

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16090

研究課題名（和文）微生物型ロドプシンの包括的機能・構造解析に基づく新たなオプトジェネティクスの開拓

研究課題名（英文）Development of optogenetic tools based on the comprehensive and structural analysis of microbial rhodopsins

研究代表者

小島 慧一 (Keiichi, Kojima)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60819267

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：微生物型ロドプシンは、レチナールを発色団とする7回膜貫通型光受容タンパク質であり、生物の3大ドメインに幅広く存在し、イオン輸送体や光センサーなど多岐にわたる機能を示す。近年、ロドプシン分子は、動物細胞や個体の働きを光で操作する技術「オプトジェネティクス（光遺伝学）」のツールとして注目されている。本研究では、新奇微生物型ロドプシンの分子特性の解析と改変（基礎的研究）を行い、動物細胞や個体における様々な生命現象を光操作する新奇ツールの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ロドプシンは、光で生物個体や細胞の機能を制御する技術・オプトジェネティクス（光遺伝学）のツールとして注目されている。本研究では、オプトジェネティクスの技術基盤を拡大すべく、新たなロドプシン分子の同定と人工分子の開発（例：内向きプロトンポンプ、アニオンチャネル）に成功した。さらに、新しいオプトジェネティクス（例：高感度かつ低毒性な神経抑制、細胞運命の制御）の実証にも成功した。本研究で発見・開発した技術基盤により、様々な生命機能の光操作が可能となり、それら生命機能の分子メカニズムの理解が進むと期待できる。

研究成果の概要（英文）：Microbial rhodopsin is a family of photoreceptive seven-transmembrane proteins. They have been widely discovered in the three biological domains and show various light-dependent functions, such as ion transporters and light-sensors. Recently, microbial rhodopsins are utilized as central tools in optogenetics that can control the biological functions by light in cells and animals. In this research, we analyzed the structural and functional properties of new microbial rhodopsins and modified them by introducing mutations to understand their functional mechanisms. Based on the molecular analysis, we further developed new optogenetics methods to control several kinds of biological functions.

研究分野：生物物理学

キーワード：ロドプシン 光操作 オプトジェネティクス 光受容タンパク質 レチナール 分子改変 生物物理

1. 研究開始当初の背景

微生物型ロドプシンは、レチナールを発色団とする 7 回膜貫通型光受容タンパク質であり、生物の三大ドメイン(真核生物・古細菌・真正細菌)全てに存在し、イオン輸送体や光センサーなど多岐にわたる機能を示す。そのため、生物の光利用を支える基礎的な分子としてのみならず、動物細胞や個体の働きを光で操作する技術「オプトジェネティクス(光遺伝学)」のツールとして近年注目されている。例えば、オプトジェネティクスを生み出した分子であるチャンネルロドプシン(光駆動性カチオンチャンネル)は、神経細胞において光照射依存的に脱分極(神経興奮)を引き起こすことができる。一方で、細胞内から細胞外への H⁺ポンプや、細胞外から細胞内への Cl⁻ポンプは過分極(神経抑制)を引き起こすことができる。このように、イオン輸送型ロドプシンは、主に神経科学の分野で応用研究が進められてきた。

近年のゲノム科学の進展により、万を超えるロドプシン遺伝子が自然界には存在することが分かってきた。しかしながら、このような多様性に反して、動物細胞への適用やオプトジェネティクスツールとしての利用が行われている分子種は限られており、脳・神経系以外での光操作の例はほとんど見当たらない。

申請者の所属する研究室は、これまでの常識を覆すような新奇ロドプシン分子を同定・発見し、申請者自身もその分子特性の解析に貢献してきた。また、申請者は、微生物型ロドプシンと類似した動物型ロドプシンを対象として、動物細胞を用いた発現系で、分子特性の解析や改変に成功してきた実績を持つ。そのため、これらの経験・実績に基づいて、微生物型ロドプシンの分子特性の解析・改変を行い、動物個体や細胞へと展開することで、新たな光操作法の開発につながることを期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、新奇微生物型ロドプシンの分子特性の解析・改変を行い、生物個体や細胞へと適用することで、新奇光操作ツールの開拓を目的とした。

3. 研究の方法

申請者はこれまでに、多様なロドプシンを対象として、分光学・生化学的手法を用いた分子特性・機能の解析系を構築してきた。さらに、動物細胞であるヒト由来培養細胞(HEK293, HeLa 細胞)やマウス由来培養神経細胞(ND7/23 細胞)や、動物個体(線虫)における発現系を確立し、生物物理学・電気生理学的手法を用いた分子特性の解析系の構築も進めてきた。そこで、このような発現・解析技術を総動員し、以下に示す 2 つの手順で研究を遂行した。

(1) 分子特性の解析と改変 : 新奇分子の分子特性の解析・改変を行い、機能の作動原理を理解(基礎的理解)すると同時に新奇光操作ツールへの基盤を固めた。

最初に、分子系統的に特有な分子に着目し、大腸菌・動物培養細胞にレコンビナント体を発現させ、生化学的・生理学的・細胞生物学的手法を用いて機能の解析を行った。さらに、レコンビナント体の精製試料または膜試料を用いて、分光学的解析を行い、分子特性・光化学的特性の解析を行った。

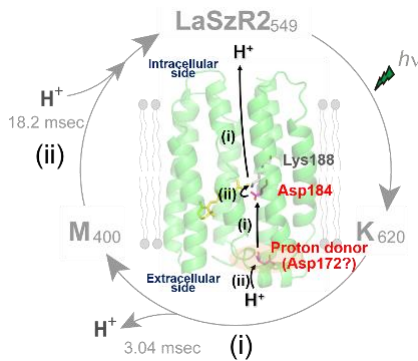
次に、これまでに同定・機能解析を行ってきた分子に着目し、分子特性の改変を試みた。結晶構造やホモロジーモデルを参考に、レチナール近傍や推定イオン透過経路に存在するアミノ酸を置換した変異体を作製した。大腸菌・動物培養細胞に変異体を発現させ、生化学的・生理学的・細胞生物学的手法を用いて、分子特性・機能の解析を行った。

(2) 分子の利用 : 基礎的研究で明らかになった分子特性や開発した改変体を利用し、細胞・個体レベルでの生命現象の光操作を行った。最初に、(1)で解析・開発を進めてきた光駆動性のアニオンチャンネルを、動物個体(線虫)や細胞(マウス神経, HEK293)に発現させ、生理学的手法・行動学的手法を用いて、膜電位の過分極応答および神経の抑制活性を定量的に評価した。次に、(1)で同定・解析を進めてきた外向き/内向きプロトンポンプロドプシン遺伝子に膜局在化シグナルを付加し、動物細胞(HeLa, SH-SY5Y 等)へと導入し、高発現系の取得を行った。ロドプシン発現細胞に、光を照射し、細胞生物学的手法を用いて、細胞死および経路の活性化を定量的に評価した。

4. 研究成果

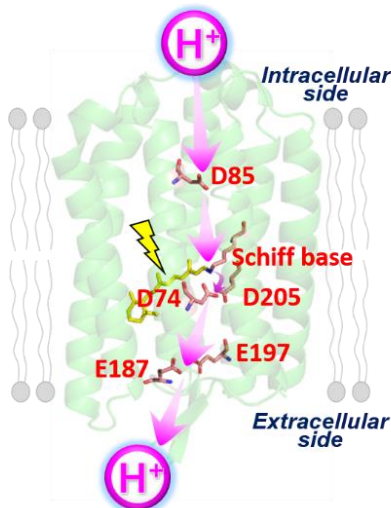
(1) 分子特性の解析と改変 : 複数の新奇分子の分子特性の解析を行い、機能の作動原理を理解することに成功した。さらに、アミノ酸変異を導入することで、分子特性の改変にも成功した。具体例を以下に示す。

①新規内向きプロトンポンプロドプシンの同定と解析：ロキ古細菌が持つロドプシン(LaSzR2)が、内向きプロトンポンプとして機能することを明らかにした。詳細な分光学的解析を行うことで、内向きプロトンポンプ輸送モデルを提案した【図1】。(Kojima et al., 2020 Sci. Rep. (b))



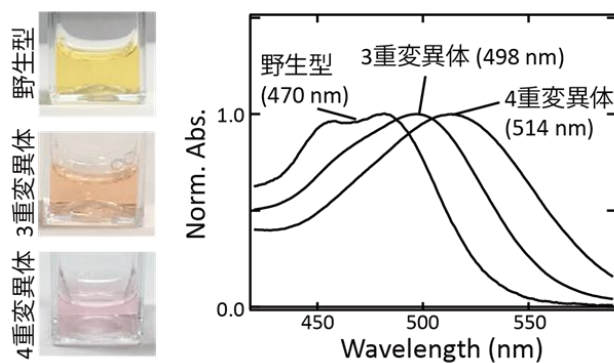
【図1】 LaSzR2 の光反応とプロトン輸送メカニズム

②耐熱性外向きプロトンポンプロドプシンの解析：耐熱性のプロトンポンプロドプシン(RxR)の構造解析・変異体解析を行い、RxRの膜貫通部位に存在するカルボン酸が協調的に働くことで、高熱環境下でも効率的にプロトンを輸送できることを明らかにした【図2】。(Kojima et al., 2020 Sci. Rep. (a), Ueta et al., 2020 Biophys. J.)



【図2】 RxR の構造とプロトン輸送メカニズム

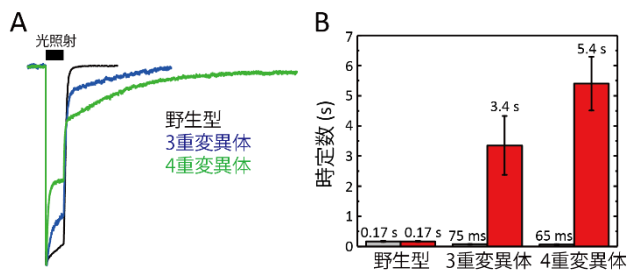
③アニオンチャネルロドプシンの解析と改変：アニオンチャネルロドプシン-2(GtACR2)の構造解析・変異体解析を行い、GtACR2の吸収波長、および光反応性に重要なアミノ酸の同定に成功した。さらに、レチナール近傍の4つのアミノ酸を置換することで、緑色感受性・長時間開口ステップファンクション型のアニオンチャネルの作成に成功した【図3】。(Kojima et al., 2020 J. Phys. Chem. Lett.)



【図3】 野生型 GtACR2 と各変異体のタンパク質の色(左)と吸収スペクトル(右)

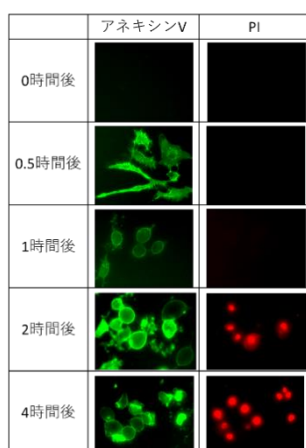
(2)分子の利用：ロドプシンおよび改変体の分子特性・機能を動物細胞・個体へと適用することで、新たな光操作法の確立に成功した。具体例を以下に示す。

①光神経抑制ツールの開発：GtACR2 を、線虫の神経細胞および動物細胞(マウス神経)に発現させ、既存の神経抑制性ツール(プロトンポンプ)と比べて約 1 万倍低い光強度で神経抑制が可能な低毒性ツールであることを実証した。さらに、開発した GtACR2 の多重変異体を動物細胞(HEK293)に発現させ、長時間かつステップファンクション性の過分極性電流を光誘導できることを示した【図4】。(Kojima et al., 2020 J. Phys. Chem. Lett.)



【図4】野生型 GtACR2 と各変異体の電流変化(A)とチャネル開口時間の比較(B)

②細胞運命の光操作法の開発：外向き/内向きのプロトンポンプ型ロドプシンを動物細胞(HeLa, SH-SY5Y 等)に発現させ、細胞内の pH を光制御することで、細胞死を光誘導/抑制することに成功した【図5】。なお、緑色光照射によって、4 時間程度で、HeLa 細胞の細胞死を誘導できることができた。



【図5】細胞死の光誘導。ロドプシン発現 HeLa 細胞のアポトーシスマーカー(アネキシン V)と細胞死マーカー(PI)の検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kojima K, Shibukawa A, Sudo Y	4. 巻 59(3)
2. 論文標題 The Unlimited Potential of Microbial Rhodopsins as Optical Tools	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 218-229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.9b00768	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 Kojima K, Ueta T, Noji T, Saito K, Kanehara K, Yoshizawa S, Ishikita H, Sudo Y	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Vectorial Proton Transport Mechanism of RxR, a Phylogenetically Distinct and Thermally Stable Microbial Rhodopsin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-57122-2	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 Kojima Keiichi, Miyoshi Natsuki, Shibukawa Atsushi, Chowdhury Srikanta, Tsujimura Masaki, Noji Tomoyasu, Ishikita Hiroshi, Yamanaka Akihiro, Sudo Yuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Green-Sensitive, Long-Lived, Step-Functional Anion Channelrhodopsin-2 Variant as a High-Potential Neural Silencing Tool	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 6214 ~ 6218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.0c01406	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 Kojima Keiichi, Kurihara Rika, Sakamoto Masayuki, Takanashi Tsukasa, Kuramochi Hikaru, Zhang Xiao Min, Bito Haruhiko, Tahara Tahei, Sudo Yuki	4. 巻 124
2. 論文標題 Comparative Studies of the Fluorescence Properties of Microbial Rhodopsins: Spontaneous Emission Versus Photointermediate Fluorescence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 7361 ~ 7367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpccb.0c06560	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 Ueta Tetsuya, Kojima Keiichi, Hino Tomoya, Shibata Mikihiro, Nagano Shingo, Sudo Yuki	4. 巻 119
2. 論文標題 Applicability of Styrene-Maleic Acid Copolymer for Two Microbial Rhodopsins, RxR and HsSRI	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 1760 ~ 1770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2020.09.026	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 Kojima Keiichi, Yoshizawa Susumu, Hasegawa Masumi, Nakama Masaki, Kurihara Marie, Kikukawa Takashi, Sudo Yuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Lokiarchaeota archaeon schizorhodopsin-2 (LaSzR2) is an inward proton pump displaying a characteristic feature of acid-induced spectral blue-shift	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-77936-9	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17件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Keiichi Kojima, Yuki Sudo
2. 発表標題 Microbial rhodopsins as a model both for photoactive proteins and optogenetics tools
3. 学会等名 2019 AWEST Awaji Island Conference on Electron Spin Science & Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Ueta, Keiichi Kojima, Tomoya Hino, Mikihiro Shibata, Shingo Nagano & Yuki Sudo
2. 発表標題 Physicochemical properties of the microbial rhodopsin RxR in the membrane-mimicking molecule styrene maleic acid (SMA) copolymer
3. 学会等名 第11回日本生物物理学会 中四国支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Nakama, Keiich Kojima, Marie Kurihara, Susumu Yoshizawa & Yuki Sudo
2. 発表標題 Functional roles of basic amino acid residues in a light-driven S042- transporter SyHR on its anion transport
3. 学会等名 第11回日本生物物理学会 中四国支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山梨 太郎、真木 美紗代、小島 慧一、渋川 敦史、塚本 卓、チョドリ スリカンタ、山中 章弘、高木 新、須藤 雄気
2. 発表標題 アニオンチャンネルロドプシン(ACR)の超高感度光神経抑制活性と低光毒性
3. 学会等名 第11回日本生物物理学会 中四国支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山梨 太郎、真木 美紗代、小島 慧一、渋川 敦史、塚本 卓、高木 新、須藤 雄気
2. 発表標題 線虫C.elegansを用いた光駆動型アニオンチャンネルによる超高感度かつ低毒性な光神経抑制の実証
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiichi Kojima, Rika Kurihara, Masayuki Sakamoto, Xiaomin Zhang, Haruhiko Bito, Yuki Sudo
2. 発表標題 A WIDE DIVERSITY OF FLUORESCENCE COLOR AND BRIGHTNESS IN MICROBIAL RHODOPSINS
3. 学会等名 17th International Congress on Photobiology, 18thCongress of the European Society for Photobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiichi Kojima, Yuki Sudo
2. 発表標題 Exploration and development of microbial rhodopsin-based optogenetic tools
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Nakama, Keiichi Kojima, Marie Kurihara, Susumu Yoshizawa, Yuki Sudo
2. 発表標題 Functional roles of basic amino acids on the anion transport in <i>Synechocystis</i> halorhodopsin (SyHR)
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島 慧一、三好 菜月、渡邊 宙志、チョドリ スリカンタ、山中 章弘、石北 央、須藤 雄気
2. 発表標題 神経抑制型光遺伝学ツール開発：アミノ酸置換によるアニオンチャンネルロドプシン2の吸収波長およびチャンネル開時間の改変
3. 学会等名 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾 新、小島 慧一、須藤 雄気
2. 発表標題 内向きプロトンポンプ型ロドプシンRmXeR1によるヒト子宮頸癌由来HeLa細胞の細胞死抑制効果
3. 学会等名 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiichi Kojima, Rika Kurihara, Masayuki Sakamoto, Xiaomin Zhang, Haruhiko Bito, Yuki Sudo
2. 発表標題 An expanded palette of colorful and powerful fluorescence variants of microbial rhodopsins
3. 学会等名 The 1st International Symposium on Molecular Engine_Abstract (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島 慧一、三好 菜月、渋谷 敦史、チョドリ スリカンタ、渡邊 宙志、石北 央、山中 章弘、須藤 雄気
2. 発表標題 神経抑制型光遺伝学ツール開発：長いチャネル開時間を示すステップファンクション型緑色光感受性アニオンチャネルの創成
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島慧一
2. 発表標題 光受容タンパク質・ロドプシンの 生物物理化学研究
3. 学会等名 第59回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiichi Kojima
2. 発表標題 Analysis of rhodopsins for a rational understanding and controlling of biological functions
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島 慧一
2. 発表標題 ロドプシンの特殊性から学ぶ生物の巧みな光利用法
3. 学会等名 2020年度 生物物理学会北海道支部会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島 慧一、上田 哲也、日野 智也、永野 真吾、須藤 雄気
2. 発表標題 Gタンパク質共役型受容体・ロドプシンを対象としたスチレンマレイン酸(SMA)コポリマーの適用と有用性の検討
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中尾 新、小島 慧一、須藤 雄気
2. 発表標題 光駆動型プロトンポンプによる細胞内pH制御を介した光細胞死操作法の確立
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------