

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」
研究課題「細胞内二次メッセンジャーの光操作開
発と応用」

研究終了報告書

研究期間 2017年10月～2024年03月

研究代表者: 神取 秀樹
(名古屋工業大学 オプトバイオテクノ
ロジー研究センター 特別教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

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た。グループ間の緊密なディスカッションのもと、十分な連携を保つことで順調に研究を進める中、想定していなかった新たな展開も見出された。

神取グループは、陽イオンチャンネルロドプシン GtCCR4 がカルシウムイオンを透過しない一方、KnR3 がカルシウムイオンをよく透過することを見出した。さらに GtCCR4 は光感度が高く、光遺伝学的視覚再生のツールとして大きな可能性を持つことを明らかにした。実際に、GtCCR4 を活用した遺伝子治療を目指すベンチャー企業を CREST の期間内に設立することができた。また新奇ロドプシンとして、研究期間の間にヘリオロドプシン、シズロドプシン、ベストロドプシンを発見し、その構造やメカニズムを明らかにした。

山下グループは、光サイクルで G タンパク質活性化が制御される動物ロドプシンを初めて見出し、そのメカニズムを解明するとともにそれを元に光で活性が上昇または減少する2タイプの光サイクル型 GPCR を創製した。

寺北グループは、光平衡型ロドプシンの中で、発現量や熱安定性が優れているものを選別した。そして、センチュウとマウスを用いて、複数の光平衡型動物ロドプシンが高感度 GPCR ツールや色操作 GPCR ツールとして使用できることを実証した。培養細胞における複数種類の二次メッセンジャーの波長依存的な光操作にも成功した。また、カルシウム操作ツールについて、リコンビナントロドプシンの変異体解析と構造決定により、クモロドプシンのモデル化に成功するとともに、新たなツールとなる新規オプシンをサンゴに見出した。

日比グループは、神取・山下・寺北グループの開発した光操作ツールを、ゼブラフィッシュの網様体脊髄路 V2a ニューロンと心筋細胞に発現させ、光依存性の遊泳行動の誘導(網様体脊髄路ニューロン)と心拍制御(心筋細胞)を指標に活性を測定し、神経活動や心臓の機能を制御する能力の高い光操作ツールを明らかにした。これら光操作ツールを小脳神経回路に発現するためのゼブラフィッシュ系統を樹立した。さらに、恐怖応答学習や社会性行動における小脳神経回路の役割を明らかにするための行動実験系を確立した。

以上の成果を、*Nature* 誌 4 報など多数の原著論文として発表した。また特筆すべき事項として、新聞報道やベンチャー企業の設立を挙げることができる。

研究期間内では、ツール開発や光操作基盤の確立など、各グループ内での研究の進展が目立っていたが、幸い1年間の研究期間の延長が認められたため、グループ間の成果発表に特に注力することとした。その結果、神取グループと日比グループの共同研究論文、寺北グループと日比グループの共同研究論文をいずれも *eLife* 誌に発表することができた。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1.

概要: すべてのロドプシンがタイプ1と呼ばれる微生物ロドプシン、タイプ2と呼ばれる動物ロドプシンに分類される中、神取グループはイスラエルとの国際共同研究により既知のロドプシンと配列相同性を持たないロドプシンを発見し、ヘリオロドプシンと名付けた (Pushkarev et al. *Nature* 2018)。さらに神取グループは東大・濡木研究室との共同研究により、ヘリオロドプシンの立体構造を世界に先駆けて発表した (Shihoya et al. *Nature* 2019)。その機能は未知であったが、巨大ウイルスが持つヘリオロドプシンが光でプロトンを輸送することを見出した (Hososhima et al. *eLife* 2022)。イオン輸送性のヘリオロドプシンの発見は、光操作応用という観点からも期待される。

2.

概要:動物ロドプシンは、G タンパク質の活性化により二次メッセンジャーを調節する光操作ツールとして利用できる。山下グループがその1つである Opn5L1 を解析したところ、活性が光サイクルで制御されることがわかった (Sato et al. *Nat. Commun.* 2018)。このような分子特性を持つ動物ロドプシンは初めてであり、その制御メカニズムの解明にも成功した。本成果は、その後の新規光サイクル型 GPCR の創製につながった (Fujiyabu et al., *Commun. Biol.* 2022; Sakai et al., *eLife* 2022)。

3.

概要:光平衡型動物ロドプシンは、発色団レチナールが少ない眼外でも機能でき、優れた光遺伝学ツールとして期待される。その1種であるパラピノプシン (PP) は、生体内で、単独で UV と可視光の比率を検出しており、PP が “色” 操作ツールとして有用であることを明らかにした (Wada et al., *PNAS* 2018)。また、波長変更ツールの作製のために、cAMP やカルシウム操作ツールの波長制御機構や結晶構造を決定した (Gerrard et al., *PNAS* 2018; Nagata et al., *Commun. Biol.* 2018; Verma et al., *PNAS* 2019)。さらに、線虫を用いて、光平衡型ロドプシンは高感度で優れた光・色操作ツールであることを示した (Koyanagi et al., *PNAS* 2022)

4.

概要:これまで小脳神経回路の構造は、哺乳類で調べられて来たが、他の動物種では研究されて来なかった。日比グループは、組換え狂犬病ウイルスを用いた逆行性トレーシングを行い、ゼブラフィッシュ小脳神経回路の入力線維の全貌を明らかにした (Dohaku et al. *Front. Neural Circuits* 2019)。これは、ゼブラフィッシュを用いた小脳神経回路機能を研究する上で、基盤となる情報を提供している。ゼブラフィッシュ小脳は、哺乳類と同様、運動制御や運動学習だけでなく、恐怖応答学習など情動に関わる高次機能にも関与することも見出し (Matsuda et al. *Sci. Rep.* 2017; Koyama et al. *eNeuro* 2021)、ゼブラフィッシュ小脳神経回路を研究することが、ヒトを含む哺乳類の小脳神経回路の理解につながることを示された。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1.

概要:光遺伝学においては長波長側に吸収を持つロドプシンツールが求められているが、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。神取グループは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 (GP スイッチ) を見出した (Inoue et al. *Nat. Commun.* 2019)。この発見は、神経抑制のための過分極性の光操作ツールに活用されるだけでなく、広くロドプシンの開発に指針をもたらすものである。

2.

概要:神取グループが発見した新規チャネルロドプシン GtCCR4 は、標準的な脱分極ツールとして用いられる ChR2 よりも光感度が高いことが明らかになった (Shigemura et al. *Applied Sci.* 2019)。この性質は、脳神経の解明のための光遺伝学ツールとしてだけでなく、より幅広い応用に活かすことができる。実際に、名工大は第一三共、三菱 UFJ キャピタルとともに視覚再生のための遺伝子治療薬に関するオープンイノベーション研究を 2020 年 4 月に開始した。失明者を救うための研究として高い社会的波及効果を持つ。このオープンイノベーション研究は予定されていた 3 年間で目標を達成し、第一三共が株式を買い取り、自らのプロジェクトとして開発研究を進めることが 2023 年 7 月に発表された。

3.

概要:山下グループはヒトを含む脊椎動物の視覚ロドプシンをベースに新規光サイクル型 GPCR の創製を行い、光で cAMP 濃度の一過的な減少や増加を繰り返し起こすことができる

ことを見出した(Sakai et al., *eLife* 2022; Sakai et al. in preparation)。この光操作ツールについて、視覚再生のための遺伝子治療薬開発を進めるベンチャー企業レストアビジョン(慶応大医と名工大の共同研究成果をもとに 2016 年に創設)と特許の共同出願を済ませ、失明者の視覚再生に向けた共同研究を行っている。

4.

概要: 寺北グループは、視覚以外で機能する光平衡型ロドプシンの1つが、これまでの GPCR 型光遺伝学ツールの欠点を克服し、高感度にセンチュウの行動を制御できることを示した。また、UV・紫感受性のパラピノプシンが、生体内で、パラピノプシン1種類で波長識別しているという性質 (Wada et al., PNAS, 2018)に注目し、センチュウの行動が異なる波長(色)で制御できることを示した。これらの結果は、光平衡型ロドプシンの GPCR 光遺伝学ツールとしての優位性をし、細胞生物学や神経科学に新しい研究手段を提案するものである(Koyanagi et al. PNAS 2022)。

5.

概要: 日比グループは、神取・山下・寺北グループが開発したチャネル型、酵素型ロドプシン、G プロテイン共役型ロドプシンを、ゼブラフィッシュの網様体脊髄路 V2a ニューロンまたは心筋細胞で発現し光操作ツールとしての活性を検討した。チャネルロドプシン *GtCCR4*、*KnChR*、*guanylyl cyclase* ロドプシンおよびハエトリグモ由来の *Gq* 共役型ロドプシンが、網様体脊髄路 V2a ニューロンの活動を光刺激依存的に活性化し遊泳誘導できるところ、*GtCCR4*、*KnChR* およびハマダラカ、フグおよびヤツメウナギ由来の *Gi/o* 共役型ロドプシンを心筋細胞に発現することにより、光刺激依存性に心拍を制御できることを明らかにし 2 報の論文として発表した(Hagio et al., *eLife* 2023; Hagio et al., *eLife* 2023)。これらのツールを任意の細胞に発現させることができるトランスジェニックフィッシュを National Bioresource Project (NBRP)に寄託する手続きを行っている。生体内で有用な 2 次メッセンジャーの光操作ツールを見出したことは、ゼブラフィッシュだけでなく、多くの脊椎動物種での細胞・器官の機能解析に有用な研究手段を提供する。

<代表的な論文>

1.

A. Pushkarev, K. Inoue, S. Larom, J. Flores-Urbe, M. Singh, M. Konno, S. Tomida, S. Ito, R. Nakamura, S. P. Tsunoda, A. Filosof, I. Sharon, N. Yutin, E. V. Koonin, H. Kandori*, O. Béjà*: "A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered via functional metagenomics", *Nature* 558, 595-599 (2018).

概要: これまでの研究で微生物ロドプシンにはイオンポンプやイオンチャネル、センサー、光活性化酵素といった様々な機能が見出され、光操作ツールとしても大きな期待を集めているが、そのすべてがタイプ1と呼ばれるロドプシンファミリーに属していた。ところが 2018 年、神取グループは既知のロドプシンと配列相同性を持たないロドプシンを発見し、ヘリオロドプシンと名付けた。ヘリオロドプシンはタイプ1と同様、多くの微生物やウイルスが持っており、基礎研究という点でも、将来の光操作応用という点でも、分野の内外に強いインパクトを与えた。

2. S. Wada, B. Shen, E. Kawano-Yamashita, T. Nagata, M. Hibi, S. Tamotsu, M. Koyanagi, A. Terakita*: "Color opponency with a single kind of bistable opsin in the zebrafish pineal organ", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 11310-113115. (2018)

概要: ゼブラフィッシュの松果体(脳内光受容器)では、パラピノプシンと呼ばれる1種類の光受容タンパク質により色識別がなされていることを寺北グループが発見した。光平衡型であるパラピノプシンの暗型が紫外線光受容を担い、可視光に反応する光産物が可視光受容を担う。このパラピノプシンによる色識別は「色覚には複数種類の光受容タンパク質が必須」という従来の考えを覆す発見と言える。1 種類の光受容タンパク質による色検出システムは、「色」で細胞や動物の行動をコントロールする光遺伝学にも応用でき、生命機能解明への貢献が期待さ

れた。

3. W, Koyama, R. Hosomi, K. Matsuda, K. Kawakami, M. Hibi*, T. Shimizu T*: “Involvement of Cerebellar Neural Circuits in Active Avoidance Conditioning in Zebrafish”, *eNEURO* 8(3):ENEURO.0507-20.2021. (2021)

概要：動物は、ニュートラルな条件刺激(CS)と嫌悪的な無条件刺激(US)の組み合わせを、繰り返し受けることで、CS と US の関係を学習し、CS 後に条件つき恐怖応答を示すようになる。条件づけ恐怖応答には、フリージングやパニック動作などの古典的恐怖条件づけと嫌悪刺激を回避する能動回避が含まれる。これまで、古典的恐怖条件づけにおける小脳の役割が示唆されているが、能動的回避条件付けに小脳が関与しているかどうかは不明であった。本研究では、野生型ゼブラフィッシュに CS(光)と US(電気ショック)のペアを繰り返し与えたところ、約半数の個体が能動回避を示した。神経伝達物質の放出を抑制するボツリヌス毒素を用いて小脳顆粒細胞またはプルキンエ細胞の機能を阻害した場合や、ニトロレダクターゼを用いてプルキンエ細胞を除去した魚では、能動回避の条件づけが抑制されることが明らかになった。これらの結果は、ゼブラフィッシュの小脳が能動的回避条件付けに積極的に関与していることを示唆している。

4. H. Hagio, W, Koyama, S. Hosaka, A.D. Song, J. Narantstsrar, K. Matsuda, T. Shimizu, S. Hososhima, S.P. Tunoda, H. Kandori, M. Hibi*: “Optogenetic manipulation of neuronal and cardiomyocyte functions in zebrafish using microbial rhodopsins and adenylyl cyclases”, *eLife* 12:e83975. (2023)

概要：微生物由来の光感受性タンパク質は光遺伝学に利用されてきたが、生体内の細胞や組織の機能を正確に光制御するためには、光感受性タンパク質ツールの使用方法を最適化する必要がある。この論文では、藻類由来のカチオンチャンネルロドプシンである *GtCCR4* と *KnChR*、真菌由来のグアニリルシクラーゼロドプシンである *BeGC1*、シアノバクテリア(*OaPAC*)または細菌(*bPAC*)由来の光活性化アデニリルシクラーゼ(PAC)を利用して、ゼブラフィッシュの細胞機能を制御した。遊泳運動に関与する後脳網様体脊髄 V2a ニューロンにおいて *GtCCR4* と *KnChR* を光活性化すると、比較的短い潜時で遊泳行動が誘導されたが、*BeGC1* や PAC を活性化すると長い潜時で遊泳行動が誘導された。心筋細胞における *GtCCR4* と *KnChR* の活性化は心停止を誘導したが、*bPAC* の活性化は徐脈を徐々に誘導した。*KnChR* の活性化は心臓の細胞内 Ca^{2+} の増加をもたらし、脱分極が心停止を引き起こしたことを示唆した。これらのデータは、ゼブラフィッシュの神経細胞と心筋細胞の機能と制御を明らかにするために、これらの光遺伝学的ツールが使用できることを示唆している。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 神取グループ

研究代表者: 神取 秀樹 (名古屋工業大学工学研究科 教授)

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
- ・新奇ロドプシンのツール開発
- ・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

主たる共同研究者: 山下 高廣 (京都大学理学研究科 講師)

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 GPCR の改変とツール開発
- ・光サイクル型 GPCR の有用性の実証

③ 寺北グループ

主たる共同研究者: 寺北 明久 (大阪公立大学理学研究科 教授)

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

主たる共同研究者: 日比 正彦 (名古屋大学理学研究科 教授)

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
- ・光操作による小脳神経回路機能の解析

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

神取グループが創成した光駆動内向きプロトンポンプは、柚崎グループや松田グループ(柚崎チーム)によりエンドサイトーシスを光制御することで小脳における長期抑圧と運動学習との関係を調べる実験に活用されている。さらに陽イオンチャネルロドプシン GtCCR4 は、磯村グループ・大塚グループ・渡部グループ(磯村チーム)によりプレシナプスの光遺伝学ツールとして活用されようとしている。

脳研究への応用に加えて、網膜色素変性症などにより失明された方への視覚再生への試みにおいても神取グループのツールは期待されている。名大・寺崎研では GtCCR4 や酵素ロドプシン、慶応大・坪田研では微生物ロドプシンと動物ロドプシンのキメラを用いた視覚再生への取り組みが行われている。さらに産業界との連携で言えば、第一三共が陽イオンチャネルロドプシン GtCCR4 の高い光感度に着目し、名古屋工業大学・三菱 UFJ キャピタルとともに視覚再生のための遺伝子治療薬に関するオープンイノベーション研究を 2020 年 4 月に開始した(企業名: OiDE OptoEye)。

開発したツールの評価にはメカニズムの解析が欠かせないが、領域アドバイザーの濡木教授とは理想的な構造機能相関の共同研究を行っている。また領域内では、山中グループとも共同研究

を行っている。領域外では、米国の Deisseroth 研やドイツの Hegemann 研など 10 以上の国の研究室とメカニズムに関する共同研究を進めている。

山下グループが初めて見出した光サイクルで活性が制御される動物ロドプシンは、その詳細なメカニズム解析が進めば他の動物ロドプシンに導入し新規光操作ツールに活用できる可能性がある。そこで、最初に見出した Opn5L1 のメカニズム解析のために、領域アドバイザーの濡木教授およびカナダの Ernst 研と構造機能相関の共同研究を行っている。また、Opn5L1 の一部のメカニズムを視覚ロドプシンに導入して創製した新規光サイクル型 GPCR について、視覚再生のための遺伝子治療薬開発を進めるベンチャー企業レストアビジョンと特許の共同出願を済ませ、失明者の視覚再生に向けた共同研究を行っている。

寺北グループが開発した Gq-共役型の GPCR ツールを柚崎グループ(柚崎チーム)と櫻井グループ(柳沢チーム)に共同研究として提供した。柚崎グループでは既に提供した Tg マウスも用いて、小脳の長期抑圧を促進するツールとしての可能性が検討されている。また、櫻井グループ(柳沢チーム)では、提供したツール・AAVを用いて、視床下部の神経細胞を興奮性に光操作することにより、長期にわたる低代謝状態の制御の検討が継続中である。永田崇博士(東京大学)とは光オフ型ロドプシン(ペロプシン)変異体を用いた網膜変性症の光感度回復に関する共同研究を継続している。また、光平衡型ロドプシン類の構造学的解析を Schertler 教授(スイス、PSI)との共同研究で解明した(PNAS, 2019)。パラピノプシンを利用した光遺伝学的研究を Lucas 教授(英国、マンチェスター大)と行い、現在論文を投稿中である。

日比グループは、ゼブラフィッシュを用いた小脳神経回路形成および機能解析のパイオニア的存在であり、開発した小脳関係のトランスジェニックゼブラフィッシュを、アメリカ Harvard University、Rockefeller University、University of Utah、Northwestern University、New York University、ドイツ Max Planck Institute、インド National Centre for Biological Sciences、ポルトガル Champalimaud Foundation、イスラエル Weizmann Institute を含む多くの大学・研究所に供与し、情報交換を行っている。その中から、共同研究としての論文が発表されつつある(Karolinska Institutet との共同研究:PNAS 2020)。

ロドプシン研究は様々な学問分野にまたがっているが、分野で最も重要な国際会議が「レチナル蛋白質国際会議 International Conference on Retinal Proteins」であり、神取と寺北をオーガナイザーとして、2020 年 6 月に日本(伊勢志摩)での開催が決定していた。JST の支援を受け、組織委員には影山総括、アドバイザーの河村氏、永井氏、濡木氏にも加わっていた。コロナ禍のため 3 回の延期を余儀なくされたが、2022 年 11 月に札幌で開催される。

