

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15900

研究課題名（和文）膜配向制御による光遺伝学ツールのデザイン

研究課題名（英文）Novel optogenetic tools based on heliorhodopsins

研究代表者

細島 頌子（Hososhima, Shoko）

名古屋工業大学・工学（系）研究科（研究院）・研究員

研究者番号：90847914

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、円石藻に感染するウイルスの持つヘリオロドプシン（V2HeR3）が、光依存的にプロトンを送ることを世界に先駆けて明らかにした。またV2HeR3アミノ酸置換体を用いて、イオン輸送に必須なアミノ酸残基の同定を行い、イオン輸送機構を明らかにし、さらにV2HeR3発現ニューロンにおいて光依存的な活動電位の発生に成功した。またクリプト藻の微生物ロドプシン（GtCCR1-5）の光感度やOFF時定数の測定を行った。その結果、GtCCR4の光に対する応答性がChR2の30倍高いことを明らかにした。この発見は微生物ロドプシンを利用した視覚再生を実現する上でのボトルネックを解消することができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

円石藻ウイルスの持つヘリオロドプシンが、光依存的にプロトンを送ることを世界に先駆けて明らかにした。本研究はヘリオロドプシンを膜配向制御に利用しようと開始したため、その機能が明らかになったことは想定外の発見であった。円石藻は海洋中の二酸化炭素を固定するため、海洋の炭素循環に重要な役割を担っている。円石藻の大量発生は白潮を発生させ、海洋の環境悪化を引き起こす。白潮は円石藻ウイルスの感染により崩壊することが知られているが、本研究からヘリオロドプシンが光を使って円石藻の崩壊を促す可能性が示唆され、地球環境の観点からも注目された。

研究成果の概要（英文）：Rhodopsins convert light into signals and energy in animals and microbes. Heliorhodopsins (HeRs), a recently discovered new rhodopsin family, are widely present in archaea, bacteria, unicellular eukaryotes, and giant viruses, but their function remains unknown. In this study, we revealed that a viral HeR from *Emiliana huxleyi* virus 202 (V2HeR3) is a light-activated proton transporter. Furthermore, the cryptophyte algae, *Guillardia theta*, possesses 46 genes that are homologous to microbial rhodopsins. Five of these are functionally light-gated cation channelrhodopsins (GtCCR1-5), which are phylogenetically distinct from chlorophyte channelrhodopsins (ChRs) such as ChR2 from *Chlamydomonas reinhardtii*. In this study, we investigated the ion channel properties of these five CCRs and compared them with ChR2 and other ChRs widely used in optogenetics. We revealed that GtCCR1-5 have different light sensitivities, and that GtCCR4 has a high light sensitivity.

研究分野：生物物理

キーワード：微生物ロドプシン ヘリオロドプシン チャンネルロドプシン 光遺伝学 オプトジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

微生物ロドプシンは7回膜貫通領域を持った膜タンパク質であり、膜貫通領域の中心に結合するレチナルが光受容にともない異性化することで活性化状態となる。チャネル型の微生物ロドプシンであれば、活性化状態の際にチャネルがオープン構造を取り、イオンを透過させる (Nagel *et al.*, 2002, 2003)。例えば光受容陽イオンチャネルであるチャネルロドプシン2 (ChR2) をニューロンに発現させると、光によってChR2が開き、 H^+ や Na^+ といった陽イオンが細胞内に流れ込み膜電位変化が生じ、内在性の電位依存性チャネルが活性化され、神経の興奮を引き起こすことができる (Boyden *et al.*, 2005, Ishizuka *et al.*, 2006)。逆に細胞内から H^+ や Na^+ を汲み出す光駆動プロトン (Arch.) もしくはナトリウムポンプ (KR2) や、 Cl^- を細胞内に輸送する光駆動クロライドポンプ (NpHR)、光受容クロライドチャネル (GtACRs) を用いると、神経活動を抑制することができる。これらの手法は光遺伝学(オプトジェネティクス)と呼ばれ、神経科学を始め、生命現象の解明のため広い分野で使用されている。

しかし一方で神経活動の抑制を目的として光駆動プロトンポンプやクロライド輸送体を利用した場合、逆に神経の興奮を引き起こしてしまうという問題が提起されている。例えばシナプス前終末に光駆動プロトンポンプを発現させ、神経活動を抑制しようとした場合、 H^+ の細胞外への流出によって起こるpH変化が Ca^{2+} 放出を促進し、 Ca^{2+} により興奮性の神経伝達物質が放出され、シナプス後電位が発生するという報告がある (Mahn *et al.*, 2016)。また光受容クロライドチャネルの場合、シナプス前終末の Cl^- 濃度は細胞体の Cl^- 濃度よりも高く、 Cl^- の平衡電位が静止膜電位よりも脱分極側にあるため Cl^- が細胞外に流出し、シナプス前終末で脱分極が起き、興奮性の神経伝達物質が放出され神経活動を引き起こし (Wiegert *et al.*, 2017)、光駆動クロライドポンプの場合でも光照射終了後に膜電位のリバウンドが起き、神経発火が生じることが報告されている (Mahn *et al.*, 2016)。従来の抑制ツールが抱えるこれらの問題を解決するために、細胞外への K^+ 輸送を行う光受容カリウムチャネルが求められているが、研究開始当初は自然界から K^+ 選択的な光駆動カリウムポンプや光受容カリウムチャネルを発見したとの報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究では、光受容陽イオンチャネルの一種であるGtCCR4の膜配向を反転させることで、外向き整流性のカリウムチャネルをデザインし、従来の抑制ツールが持つ問題点の解決を図る。クリプト藻由来の微生物ロドプシンの一つであるGtCCR4は Na^+ 、 K^+ など一価陽イオンの選択性が高く、 H^+ や Ca^{2+} 、 Mg^{2+} の透過性が低い、内向き整流性の強い一価陽イオン選択的な光受容チャネルであることが判明した (Yamauchi *et al.*, 2017, Shigemura *et al.*, 2019)。そのため Na^+ 濃度が細胞外では高く、細胞内では低い、一般的な生理的環境下であれば、 Na^+ を細胞外から細胞内に輸送すると考えられる。GtCCR4の整流性を逆転させることが出来れば、外向き整流性の一価陽イオンチャネル (inverse-GtCCR4) となり、細胞内では K^+ 濃度が高いため、inverse-GtCCR4は K^+ を細胞内から細胞外へ輸送することで、抑制ツールとして働くカリウムチャネルとして機能すると期待される。

3. 研究の方法

これまで微生物ロドプシンの膜配向はN末端が細胞外・C末端が細胞内に局在するとされてきた。しかしメタゲノム解析により発見された新たな微生物ロドプシンのグループ、ヘリオロドプシン (Pushkarev *et al.*, 2018) は、アミノ酸配列は既知の微生物ロドプシンとは大きく異なり、さらに既知の微生物ロドプシンとは膜配向が逆転し、N末端が細胞内・C末端が細胞外に局在していることが判明した (Shihoya *et al.*, 2019)。本研究では、ヘリオロドプシンとGtCCR4の膜貫通領域やループ部分を入れ替え、(A)キメラ光受容タンパク質を作製することで、GtCCR4の膜配向の逆転を試みる。哺乳類培養細胞にキメラ光受容タンパク質を発現させ、そのN末端に付加したcMycタグを(B)免疫染色法によって認識し、膜配向を確認する。膜配向の逆転が確認された場合は(C)whole cell patch clamp法を用いて、イオン輸送の整流性や、イオン選択性、光感度等の電気生理学的性質を確認する。

しかしヘリオロドプシンが様々な生物種で発見され、その数は2000種以上といわれているにも関わらず、実際に研究が行われたヘリオロドプシンは少ない。そこで膜配向の制御に用いるヘリオロドプシンの候補を増やすために、新たなヘリオロドプシンを分光学的・電気生理学的手法を用いて解析する。またGtCCR4はクリプト藻由来のチャネルロドプシンであるが、クリプト藻は46種のロドプシンを持っており、そのうちの5つが光受容陽イオンチャネル (GtCCR1-5) である。GtCCR1-5の電気生理学的測定を行い、イオン輸送や光応答性を明らかにし、キメラ光受容タンパク質の候補を選定する。

4. 研究成果

<ヘリオロドプシンの機能解明>

ヘリオロドプシンは 2018 年に、メタゲノム解析によって発見された。以来、1000 種類を超えるヘリオロドプシンが見つかっており、古細菌や真正細菌、藻類などの真核生物や巨大ウイルスなど、さまざまな生物種に含まれることが判明した。しかしながらヘリオロドプシンの機能は未解明であった。様々な生物種のヘリオロドプシンを調べたが、イオン輸送などの機能は判明しなかった。そのためヘリオロドプシンは光センサーとしてはたらくのだろうと推測されていたが、そのしくみも不明であり、地球環境に広く存在するヘリオロドプシンの機能は謎のままであった。しかし本研究において、円石藻に感染するウイルスが持つヘリオロドプシン (V2HeR3) は、光依存的にプロトンを輸送することを世界に先駆けて明らかにした (Hososhima *et al.*, 2022)。

円石藻は海洋性の植物プランクトンであり、その大発生はブルーム(白潮)と呼ばれて人工衛星からも見えるほどであり、地球環境に大きな影響を与えている。円石藻に感染するウイルスはさまざまなものが知られていますが、本研究では 2 種類の巨大ウイルスが持つ合計 5 つのヘリオロドプシン (V1HeR1, 2 & V2HeR1, 2, 3) に着目した。これら 5 つのヘリオロドプシンと円石藻自身が持つヘリオロドプシンの合計 6 つを哺乳類培養細胞に発現させ、電気生理学手法を用いてイオン輸送能を調べた。その結果、V2HeR3 だけが、光を照射すると水素イオンを輸送すること、それ以外のヘリオロドプシンはイオン輸送能を持たないことがわかった。さらに V2HeR3 をラットの大脳皮質初代培養に発現させて光を照射したところ、神経細胞の発火が観察された。

また V2HeR3 のイオン輸送のしくみを明らかにするため、V2HeR3 タンパク質の内部にあるアスパラギン酸(D)とグルタミン酸(E)の変異体を作製し、水素イオンの輸送活性を調べた。その結果、V2HeR3 とレチナールが結合した部位より細胞内側にあるグルタミン酸 (E205 と E215) と細胞外側にあるグルタミン酸 (E191) が、イオン輸送に必須であることがわかった。この結果を元に相同性の高いヘリオロドプシンを探索したところ、新たに 4 つのイオン輸送能を持つヘリオロドプシンを発見した。

<高感度チャンネルロドプシンを用いた光遺伝学ツールの開発>

電気生理学的手法を用いて、クリプト藻の微生物ロドプシン (GtCCR1-5) の光感度や OFF 時定数の測定を行った。その結果、GtCCR4 の光に対する応答性が ChR2 の 30 倍高いことを明らかにした (Hososhima *et al.*, 2023)。

また網膜の神経節細胞に GtCCR4 を発現させ、光に応答したシグナルを測定した。微生物ロドプシンの医療応用への取り組みが進められており、特に微生物ロドプシンを利用した視覚再生は、国内外の研究機関または企業で競争が激化している。しかし ChR2 のような微生物ロドプシンは、光に対する応答性が低い。そのため夏の晴天下といった強い光が存在する状況であれば物が視えるが、室内光では何も視えないという課題があった。しかし GtCCR4 の光応答性が、ChR2 よりも 30 倍高く、この性質を使えば室内照明での視覚再生が実現する。

チャンネルロドプシンの膜配向の逆転を目的とし、キメラ光受容タンパク質の作製を行った。本研究において電気生理学的手法を用いて、光感度や OFF 時定数、イオン選択性を明らかにした微生物ロドプシンである GtCCR4 や KnChR、KR2 と、TaHeR や V2HeR3 等のヘリオロドプシンを組み合わせ、キメラロドプシンを作製した。それらについて whole-cell patch clamp 法や免疫染色法を用いて、その性質を解析したが、イオン輸送が見られたキメラロドプシンは得られなかった。一方で 2022 年に自然界から光受容カリウムチャンネルロドプシン (HcKCRs) が発見された (Govorunova *et al.*, 2022)。これを受け、電気生理学的手法を用いて光受容カリウムチャンネルロドプシンの測定を行った。いくつかの光受容カリウムチャンネルロドプシンと変異体を作製し、測定した結果、電流値の増大やイオン選択性の変化が見られた (データ未発表)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Hososhima Shoko, Mizutori Ritsu, Abe-Yoshizumi Rei, Rozenberg Andrey, Shigemura Shunta, Pushkarev Alina, Konno Masae, Katayama Kota, Inoue Keiichi, Tsunoda Satoshi P, Beja Oded, Kandori Hideki	4. 巻 11
2. 論文標題 Proton-transporting heliorhodopsins from marine giant viruses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e78416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.78416	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 該当する

1. 著者名 Hososhima Shoko, Ueno Shinji, Okado Satoshi, Inoue Ken-ichi, Konno Masae, Yamauchi Yumeka, Inoue Keiichi, Terasaki Hiroko, Kandori Hideki, Tsunoda Satoshi P.	4. 巻 13
2. 論文標題 A light-gated cation channel with high reactivity to weak light	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-34687-7	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shoko Hososhima, Shunta Shigemura, Hideki Kandori, Satoshi Tsunoda
2. 発表標題 Kinetic evaluation of light-gated cation channels from cryptophyte
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shoko Hososhima, Ritsu Mizutori, Rei Abe-Yoshizumi, Andrey Rozenberg, Shunta Shigemura, Alina Pushkarev, Masae Konno, Kota Katayama, Keiichi Inoue, Satoshi P. Tsunoda, Oded Beja, Hideki Kandori
2. 発表標題 Light-activated proton-transporting heliorhodopsins from marine giant viruses
3. 学会等名 19th International Conference on Retinal Proteins (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shoko Hososhima
2. 発表標題 Light-induced proton-transporting heliorhodopsins from marine giant viruses
3. 学会等名 The 61st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------