

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

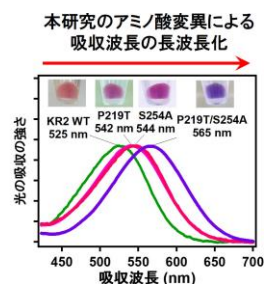
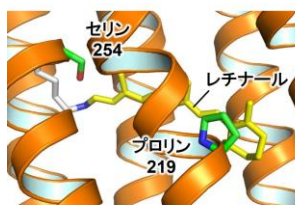
### § 1. 研究成果の概要

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。

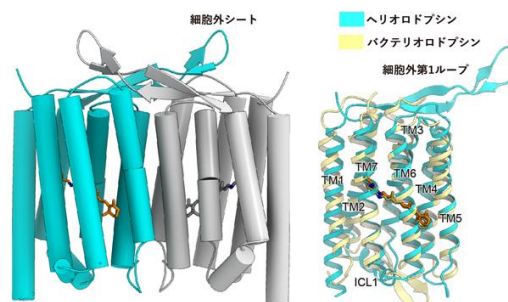
三年目となる 2019 年度は、これまで同様、グループ間の緊密なディスカッションのもと、十分な連携を保ちつつ研究を推進した。グループごとの研究成果を以下にまとめる。

(神取グループ)

光操作ツールとして期待される微生物ロドプシンの中で、我々のグループが発見したチャンネルロドプシン GtCCR4 は光感度が高く、カルシウムイオンやプロトン透過しないことがわかった。この性質は、神経興奮に用いられる脱分極性の光操作ツールとして高いポテンシャルを示すものである。また、光駆動ナトリウムポンプロドプシン KR2 の系統的変異解析により、長波長化をもたらすアミノ酸残基を見出した。長波長側に吸収を持つツールが求められている中、機能を損なうことなく長波長化をもたらす微生物ロドプシンの波長制御残基(スイッチと呼ばれる)はこれまで 2 つしか知られていなかった。新しく発見した GP スwitch は光操作ツールの開発に指針をもたらすものであり、実際に神経抑制に用いられる過分極性の光操作ツールとして期待される。



新奇ロドプシンの研究においては、2018年にその存在を明らかにしたヘリオロドプシンの構造を決定し、詳細な分子メカニズムを明らかにした。配列相同性を持たないヘリオロドプシンであるが、構造や反応ダイナミクスは微生物ロドプシンと類似しており、トポロジー反転という特性も含めツール開発など応用研究への期待も高い。さらに、レチナールを結合するリジンに欠損したロドプシンや、進化的にタイプ1とヘリオロドプシンの中間に位置付けられるシズロドプシン、ユニークな光反応性を示す TAT ロドプシンに関する論文発表を行った。



(山下グループ)

昨年度までに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を初めて見出し、メカニズムの解明と分子特性の最適化を行っていた。しかし、見出していたものは光で活性が抑制された後に元に戻るという光サイクルを示すものであった。本年度は、種々のロドプシン類の分子特性を改変した結果、逆に光で活性が上昇した後に元に戻る光サイクル型 GPCR の創製に成功した。今後、分子特性の最適化を行い、光操作ツールとしての有用性を検証する。

(寺北グループ)

光遺伝学ツールとして期待される光平衡型ロドプシンには、これまで構造が決定され、かつ変異体作成が可能なものが無かった。無脊椎動物の視覚ではたらくロドプシンは典型的な光平衡型である。今回、ハエトリグモロドプシンの結晶構造を決定し、変異体解析により可視光を受容するために最も重要なアミノ酸残基の決定や波長制御に関わるアミノ酸残基の解析に成功した。本研究により、ハエトリグモロドプシンが光平衡型ロドプシンのモデルとして、ツール開発に貢献すると期待される。

(日比グループ)

神取グループの開発した光操作ツール(新規チャンネルロドプシン GtCCR4、adenylate/guanylate cyclase ロドプシン、phosphodiesterase ロドプシン)、山下グループの開発した光サイクル型 G タンパク質共役型ロドプシン、寺北グループが開発した光平衡型 G タンパク質共役型ロドプシン(Gq、Gs、Gi/o 型)を、転写因子 Gal4 依存的に特定のニューロンに発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を樹立してきた。これらの魚を用いて、光操作ツールを網様体脊髄路ニューロンに発現させ、遊泳行動の誘発を指標に、活性を評価した。チャンネルロドプシン GtCCR4、adenylate cyclase および guanylate cyclase ロドプシン、Gq 共役型ロドプシンに関して、光刺激依存性に神経活動を操作できることが示された。

【代表的な原著論文】

1. Wataru Shihoya, Keiichi Inoue, Manish Singh, Masae Konno, Shoko Hososhima, Keitaro Yamashita, Kento Ikeda, Akimitsu Higuchi, Tamaki Izume, Sae Okazaki, Masanori Hashimoto, Ritsu Mizutori, Sahoko Tomida, Yumeka Yamauchi, Rei Abe-Yoshizumi, Kota Katayama, Satoshi P. Tsunoda, Mikihiro Shibata, Yuji Furutani, Alina Pushkarev, Oded Bèjà, Takayuki Uchihashi, Hideki Kandori and Osamu Nureki, “Crystal structure of heliorhodopsin”, *Nature* 574, 132–136, 2019
2. Takashi Nagata, Mitsumasa Koyanagi, Hisao Tsukamoto, Eshita Mutt, Gebhard F. X. Schertler, Xavier Deupi and Akihisa Terakita, “The counterion-retinylidene Schiff base interaction of an invertebrate rhodopsin rearranges upon light activation”, *Communications Biology*, 2, 180, 2019
3. Ryuji Dohaku, Msahikor Yamaguchi, Naoyuki Yamamoto, Takashi Shimizu, Fumitaka Osaka and Masahiko Hibi, “Tracing of Afferent Connections in the Zebrafish Cerebellum Using Recombinant Rabies Virus”. *Front Neural Circuits*, 13, 30, 2019

## § 2. 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
  - ・新奇ロドプシンツールの開発
  - ・微生物ロドプシンツールの有用性の実証

### (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 「光サイクル型新規 GPCR ツールの開発」
  - ・光サイクル型新規 GPCR の改変とツール開発
  - ・光サイクル型新規 GPCR の有用性の実証

### (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 型ツールの波長制御
  - ・GPCR 型ツールの機能制御
  - ・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 (名古屋大学理学研究科 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
  - ・光操作ツールを発現するトランスジェニックゼブラフィッシュの樹立
  - ・小脳神経回路の光操作の条件検討・ツールの評価