らかにした。これらの情報はPACとカリウムチャネルを融合させた光感受性キメラチャネル変異体の設計に役立つと考えられる。また、簡便なチャネル電流測定法と光照射装置を組み合わせ、光感受性キメラチャネル変異体の光依存的な活性を効率的に調べることができる系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、新規光感受性イオンチャネルの構成要素であるPACの構造機能相関に関する情報が得られた。今後この情報をもとにカリウムチャネルとPACのキメラ変異体を設計することにより、光感受性が付与されたカリウムチャネルが創製できるであろう。すでにカリウムチャネルのイオン透過性をカルシウム透過性に改変することには成功しているため、光感受性カルシウムチャネルも創製できるはずである。これらの光感受性チャネルを用いれば、非侵襲な光で細胞内のイオン環境を変化することができるため、イオン環境に依存した疾患の原因解明や、究極的にはイオン環境の調節不全による疾患の治療のツールとしての展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to create a novel light-sensitive ion channel whose activity is controlled by non-invasive light to manipulate cellular functions by regulating the intracellular ionic environment with light. The structure-function relationships of the photoactivated adenylate cyclase (PAC) were investigated to identify the sites involved in photosensitivity, and light-dependent conformational changes of specific sites were also revealed. This information is expected to be useful for designing photosensitive chimeric channel mutants that combine PAC with potassium channels. Additionally, we established a system that combines a simple channel current measurement method with a light irradiation device, enabling the efficient examination of the light-dependent activity of these photosensitive chimeric channel mutants.

研究分野：生物物理学、光遺伝学

キーワード：光遺伝学 イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

近年、非侵襲な光刺激によって活性が制御される蛋白質が、生命現象を制御する技術として用いられるようになった。この技術は光照射によって特定の生命現象を制御できるため、多くの生体分子が複雑に相互作用し、時々刻々と変化する生命現象を理解するための有用な技術となっている。特に光刺激で陽イオンの透過が制御される膜タンパク質であるチャネルロドプシン2は、神経細胞の興奮を引き起こすツールとして脳・神経分野の研究に広く使われている。チャネルロドプシン2以外にも、光によって様々な種類のイオンの透過が制御される天然の膜タンパク質が微生物から見つかってきているが、イオンの透過率や選択性に問題があり (Gradinaru V et al. J Neurosci. 2007) 細胞内で十分なイオン環境の変化を引き起こすのに最適な天然のタンパク質はまだ見つかっていない。そのため、チャネルロドプシン2への変異導入により特定のイオン選択性を高める試みや (Wietek J et al. Science 2014) 高いイオン透過率とイオン選択性を有するイオンチャネルに光感受能を持たせる試み (Cosentino C et al. Science 2015) がいくつか報告されてきている。しかし、いずれも開発途上であり、最適なものは作られていない。さらに、生体深部まで透過する赤色光でイオンの透過を制御できる膜タンパク質は未だ存在しない。

本研究では、これまで我々が解明してきた K⁺チャネル(KcsA チャネル)の構造機能相関の知見を基に、光感受性タンパク質とチャネルを融合することで光感受性イオンチャネルを創製することを目的とした。光感受性 K⁺チャネルの創製により神経細胞の興奮の抑制の光制御が可能になり、光感受性 Ca²⁺チャネルの創製により情報伝達の鍵となる Ca²⁺が関わる生命現象を様々な細胞で光制御することが可能となる。さらに、この研究を通してイオンチャネルだけでなく光感受性タンパク質の構造機能相関の理解が促進すると考えらえる。

2. 研究の目的

本研究では、非侵襲な光での細胞内イオン環境制御による細胞機能操作を目指して、特定の波長の光で活性が制御される新規光感受性イオンチャネルを創製することを目的とした。この目的のため、光感受性タンパク質の一種である、青色光刺激により cAMP を産生する光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC) を KcsA チャネルに付加し、KcsA チャネルに光感受能を付与することを目指した。そのため、以下の4点を目標とし、研究を進めた。

- (1) これまでに作製した KcsA と PAC のキメラチャネル変異体の光感受能の計測
- (2) ユレモ由来の PAC (OaPAC) の活性制御機構の解明
- (3) OaPAC の光依存的な構造変化の解明
- (4) キメラチャネル変異体の光依存的な活性の簡便な計測法の確立

3. 研究の方法

(1) 変異体の作製

KcsA チャネルと OaPAC のキメラチャネル変異体や、OaPAC の C 末端領域を欠失した変異体は、HD Cloning Kit (Clontech) を用いて作製した。また、OaPAC をテトラメチルローダミン (TMR) - マレイミドで標識するためのシステイン残基置換は、QuikChange site-directed mutagenesis kit (アジレント・テクノロジー) を用いて行った。作製した変異体は、大腸菌用の発現ベクターである pQE30 ベクターや哺乳細胞用の発現ベクターである pEB ベクターに導入した。作製した変異体にはすべてヒスチジンタグを付加した。

(2) タンパク精製

キメラチャネル変異体の精製：変異体の遺伝子は大腸菌に形質転換後、IPTG によって変異体の発現を誘導した。変異体を発現した大腸菌を回収し、膜画分を界面活性剤 n-decyl-β-D-maltoside で可溶化後、ヒスチジンタグに選択的に結合する TALON affinity column (タカラバイオ (株)) で変異体を単離・精製した。

OaPAC 変異体の精製：変異体の遺伝子は大腸菌に形質転換後、IPTG により発現を誘導した。大腸菌を回収後、超音波破砕機で破砕し、遠心により細胞内画分を上清として得た。TALON affinity column (タカラバイオ (株)) を用いて細胞内画分から変異体を単離した。

(3) 脂質平面膜法によるチャネル活性評価

精製したキメラチャネル変異体をリポソームに再構成後、電気生理学的手法 (脂質平面膜法) で透過するイオンを電流として測定し、活性を評価した。

(4) HEK 細胞での OaPAC の発現と光活性測定

cAMP 依存的に発光する Glo sensor-22F cAMP (プロメガ) を安定に発現する HEK 細胞に、リポフェクション法を用いて OaPAC またはその変異体の遺伝子を導入してタンパク質の発現を促した。活性測定の 30 分以上前に基質であるルシフェラーゼを培養液に添加し、青色光 (450 nm) を HEK 細胞に 20 秒間照射した後の OaPAC からの cAMP 産生を発光として EM-CCD カメラ (浜松ホトニクス) で捉えた。Image J により、細胞毎の輝度を数値化した。

(5) TMR 標識 OaPAC 変異体の作製

TMR-マレイミド(Thermo Fisher)と特定のアミノ酸をシステイン残基に置換した OaPAC を 1:5 の割合で混ぜ、4 で一晩静置し、システイン残基への TMR の標識を促した。その後、TALON affinity column を用いて、未結合の TMR-マレイミドを除き、標識された OaPAC 変異体を得た。

(6) TMR 標識 OaPAC 変異体の光依存的な蛍光強度変化の測定

TMR 標識 OaPAC に 20 秒間青色光 (450 nm) を照射して活性化させた後、照射を止めて不活性化した時の TMR の蛍光の変化を蛍光分光光度計 (島津製作所) で測定した。

(7) 簡便な光依存的なチャンネル電流測定

担体 (表面を PEG 修飾により親水性にした金プローブまたはハイドロゲルビーズ) をヒスチジンタグが結合できるように NTA 修飾をした。担体にヒスチジンタグ付きのキメラチャンネル変異体を固定し、測定溶液の上に脂質溶液を重層したチャンバーの上から担体をそれらの溶液の境界面まで移動させることにより、境界面に脂質二重層膜を作製すると同時にチャンネル変異体を膜に組み込んだ。チャンネル電流が確認された後、青色光を担体に照射してチャンネル電流の変化を記録した。

4. 研究成果

(1) これまでに作製した KcsA と PAC のキメラチャンネル変異体の光感受能の計測

これまでに作製していた KcsA チャンネルの膜貫通領域に PAC の全長や一部をランダムに付加したキメラチャンネル変異体を大腸菌で発現させ、精製し、電気生理学的手法の一種である脂質平面膜法で活性 (イオン透過) の光依存性を調べた。しかしながら、どの変異体でも測定した光強度では光依存的なチャンネル電流の変化はみられなかった。KcsA チャンネルに関してはこれまでに解明した構造機能関連の情報が豊富にあったが、PAC に関しては構造機能関連の情報がほとんどなかった。PAC をランダムに KcsA チャンネルに付加するのではなく、PAC の構造機能関連の情報を基に、キメラ変異体を設計する必要があることがわかった。

(2) ユレモ由来の PAC (OaPAC) の活性制御機構の解明

光感受性イオンチャンネルの構成要素となる PAC の活性制御機構を解明し、光感受性キメラチャンネル変異体の設計に役立てるため、ユレモ由来の PAC (OaPAC) の活性制御機構を調べた。HEK 細胞に OaPAC の変異体を発現させ、cAMP 産生能を調べた結果、C 末端領域が活性に影響を与えることがわかった。C 末端領域を欠失した変異体は野生型と比べて低い光強度で cAMP を産生し、C 末端領域のアミノ酸残基の欠失数が増すほど光感受性が増した。また、9 アミノ酸残基以上の欠失で光感受能が最大となった。これらのことから、C 末端領域が光刺激に依存した活性に影響を与える部位であることが明らかとなった。よって、光感受性キメラチャンネル変異体作製時にはこの領域に変異を導入することで、光感受性を変化できる可能性があることがわかった。

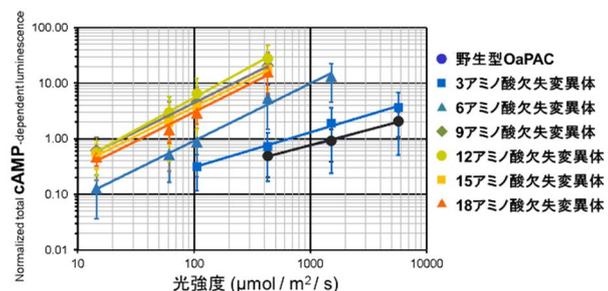


図 1 OaPAC の C 末端領域の光活性への影響

OaPAC の C 末端から $3 \times n$ アミノ酸残基欠失した変異体の様々な光強度の照射による cAMP 産生量を、cAMP のバイオセンサーを用いて測定した。C 末端の欠失数が増すほど低い光強度で cAMP を産生し、9 アミノ酸残基の欠失以上は光感受性に変化はなかった。

(3) OaPAC の光依存的な構造変化の解明

光刺激によって ATP から cAMP を生産する OaPAC の ATP 結合部位の構造が光依存的に変化することを、蛍光色素の環境依存的な特性を利用して明らかにした。具体的には、PAC の ATP 結合部位付近またはタンパク質表面に位置するアミノ酸をシステイン残基に置換した変異体を作製し、精製後、そのシステイン残基をテトラメチルローダミン (TMR) - マレイミドで特異的に標識した。TMR は疎水性環境下では蛍光強度が高く、親水性では低いといった特性がある。

ATP 結合部位付近に TMR 標識した OaPAC への青色光照射オン・オフの蛍光強度の変化を測定した結果、光照射時には蛍光強度が弱まり、光照射オフ時には蛍光強度が高まっていき、20 秒以内に暗所の蛍光強度に戻る様子が観察された。このことにより、ATP 結合部位付近は活性化時には親水的な環境下に存在する一方、暗所では疎水的な環境にあることがわかった。つまり、暗所時にはタンパク質内部に位置する ATP 結合部位が、光照射時には ATP が結合しやすいように外部に晒された位置に構造変化すること示唆された。このことにより、光感受性キメラチャンネル変異体作製時にはこの領域にイオンチャンネルの活性制御部位を結合させることで、この領域の光

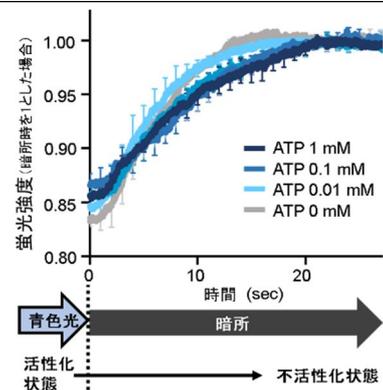


図 2 テトラメチルローダミン (TMR) の特性を利用した OaPAC の構造変化の検出

ATP 結合部位を TMR で標識した OaPAC 変異体の青色光照射オン・オフによる蛍光強度変化を測定した。照射オフ後約 20 秒で暗所の定常状態の蛍光強度に移行した。

依存的な構造変化を利用してイオンチャネルを光制御できる可能性があることが示唆された。

また、タンパク質表面に位置するアミノ酸のうち V350 と T309 に標識した変異体でも ATP 結合部位に標識した変異体と同様に、青色光照射によって蛍光強度が低下し、照射オフ後 20 秒以内に暗所時の蛍光強度に戻る様子が確認された。このことから、これらのアミノ酸が存在する部位も活性化状態と不活性化状態で構造状態が異なり、活性化状態から不活性化状態に約 20 秒で戻ることがわかった。よって、PAC の V350 や T309 が存在する C 末端領域付近にイオンチャネルを融合させることができれば、光依存的な PAC の構造変化を利用してチャネルの開閉を光制御できると考えられる。

一方、タンパク質表面の I325 と S311 に標識した変異体では蛍光強度の変化は見られなかった上、活性がほとんどなくなっていた。変異による影響で構造変化が起きず、ATP から cAMP への変換が起きなかったと考えられる。

(4) キメラチャネル変異体の光依存的な活性の簡便な計測法の確立

作製した光感受性チャネルの候補変異体の光依存的な活性を簡便に調べる方法を確立した。これまで、脂質平面膜法という電気生理学的手法な手法で作製したキメラチャネル変異体の活性を調べていたが、測定が煩雑で測定効率が非常に低かった。そのため、我々が近年開発したプローブ操作のみでチャネル活性(チャネル電流)が簡便に測定できる方法に光照射系を組み合わせた系を開発した。この測定系により、キメラチャネル変異体の活性を従来法より 100 倍以上高い効率で測定することが可能になった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hirano M, Tomita M, Takahashi C, Kawashima N, Ide T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of an automated system to measure ion channel currents using a surface-modified gold probe.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17934
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97237-z.	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 Hirano Minako, Yamamoto Daiki, Asakura Mami, Hayakawa Tohru, Mise Shintaro, Matsumoto Akinobu, Ide Toru	4. 巻 11
2. 論文標題 A Lipid Bilayer Formed on a Hydrogel Bead for Single Ion Channel Recordings	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 1070 ~ 1070
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi11121070	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 Minako Hirano, Masumi Takebe, Tomoya Ishido, Toru Ide, Shigeru Matsunaga	4. 巻 9
2. 論文標題 The C-terminal region affects the activity of photoactivated adenylyl cyclase from <i>Oscillatoria acuminata</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56721-3	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北村有希、井出徹、平野美奈子
2. 発表標題 Structural changes of adenylyl cyclase from <i>Oscillatoria acuminata</i> in response to blue light stimulation
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野美奈子、建部益美、北村有希、三好佑奈、井出徹
2. 発表標題 光活性化アデニル酸シクラーゼの活性制御機構の理解に向けた研究・開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野 美奈子, 富田 正久, 高橋 稚佳子, 川島 信幸, 井出 徹
2. 発表標題 Development of an automated system for measuring channel currents using a gold probe
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野 美奈子, 富田 正久, 高橋 稚佳子, 川島 信幸, 井出 徹
2. 発表標題 Development of a system for automated ionic current measurement
3. 学会等名 第58回 日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Minako Hirano, Tomoya Ishido, Masumi Takebe, Toru Ide, Shigeru Matsunaga
2. 発表標題 Identification of the activity-regulating site in the photoactivated adenylylate cyclase (0aPAC)
3. 学会等名 第57回 日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoya Ishido, Toru Ide, Minako Hirano
2. 発表標題 Light-dependent structural states of OaPAC
3. 学会等名 第57回 日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoya Ishido, Toru Ide, Minako Hirano
2. 発表標題 Modifications of K+ channel property
3. 学会等名 第56回 日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 光活性化アデニル酸シクラーゼ	発明者 平野 美奈子、松永 茂、建部 益美	権利者 浜松ホトニクス 株式会社、学校 法人光産業創成
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-129374	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------