

「光の特性を活用した生命機能の時空間制御技術の開発と応用」  
平成 29 年度採択研究代表者

H29 年度  
実績報告書

神取 秀樹

名古屋工業大学大学院工学研究科  
教授

細胞内二次メッセンジャーの光操作開発と応用

## §1. 研究実施体制

### (1)「神取」グループ

① 研究代表者:神取 秀樹 (名古屋工業大学大学院工学研究科 教授)

② 研究項目

「微生物ロドプシンの光操作ツール開発」

- ・カルシウムイオン濃度の光制御
- ・環状ヌクレオチド濃度の光制御

### (2)「山下」グループ

① 主たる共同研究者:山下 高廣 (京都大学大学院理学研究科 助教)

② 研究項目

「光サイクル型 GPCR ツールの開発」

- ・光サイクル型 GPCR の改変とツール開発

### (3)「寺北」グループ

① 主たる共同研究者:寺北 明久 (大阪市立大学大学院理学研究科 教授)

② 研究項目

「GPCR 型光操作ツールの開発」

- ・光平衡型ロドプシンをベースとする高感度ツールの開発
- ・GPCR 型ツールの選別と有用性の実証

### (4)「日比」グループ

① 主たる共同研究者:日比 正彦 (名古屋大学生物機能開発利用研究センター 教授)

② 研究項目

「光操作による小脳高次機能の解明」

・運動学習および恐怖応答学習で活性化される小脳神経回路素子の同定

## §2. 研究実施の概要

本研究では、微生物ロドプシンと動物ロドプシンを用いて細胞内二次メッセンジャーを制御する光操作ツールを開発するとともに、作製した新規光操作ツールを小脳の運動学習や恐怖応答学習における情報伝達過程の研究に応用することを目指している。初年度は各グループがそれぞれの研究を開始する一方、チームとしての連携を高めるための緊密なディスカッションを行った。平成29年度の研究成果を以下にまとめる。

### (神取グループ)

微生物ロドプシンを用いた光操作ツールの開発を開始した。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の光操作に関しては、チャンネルロドプシンとポンプロドプシンの検討を行った。チャンネルとして機能するロドプシンについて、我々が見出した新種のチャンネルロドプシンのイオン輸送特性を調べた結果、**optogenetics**に標準的に用いられる**ChR2**よりも優れた輸送特性を持つことが示唆された。ポンプとして機能するロドプシンについては、光駆動ナトリウムポンプに対する変異導入により活性中心の新しい知見を得た。細胞内環状ヌクレオチド濃度の光操作ツールに関しては、**cyclase**ロドプシンと**PDE**ロドプシンの網羅的な変異導入を行った結果、機能を欠損させる複数の変異部位を見出した。これらに加えて、光操作ツールの可能性を持った新奇ロドプシンの探索を開始した。

### (山下グループ)

光サイクルによって **GPCR** としての活性が制御される動物型ロドプシン (**Opn5L1**) を初めて見だし、その分子内の制御メカニズムを解析した。その結果、**Opn5L1** は光を受けた後にタンパク質内のシステイン残基とレチナールとの間で特異的な結合を形成することがわかった。これにより、自然に元の状態に戻る反応が促進され、光サイクルを形成できる。このような分子内の詳細なメカニズムは **Opn5L1** グループで共通すると考えられ、その理解は **Opn5L1** をベースとする光操作ツール作製を行う際の大きな基盤となる。

### (寺北グループ)

従来用いられてきた **GPCR** 型光操作ツール(哺乳動物の視覚ロドプシンをベースとする)とは異なる分子特性をもつ光平衡型ロドプシンを用いて、「光平衡型ロドプシンをベースとする高感度ツールの開発」と「**GPCR** 型ツールの選別と有用性の実証」に着手した。その結果、培養細胞レベルで、**Gi/Go**、**Gs**、**Gq** をそれぞれ特異的に活性化するツール開発に成功した。それらツールの1つは、センチュウを用いて光遺伝学ツールとしての有用性が確認された。また、多様な光平衡型ロドプシンの1つであるペロプシン(無脊椎動物由来)を用いて、暗中で **ON**、光で **OFF** することができる、既存の光遺伝学ツールとは真逆の性質を持つツール開発に成功した。

### (日比グループ)

ゼブラフィッシュ小脳神経回路が関与する恐怖統合学習のアッセイ系の最適化を行った。受精後約 20 日のゼブラフィッシュ仔魚を、顕微鏡のステージ上にアガロースを用いて固定し、電気ショック

クを無条件刺激、LED照明の消灯を条件刺激として、繰り返し刺激を行った(連合学習)。約40%の野生型仔魚で、条件刺激により徐脈を誘導する恐怖応答学習が成立する実験系を確立した。さらに、Ca<sup>2+</sup>インディケーター蛍光タンパク質 GCaMP7aを小脳ニューロンで発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを用いて、恐怖応答学習成立時に条件刺激により活性化されるニューロンの同定を行った。

代表的な原著論文

K. Sato, T. Yamashita, H. Ohuchi, A. Takeuchi, H. Gotoh, K. Ono, M. Mizuno, Y. Mizutani, S. Tomonari, K. Sakai, Y. Imamoto, A. Wada and Y. Shichida Y.

“Opn5L1 is a retinal receptor that behaves as a reverse and self-regenerating photoreceptor.”

*Nat. Commun.* 9, 1255 (2018).