

## 研究終了報告書

### 「哺乳類の非オプシン型青色光受容体 **CRY** の機能の再検証とその光遺伝学的応用」

研究期間：2019年4月～2022年9月

研究者：平野有沙

#### 1. 研究のねらい

細菌からヒトに至るまで、生物は外界の光環境に適応するために様々な種類の光受容タンパク質を介した光応答システムを構築してきた。特に近年では、光によって生命現象を操作する光遺伝学ツールとしてこの内在性の光応答システムの応用が注目されているが、革新的な光操作技術の開発には分子レベルでの光反応機序の解明が不可欠である。光環境に大きく影響を受ける生命現象として概日時計の光同調がよく知られている。概日時計は、複数の時計遺伝子によって構成された分子振動体であり、多くの生命現象が示す約1日周期の概日リズムを生み出す。概日時計の中樞は視床下部の視交叉上核 (SCN) に存在し、網膜からの光情報を受け取って時刻をリセットすることで外界の明暗サイクルに同調する。概日時計の光リセットに加えて、マウスにおける急性的な睡眠誘導や瞳孔反射などの視覚情報を伴わない光応答は非視覚光応答と呼ばれるが、分子レベルでシグナリングの解析が進む視覚型の光受容に比べて、非視覚光受容の理解は遅れている。

哺乳類の非オプシン型光感受性因子である **Cryptochrome (CRY)** は、ハエや植物では発色団 **FAD** と結合して青色光を吸収する活性を示す。しかし、*Cry1/2* の二重欠損マウスは行動リズムの消失という強力な表現型を示し、さらに転写抑制因子として概日時計の”発振系”として機能することが判明した。つまり、哺乳類 **CRY** は他生物の光感受性タンパク質と進化的によく保存されたドメインを持っているにも拘らず光非依存的な役割ばかりがハイライトされてきたため、網膜の光応答における機能とその反応機構についてはよくわかっていない。一方、オプシン型の青色光受容体である **OPN4** (メラノプシン) は主要な概日光同調因子であるが、視細胞 (桿体と錐体) 変性マウス (*rd/rd*) において *Cry* を欠損させると非視覚性の光反応が見られなくなる。つまり、**OPN4** 単体では概日光受容には十分ではなく **CRY** を介した未同定の光受容メカニズムの存在が示唆されている。本研究課題では、哺乳類 **CRY** と非視覚型光受容体 **OPN4** の機能的連関に焦点を絞り、哺乳類における新規光応答メカニズムに分子レベルで迫る。さらに、光による分子的ダイナミクスを利用して新たな光遺伝学ツールへ発展させることを長期的な目標とした。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

本研究課題では、哺乳類 **CRY** と非視覚光受容に重要な役割を果たす **OPN4** の機能的連関を探り、哺乳類における新規光応答メカニズムを分子・個体レベルで明らかにした。さらに、**OPN4** を用いた新しい神経細胞の操作ツールを開発した (Takahashi\*, Hirano\* *et al.*, *Cell*

Reports Methods, in press)。

これまでに培養細胞を用いた OPN4 活性の評価系を構築し、CRY の発現によって OPN4 の光依存的な Gq シグナリングの活性化が促進されることを見出した。さらに、*Cry1* および *Cry2* の機能阻害によって、OPN4 の活性は抑制された。分子メカニズムに迫るため、CRY1 と OPN4 または Gq シグナリング因子との相互作用を解析したところ、CRY1 は Gq アルファサブユニットである GNAQ と相互作用することが明らかとなった。さらに、細胞カルシウムイメージングを行い、OPN4 と青色光に依存したカルシウム応答を解析したところ、CRY1 または CRY2 の過剰発現によってカルシウム応答が顕著に上昇することが判明した。培養細胞を用いた解析に加え、*Cry1* のコンディショナルノックアウトマウスを作成し、個体の光応答を調べた。眼球依存的に *Cry1* 遺伝子をノックアウトしたところマウスは明暗サイクルに同調できなくなることが明らかとなった。これらの結果より、CRY 存在下で OPN4 の活性は上昇し、CRY は非視覚型光受容に必須であると考えられた。

また、OPN4 と CRY を用いた光遺伝学ツールを作成する過程で C 末端欠損型 OPN4 単体 (OPN4dC) でも既存ツールに比べて超高感度、長期間にわたる神経操作が可能であることを見出した。そのため、神経操作の評価系としてマウスの冬眠様行動誘導系を用いて、被侵襲型 OPN4dC による神経操作技術の開発と性状解析をおこなった。改変型 OPN4 は野生型 OPN4 に比べて大きなカルシウム応答を示した。さらに、電気生理学的解析を行い、改変型 OPN4 を発現させた神経において青色光の照射によって神経発火頻度と膜電位が上昇することを見出した。また改変型 OPN4 は高感度であるため、脳表に取り付けた青色 LED デバイスによる非侵襲刺激が可能であった(さきがけ 1 期生徳田崇教授との共同研究)。OPN4 によって誘導した冬眠様状態は、他の既存ツールでの誘導に比べて長期間誘導可能であり(24 時間)、さらに微弱な光を使用するため脳の損傷を誘発しなかった。

## (2) 詳細

### 計画 1. OPN4 の光応答に対する CRY の影響

培養細胞において OPN4 の光応答を観察するための実験系を構築した。*Opn4* の発現を第三世代 Tet-ON システムによりドキシサイクリン依存的に誘導し、発現を時期依存的に制御するとともに発現量を上昇させた。この実験系を用いて CRY による OPN4 の光活性化を解析したところ、CRY の発現により OPN4 依存的な G タンパク質シグナリングの亢進が確認できた。逆に、*Cry1* と *Cry2* の機能阻害は OPN4 依存的な G タンパク質シグナリングを減弱させた。この実験系を用いて、様々なドメイン欠損型 CRY を用いて OPN4 依存的な光活性化を評価したところ、CRY の転写抑制活性に必要な C 末端および Coiled-coil ドメインは必要ないことが判明した(図 1)。つまり、CRY の OPN4 の活性調節は CRY に制御される転写を介したものではないと考えられた。また N 末端欠損型、FAD 結合ドメイン欠損型 CRY1 も OPN4 応答を上昇させたため、FAD 結合ドメイン以降から Coiled-coil ドメインが OPN4 の制御領域と考えられるが、さらなる解析が必要である。

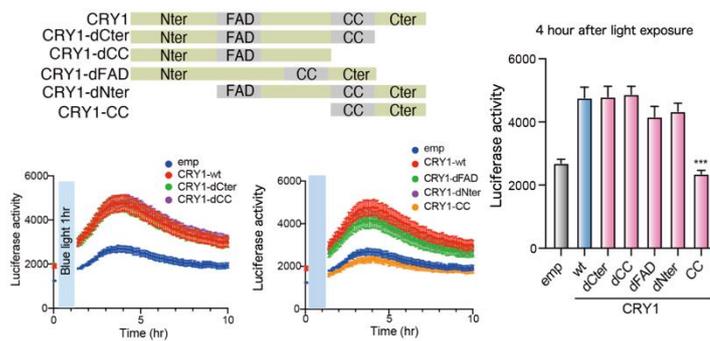


図1. CRY1/2発現細胞における光照射時のカルシウム応答。  
A. HEK293T細胞にOPN4（野生型）および様々なドメイン欠損タイプのCRYを発現させた。青色光（485nm, 60 min）を照射してNFAT-LucのLuc活性を測定した。

次に、CRY による OPN4 応答への作用点を探るため、相互作用因子の同定を試みた。スプリット型の低分子ルシフェラーゼを目的タンパク質 (Nano-Bit システム) に結合させることで、相互作用をルシフェラーゼ発光により可視化した。CRY1-SmBit および OPN4-LgBit (SmBit および LgBit がそれぞれスプリットさせたルシフェラーゼ部分である) では顕著な発光値の上昇は観察されなかった一方、CRY1-LgBitと GNAQ-SmBit では発光値が優位に上昇した。このことは、CRY が Gq シグナリング因子と直接相互作用して、シグナリング活性を制御していることを示唆する。これまでに、CRY と OPN4 を細胞に共発現させて NFAT-Luc による Gq シグナリングの可視化をおこなうと、光による NFAT-Luc の活性化が CRY の発現によって上昇することを見出した。しかし、NFAT-Luc の評価系は時間スケールが長く、OPN4 やそのシグナリング因子に直接相互作用することによる効果なのかは判断つきにくかった。そこで、蛍光インジケーターである Fluo4-AM を用いて Gq シグナリングのセカンドメッセンジャーであるカルシウムの測定を行った結果、CRY を発現させた細胞においてカルシウム濃度の応答が増強していた (図2)。これらのことから、CRY は直接 OPN4 が活性化する Gq シグナリングを制御していると考えられた。

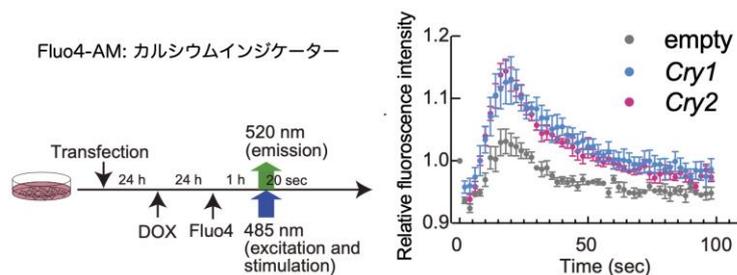


図2. CRY1/2発現細胞における光照射時のカルシウム応答。  
HEK293T細胞にOPN4（野生型）およびCRYを発現させた。カルシウムインジケーターである Fluo4-AM を投与し、青色光（485nm, 500msec/2sec）を照射して同時に蛍光を検出した (n=4, mean±SEM)。

## 計画 2. コンディショナルノックアウトマウスの解析

筑波大学動物資源センターの協力のもと、*Cry1*, *Cry2* コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作成した。*Cry1* cKO において Cre を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) を視交叉上核 (SCN) にインジェクションすることによって SCN における CRY1 の発現が大きく減弱することを免疫化学組織染色によって確認した。*Cry1* の cKO マウスにおいて、網膜に Cre を発現する AAV をインジェクションすると弱い光 (10 ルクス程度) による概日時計同調が弱まる、または全く

できなくなることを明らかにした(図3)。つまり、網膜における *Cry1* の発現が概日光受容に重要であると考えられた。また、*Cry1* の KO が、強い光には同調することから *Cry2* の寄与が考えられたため、*Cry1* と *Cry2* の二重変異マウスの解析も進めている。

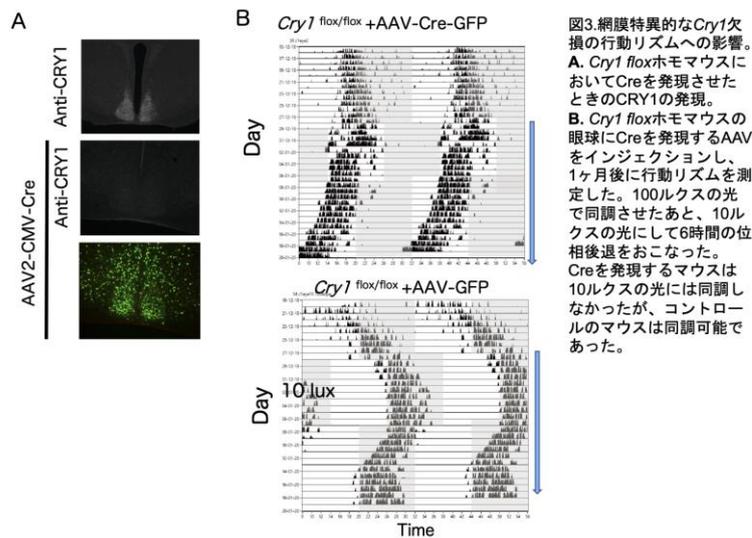


図3.網膜特異的な*Cry1*欠損の行動リズムへの影響。  
**A.** *Cry1 flox/flox*ホモマウスにおいてCreを発現させたときのCRY1の発現。  
**B.** *Cry1 flox/flox*ホモマウスの眼球にCreを発現するAAVをインジェクションし、1ヶ月後に行動リズムを測定した。100ルクスの光で同調させたあと、10ルクスの光にして6時間の位相後退をおこなった。Creを発現するマウスは10ルクスの光には同調しなかったが、コントロールのマウスは同調可能であった。

### 計画 3. OPN4 を用いた神経操作系の確立

所属研究室では、視床下部に存在する QRFP 産生ニューロンの活性化により体温が大きく低下する現象を見出している (Takahashi *et al.*, *Nature*, 2020)。この現象を「評価系」として用いて CRY と OPN4 を利用した光遺伝学ツールへの発展を目指した。まずは、hOPN4 単体での効果を確認するため、hOPN4 をマウス脳内にウイルスを発現させて照射したところ、通常チャンネルロドプシンに用いるような光の 1/1000 以下の強度の光 (200  $\mu\text{m}$  径の光ファイバカニューレの先における光強度: 3-10 mW) で hOPN4 が十分に活性化されること、さらに体温低下という生理現象を引き起こすことが明らかとなった。思いがけず OPN4 単体での効果が強く、CRY の発現の効果が見えづかったため、まずは OPN4 単体が光遺伝学ツールとして有用であるかどうか検証することとした。野生型 OPN4 に青色光をあてたときの効果は薬理遺伝学により QRFP ニューロンを活性化させたときよりも小さかったため、より高い効果を得るために OPN4 の不活性化に必要な C 末端ドメインを欠損させた改変体(OPN4dC)を作成した。OPN4dC を発現した培養細胞において青色を照射したときのカルシウム応答の上昇および Gq シグナリングの代謝産物である IP1 濃度の上昇が観察された。さらに、OPN4dC は野生型 OPN4 と同様に膜に局在すること、青色光にもっとも強く反応することを確認した。

次に、OPN4dC による神経操作が可能かどうかを確認するために、初代培養系を用いたニューロンの電気生理学的解析をおこなった。ラット大脳皮質ニューロンに OPN4dC を発現させて青色光を照射したときの電気応答を調べたところ、チャンネルロドプシンとは異なり極めて遅い持続的な応答を示した (図 4)。この結果は、先行研究で調べられている OPN4 陽性網膜神経節細胞や OPN4 を発現させたオレキシン産生神経の電気生理応答とよく一致している。さらに、実際に評価系に使用している QRFP 産

生ニューロンにおいても応答が見えるかどうかを調べるために、QRFP 産生ニューロンを含む脳スライスを用いたカルシウムイメージングをおこなった。その結果、チャンネルロドプシンに用いる光に比べて十分弱い光でもカルシウム応答が観察されることが判明した。

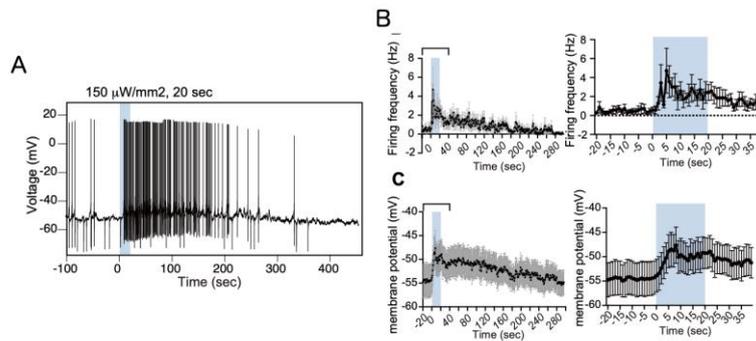
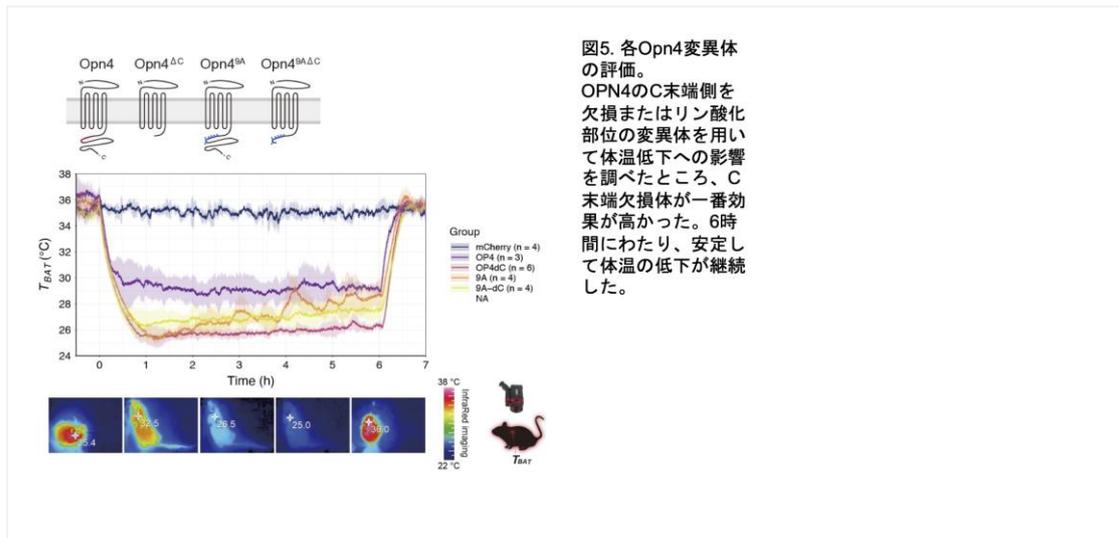


図4.OPN4dCによる神経活動の操作

A. ラット大脳皮質の初代培養ニューロンにOPN4dCを発現させ、青色光を照射したときの応答。  
B. 1秒ごとの発火頻度および膜電位の変化。

OPN4dC が極めて高感度に冬眠様状態を誘導できることから、LED を用いた非侵襲刺激を試みた。マウスに取り付ける LED デバイスは、LED デバイス開発に関して業績の豊富なさきがけ 1 期生徳田崇教授と共同で開発し、非侵襲で生理的な効果（体温の低下）が観察された。さらに、非侵襲刺激による電気応答をとるため、OPN4dC を比較的浅い脳領域に位置する海馬 CA1 領域に発現させ、同じ領域に電極を埋め込み自由行動下のマウスから神経活動を記録したところ、頭上からあてた光でも十分な神経活動の上昇が観察された。

薬理遺伝学を用いた先行研究 (Takahashi *et al.*, *Nature*, 2020) では、冬眠様状態からの回復がなだらかでいつから回復したのかははっきりせず、野生の冬眠動物で観察されるような急激な体温の回復（冬眠からの目覚め）は模倣できていない。一方、OPN4 を用いると冬眠様状態の ON と OFF の時間を自由に規定でき、冬眠様状態を誘導させたときの回復は極めて自然の冬眠からの目覚めに似ていた (図 5)。そこで、この状態で複数の生理指標を観察したところ、冬眠誘導および回復期において体温の低下に先駆けて心拍数の急激な低下が観察された。つまり、冬眠誘導神経として考えられている QRFP 産生神経による自律神経系を介した心機能の抑制が示唆された。以上の結果を論文としてまとめて発表した (Takahashi\*, Hirano\*# *et al.*, *Cell Reports Methods*, in press, \*co-first, #責任著者)。



### 3. 今後の展開

本研究で得られた成果は既に複数の共同研究に発展している。特に、OPN4dCを用いることで長期間の神経操作が可能になり、光遺伝学による冬眠様行動は薬理遺伝学を用いるよりはるかに高時間分解能であるため、非常に有用であり今後の発展が見込まれる。今後、このツールを用いて長期間の神経操作が必要となる概日時計や睡眠の分野において特定の神経集団を刺激した際の生理応答を観察していく予定である。今後は、CRYの時計ニューロン以外の部位における非古典的機能について掘り下げるとともに、生体の網膜において光受容を行っている可能性を検証していく。

### 4. 自己評価

#### 研究目的の達成状況、研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

当初は、CRYの光受容体としての潜在能力に着目していたが、本研究でCRYがOPN4のGqシグナリングをタンパク質相互作用により調節する役割が明らかとなった。一方、光依存的な相互作用の変化などの解析を試みたが、いずれもネガティブであり哺乳類のCRYが光によって活性化するかどうかは結論できなかった。しかし、マウス個体を用いた解析から眼球におけるCRYの発現が概日光受容に必要であると示せたことは、これまで視交叉上核(SCN)における機能ばかりがハイライトされていた中、新たな知見をもたらしたとして評価できる。論文として形にするまで至らなかったが、準備段階に入っており、早いうちに発表を目指している。光遺伝学ツールの開発に関しては、当初の計画では、CRYとの相互作用などを見込んで完成を目指していたが、様々な条件検討によりこれまでOPN4が汎用的に使用されてこなかった背景に光強度の問題があることが判明した。つまり、これまで刺激する光が強すぎて効果がうまく見えなかった可能性があり、刺激条件をうまく整えることでOPN4dC単体でも優れたツールとして使用可能であると考えられた。計画とは異なる方向に研究が進んだが、必要な軌道修正であったと考えている。

#### 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果:

科学技術に関しては、光遺伝学が神経科学においてスタンダードな解析技術となり、その開発のスピードも極めて早い。その中で、我々はOPN4dCが既存ツールに比べて長期間刺激可能であ

ることを示し、生理機能の解明における有用性を示すことができた。既にこのツールを用いた共同研究がスタートしており、今後も増えると思込まれる。

一方、光遺伝学ツールの開発、という観点ではなく極めて自然な冬眠状態が誘導可能となった、という観点でも評価できる。本研究ではこれまでに、**QRFP** 産生ニューロンを **OPN4dC** によって活性化したときの体温への効果だけでなく循環機能への影響も調べ、冬眠様行動において自然の冬眠と同じように極めて早い時間スケールで循環器への影響が観察された。今後、人工冬眠の技術は救命救急や臓器移植における実装を考える上で、冬眠様行動が生体機能にどのような影響を及ぼすのかを解析する必要があるが、本研究で得られた知見はこれらにアプローチする非常に有用なツールとなりうる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

### (2) 特許出願

研究期間全出願件数:0件(特許公開前のものも含む)

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

2020.6.1 2020 Society for Research on Biological Rhythms (SRBR) meeting, S10 シンポジウム, (online)

タイトル:Function of CRY in photo-sensing in mouse retina

2020.12 第43回日本分子生物学会, 1PS-10 WPI ジョイントシンポジウム, (online)

タイトル:Regulatory mechanism and novel function of CRYPTOCHROME in the mammalian circadian clock system.

2021.7 Asian Forum on Chronobiology2020, Symposium, (Kaifeng, China or online) Young PI symposium

タイトル:CRY-mediated activation of photo-sensing signaling of the circadian clock in mice

2021年6月令和3年度若手教員特別奨励賞、筑波大学

2021年4月令和3年度科学技術分野の文科科学大臣表彰若手科学者賞