

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19229

研究課題名（和文）光駆動型神経機能素子の開発

研究課題名（英文）Development of light-driven neural devices

研究代表者

藤原 祐一郎（Fujiwara, Yuichiro）

広島大学・医系科学研究科（医）・教授

研究者番号：20532980

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）：新しいタイプの光駆動性イオンチャネルおよび光駆動性膜機能蛋白質を創製することを目的として、光異性化を起こすアゾベンゼンをイオンチャネル等に付加することで、光によるイオンチャネル活性の制御を試みた。BmGrチャネルやHvチャネルを対象に研究を行い、光駆動型BmGrチャネルを作成に成功した。光異性化により残基間距離の規定されるアゾベンゼン試薬の特性を利用して、イオンチャネルの開閉機構を検討し、多くの導入残基の距離の測定を行い、チャネルゲーティングモデルを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、オプトジェネティクスと称して藻類由来チャネルロドプシンなどの光駆動性チャネルは神経回路機能の解析ツールとして研究が進んでいる。一方これらツールには哺乳類のチャネルの性質を維持していないという問題点もあり、より有用な光駆動チャネルの開発が期待されている。そのためには動的な動作機構・構造変化を詳細に理解する必要がある。本研究は、チャネルの開閉機構を理解し、チャネルの性質を保持した、光駆動分子を創製するという上述の問題点を一度に克服できる学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：We have attempted to control ion channel activity by adding photoisomerizable azobenzene to ion channels, etc. We have studied BmGr channels and Hv channels, and succeeded in creating a light-driven BmGr channel. BmGr channels and Hv channels, and succeeded in creating light-driven BmGr channels. Using the characteristics of azobenzene reagents, in which the distance between residues is defined by photoisomerization, we investigated the opening and closing mechanism of ion channels, measured the distances of many introduced residues, and constructed a channel gating model.

研究分野：生理学、生物物理学

キーワード：イオンチャネル

## 1. 研究開始当初の背景

脳や心臓の機能をはじめとした私たちの生体機能は電気信号によって生み出されている。その電気信号を生み出すのが、イオンチャネルという膜機能分子であることはよく知られている。生体の電気信号をあやつり人体の機能を操作することは、人類の目標の一つとなっている。近年の構造生物学の発展により、ほぼすべてのイオンチャネルの構造が明らかになり、徐々に動作機構の大枠も分かりつつある。また近年、オプトジェネティクスと称して藻類由来チャネルロドプシンなどの光駆動性チャネルは神経回路機能の解析ツールとして研究が進んでいる。一方これらツールには目的のイオンだけを透せない、天然の軸索膜上局在・分子会合を取らないという弱点も存在する。哺乳類の性質を維持したより有用な光駆動チャネルの開発が期待されている。そのためには、動的な動作機構・構造変化を詳細に理解する必要がある。detergent 精製したチャネル蛋白質の静的な立体構造から推測されるダイナミクスと、生体膜上での挙動が一致しない報告も多々あり、実際に膜上で機能するチャネルの構造変化を測定する方法論の開発が期待されている。ラベルした残基から蛍光解析など手法は試みられているが、直接的に距離を測定できる「物差し」が最も優れた方法と考えられる。

それを解決するため、本研究では、生体膜で機能するチャネルの動的構造変化を解析する方法論の確立、従来の光駆動ツールの抱える種々の問題を解決する光駆動チャネルを作成する試みを行う。光異性を起こすアゾベンゼンを利用して、チャネルのゲートを動かし、光によるイオンチャネル活性の制御や機能分子の制御を行う。網羅的に多くの変異体や長さの異なるアゾベンゼン誘導体を探索的に用いる、新しい研究ストラテジーの立案に至った。

イオンチャネルは最も機能解析が進んだ分子であり、本研究によりオングストローム単位の「物差し」を用いた光科学技術を融合させた **Structure-Function** の解析技術が確立すれば、他の機能分子全般に応用可能な方法論としての波及が期待できる。さらに、駆動ドメインの構造変化、動作原理の理解が進むことにより、光駆動分子以外に、磁性・感熱分子などの導入により種々のエネルギーで機能操作出来る分子開発へのブレークスルーが期待できる。

## 2. 研究の目的

光異性を起こすアゾベンゼン誘導体を機能分子に付加し分子構造を光で操ることで、

- ・新しいタイプの光駆動性イオンチャネルの創製を行うことを目的とする。
- ・分子の動的構造変化の新しい計測・評価方法を開発することを目的とする。

哺乳類のイオンチャネルの多くに共通するドメインをターゲットに光操作することで、これまでの光駆動性ツール(藻類由来チャネルロドプシン)にはない、高いイオン選択性と細胞膜局在・アクセサリ分子の会合を保つ光駆動性チャネルを次々に作成する。

アゾベンゼン誘導体の波長に依存して距離が変わる性質を「物差し」として利用し、チャネルの **Closed-Open** の動的な構造変化を測定する。探索的に多様な距離を持つ誘導体を使って測定を行い、機能分子の動的な構造変化を解析する新しい手法を確立することを目指す。

光科学技術を基盤とし分子構造に立脚して、戦略的に光駆動性チャネルを創製するプラットフォーム、生体膜上でのチャネルの動作機構を理解する研究ストラテジーを構築する。

## 3. 研究の方法

アゾベンゼンは波長に応答し高速でシス-トランス構造遷移する光感受性物質で、多様な誘導体を有する。そのマレイミド化合物は、分子に導入した **Cys** 残基にチオール反応で結合し、波長に応答して残基間距離を規定する。付加した蛋白質の局所の立体構造を変えることが可能となる。また、リンカー長を調節することで、多様な距離を規定できるオングストローム単位の「物差し」として使える。

哺乳類のイオンチャネルは、原核生物のシンプルな構造を持つチャネルからパターン化されたドメインを増やしながらか進んできた。脳の電気信号を生み出すイオンチャネルの分子構造は、電位依存性チャネル(イオン透過路+電位センサー)、受容体チャネル(イオン透過路+リガンド結合部位)からなり、多くのイオンチャネルに共通する。共通するドメインを光操作することができれば、ドミノ倒し的に次々と光駆動チャネルを創ることが出来る。本研究ではチャネルに付加したアゾベンゼンの光異性化を利用して、電位センサーを引っ張り上げ、リガンド結合構造を再現し、ポアをこじ開け、光でチャネルを開かせる。チャネルが **Open**⇌**Close** する際のアゾベンゼン誘導体の長さを基に付加した残基間距離を測定する。

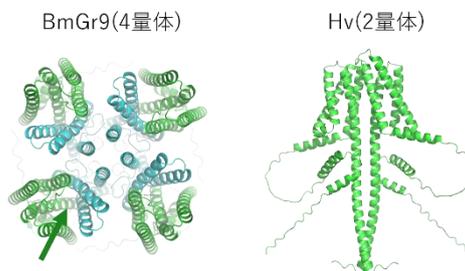
最も構造・機能の理解が進んでいる電位依存性チャネルと、扱いやすい受容体チャネルを対象に実験を進める。電位センサーの光駆動に成功したら、他の電位依存性チャネルファミリーに次々に適用していき、これまでにない生理機能に合致したチャネルを創る。網羅的に多くの変異体を作成し、光駆動する変異体チャネルをスクリーニングする。光駆動するチャネルを複数手に

入れ、得られた Closed→Open で変化する残基ペアの距離情報を、立体構造にマッピングし分子動力学を用いて平衡化し閉開構造の遷移モデルを得る。

立体構造を基に網羅的に多くの変異体チャンネルを作成し、種々の長さのアゾベンゼン誘導体を用いて実験を行い光駆動させる変異体を探索する。変異体チャンネルは卵母細胞に発現させ、レーザー光照射下に、電気生理学的に活性を測定する。計測に用いる二本刺膜電位固定法は測定が容易かつハイスループットで、光に応答するか否か次々に解析出来る。

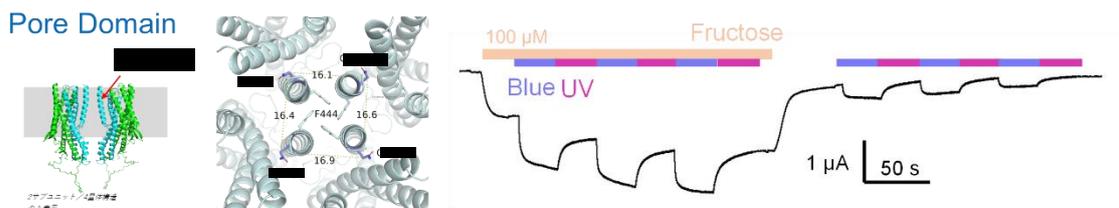
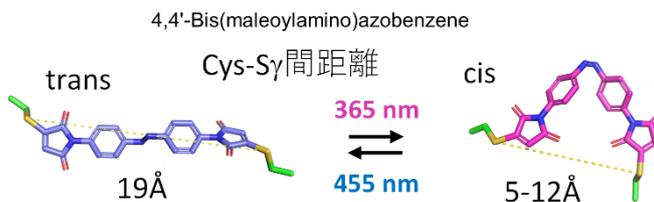
#### 4. 研究成果

細胞外領域が殆どなく、ゲートに関する膜貫通領域がカルボキシ端終末であり人工チャンネルのテンプレートとして使いやすいことが期待される BmGr9 チャンネルおよび、最小の電位依存性チャンネルで扱いやすいことが期待される Hv チャンネルを対象に実験を進めた。両者はまだ構造が解かれておらず (Hv チャンネルに関しては2量体)、AlphaFold2 により立体構造予測を行った。



予測した立体構造解情報を基に、チャンネルが Closed 構造から Open 構造に変化する際に変わる残基間距離を計算した。実験に用いるアゾベンゼン試薬(4,4'-Bis(maleoylamino)azobenzene)の光異性化距離は、trans 構造(19Å) vs cis 構造(5-12Å)である。構造が変化する部位を検討し、光異性化距離に相当する残基ペアに、アゾベンゼン誘導体を架橋するための Cys 変異を導入した。変異体チャンネルの cRNA をツメガエル卵母細胞にインジェクションし、変異体チャンネルを膜上に発現させた。DTT による Cys 残基の還元後に、アゾベンゼン試薬をソーキングによりチャンネルに導入した。青色可視光と紫外線を照射し電気生理学的にチャンネルを流れる電流を同時測定することによりチャンネル機能を考えることができる。ポアヘリックス、近接するヘリックス間距離をアゾベンゼンの光異性化によりコントロールすることを試みた。網羅的に多くの変異体コンストラクトを作成し、変異体チャンネルを Xenopus 卵母細胞に発現させ、アゾベンゼン誘導体をスルフヒドリル反応で付加し、光異性化波長を照射し、電気生理学的に測定した。

光で操作することができる BmGr9 チャンネルを数種類得ることが出来た。Hv 電位センサーを光で操作するチャンネルを得ることは出来なかった。

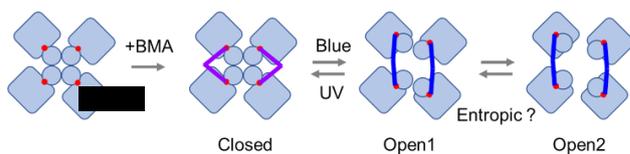


ポアドメインの4量体間距離が約16Åの距離の残基にCysを導入して、フルクトース添加後、青色光照射により開き、紫外線照射により閉じるチャンネルを得ることに成功した。フルクトース添加を行わなくても光照射によるゲーティングが観測された。



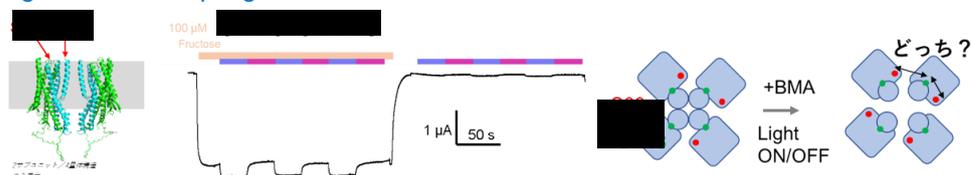
この残基は、片側だけマレイミドを有する maleoylaminoazobenzene 試薬を投与して、光照射実験を行ったが光応答は観測されなかった。また、WT と変異体のタンデムコンストラクトを作成して実験を行ったところ、光応答は観測されなかった。以上の実験から、以下のゲーティングモ

デルが考察された。

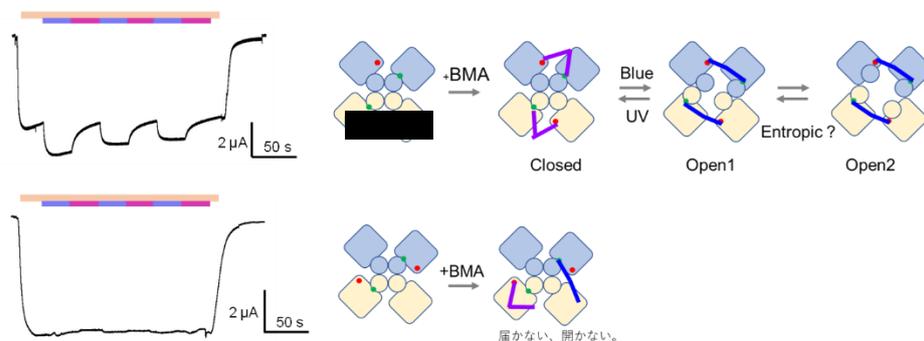


チャンネルに2分子アゾベンゼン試薬が結合し、光による trans 変異によってペアが開口する。

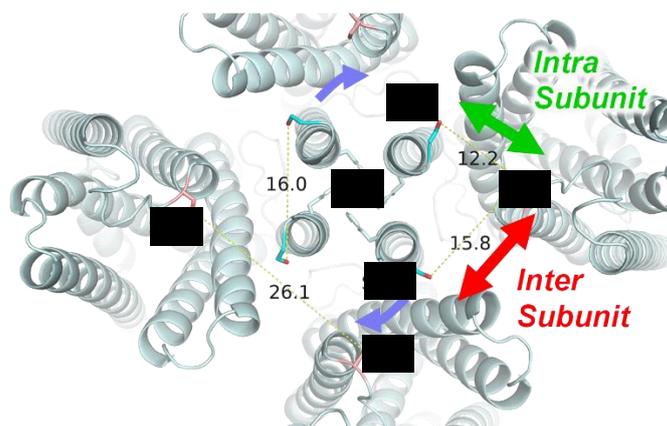
### Ligand-Pore coupling



次に、リガンド結合ドメインとポアドメインに変異を導入し、実験を行い、光駆動できる残基ペアを見つけた。これら残基ペアは、サブユニット内結合でもサブユニット間結合でも構造上可能性があるため、どちらの架橋かを明らかにする必要が生じた。



タンデムチャンネルを用いた実験から、サブユニット間架橋を生じたときのみ光駆動されることが明らかになった。



以上の結果から、ゲーティングモデルを作成した。チャンネルが開く際にポアヘリックスの回転を伴い開口する、開口距離は19Åの距離になることが考察される。

本研究結果は学会にて発表された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Rozenberg A, Kaczmarczyk I, Matzov D, Vierock J, Nagata T, Sugiura M, Katayama K, Kawasaki Y, Konno M, Nagasaka Y, Aoyama M, Das I, Pahima E, Church J, Adam S, Borin VA, Chazan A, Augustin S, Wietek J, Dine J, Peleg Y, Kawanabe A, Fujiwara Y, Yizhar O, Sheves M, Schapiro I, 他6人	4. 巻 29
2. 論文標題 Rhodopsin-bestrophin fusion proteins from unicellular algae form gigantic pentameric ion channels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 592 ~ 603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-022-00783-x	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

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原 祐一郎、平野 磨生子、神鳥 和代
2. 発表標題 受容体チャネルの光駆動化と構造変化の計測
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高田 麻紀、竹下 浩平、川鍋 陽、藤原 祐一郎
2. 発表標題 アラキドン酸は電位依存性 H <sup>+</sup> チャネルの電圧センサーの活性化を制御する
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 川鍋 陽、藤原 祐一郎
2. 発表標題 電位依存性カリウムチャネルに対する硫化水素修飾の検証
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 藤原 祐一郎
2. 発表標題 多様な糖の中から一つを選ぶグルコーストランスポーターの 基質認識機構の理解
3. 学会等名 第13回化学フェスタ（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原 祐一郎、平野 磨生子、神鳥 和代
2. 発表標題 Creation of Photoswitchable Ion Channels and Measurement of Their Dynamic Structural Changes
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川鍋 陽、高田 麻紀、竹下 浩平、藤原 祐一郎
2. 発表標題 電位依存性プロトンチャネルHv1はATPと直接結合して活性調節を受ける
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高田 麻紀、竹下 浩平、川鍋 陽、藤原 祐一郎
2. 発表標題 膜の張力と脂質による電位依存性H <sup>+</sup> チャネル活性制御機構
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 紀谷 拓音、竹下 浩平、川鍋 陽、藤原 祐一郎
2. 発表標題 Functional regulation and intermolecular interaction of phosphoinositides on potassium channel KcsA
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 神鳥 和代、藤原 祐一郎
2. 発表標題 Sodium-glucose cotransporters (SGLT) in <i>Ciona intestinalis</i> transports various kinds of sugar
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 紀谷拓音、川鍋陽、藤原祐一郎
2. 発表標題 Functional Characterization and Molecular Basis of KcsA Modulation by Phosphoinositides
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神鳥和代、城田松之、藤原祐一郎
2. 発表標題 Mechanism of selective transport of sugar in sodium-glucose co-transporter SGLT
3. 学会等名 第73回日本生理学会中国四国地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川鍋陽、高田麻紀、藤原祐一郎
2. 発表標題 The voltage-gated proton channel is regulated by ATP
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原祐一郎
2. 発表標題 Structural Basis for Temperature-Sensitive Gating of Voltage-Gated H <sup>+</sup> Channels
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会（招待講演）
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
研究分担者	川鍋 陽  (Kawanabe Akira)  (10707128)	香川大学・医学部・講師    (16201)	

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