

## 研究終了報告書

### 「”All-optical”な電気生理学による植物個体の膜電位操作技術の創出」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：井上(今野) 雅恵

#### 1. 研究のねらい

本研究は、微生物ロドプシン及びその変異体を膜電位操作および膜電位変化検出のためのツールとして植物個体に導入することで、膜電位の操作と観察の双方を光により行う”All-optical”な電気生理学を用いた膜電位操作技術により個体の膜電位を積極的に制御するための技術を開発することを目的とする。

植物において膜電位形成は気孔開閉・病虫害に対する防御応答・形態形成・物質輸送など、様々な生理現象に関わっている。膜電位形成が生命活動に対して持つ機能を理解するためには、その機能を計測する技術に加えて、操作できる技術が必要である。しかし、積極的に膜電位を操作する技術については、従来の植物の膜電位研究で用いられている変異体作製、薬剤処理、電気刺激などの手法では、膜電位を任意の部位・時間で可逆的に制御することが難しい。これに対し、動物細胞、特に神経細胞の機能制御に利用されているオプトジェネティクス技術はこの限界を突破できる唯一の技術である。しかし、植物細胞の生理現象を可視光によるオプトジェネティクスで操作した例は少ない。植物細胞でオプトジェネティクスの適用が難しい理由として、植物が持つ光受容体を利用する青色光、および赤色光～近赤外光領域は、内生の光反応に影響を及ぼす可能性があるため、利用できる波長領域が限定されてしまうことが挙げられる。これに対し、微生物ロドプシンは、all-trans 型レチナールを同一の発色団として持ちながら極大吸収波長が450-600nm という幅広い波長域にわたることが特徴であり、陸上植物が持つ光受容体が吸収できない波長域をカバーしている。従って、微生物ロドプシンを膜電位制御ツールに用いることで、内生の光受容体を活性化することなく、細胞傷害が少ない可視光を用いて膜電位を制御することができる。

一方、膜電位の検出を光で行う技術として、膜電位変化により蛍光強度や発光強度が変化する、膜電位感受性タンパク質を利用した膜電位可視化技術が近年開発され、神経細胞の膜電位操作と膜電位の経時的変化の検出をすべて光により行う、”All-Optical”な電気生理学が可能になった。これらの知見を踏まえ、本研究では、微生物型ロドプシンの光駆動イオン輸送による膜電位操作と、電位依存性蛍光タンパク質による膜電位変動の可視化を組み合わせ、個体レベルでの膜電位の操作と観察をすべて光で行う系を開発する。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

植物材料の作製にあたり、膜電位操作・検出ツールとして用いるタンパク質を植物細胞内に発現させるため、植物細胞内で恒常的に遺伝子発現を誘導するプロモーターで膜電位操作・検出ツールの発現を独立に制御するコンストラクトを作製した。これを Arabidopsis T87 培養細胞へ一過的に導入した。導入後に蛍光顕微鏡観察を行うことにより、それぞれのタンパク質発

現に培養細胞内で発現していることを確認した。また、このコンストラクトを *Arabidopsis thaliana* に導入した形質転換植物を作製した。植物細胞において膜電位操作ツールとして働く微生物ロドプシンに関する報告はまだ少ないため、膜電位操作ツールとして用いるカチオンチャンネルロドプシンについてこれを発現した培養細胞を用いてパッチクランプ法による光電流測定を行い、光依存的な電流の発生を確認した。この結果から、本研究で用いているカチオンチャンネルが植物体内で膜電位操作ツールとして機能することが示された。

膜電位操作・観察装置の構築については、蛍光顕微鏡に光刺激用のレーザー光源及び高速・高感度の EMCCD カメラを組み合わせることで構築した。蛍光顕微鏡部は刺激光源と励起光源を別々に制御できるように光路を設定し、励起光源は LED の ON/OFF、刺激光源は電磁シャッターを用いてそれぞれがミリ秒レベルでの ON/OFF を制御できるようにした。また、膜電位センサータンパク質の検出波長が 700 nm と長波長であるため、EMCCD カメラは長波長領域の感度が高いものを導入した。

構築した膜電位操作・観察装置、及び培養細胞への一過的発現系を用いて培養細胞の膜電位イメージングを行った。膜電位操作ツールとしてはカチオンチャンネルロドプシン及びアニオンチャンネルロドプシンを用い、膜電位検出ツールとしては QuasAr1 及び QuasAr3 を用いた。この結果、カチオンチャンネル・アニオンチャンネルのいずれについても膜電位の脱分極に由来すると考えられる膜電位操作ツール由来のシグナル強度増加を検出することができた。以上の成果により、本課題の目的である”All-optical”な電気生理学を用いた膜電位操作技術開発の基盤となる植物材料及び装置系を構築することができた。

## (2) 詳細

### A. 膜電位操作・観察ツールを導入した形質転換植物の作製

膜電位操作および検出に用いる微生物ロドプシンおよび膜電位感受性タンパク質を発現する形質転換体を作製するため、核ゲノムに目的遺伝子を導入できる発現用コンストラクトを作製した。遺伝子発現を誘導するプロモーターには、下流につないだ遺伝子を恒常的に発現させるカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来 35S プロモーターを用いた。膜電位操作ツールとしては、35S プロモーターの下流に目的の微生物ロドプシン遺伝子として外向きプロトンポンプ・外向きナトリウムポンプ・内向き Cl<sup>-</sup>ポンプ・カチオンチャンネルおよびカチオンチャンネル・アニオンチャンネルの 6 種それぞれと蛍光タンパク質 DsRed の融合遺伝子を導入し、微生物ロドプシンの C 末端側に DsRed が付加された融合タンパク質として発現するように設計した。膜電位検出ツールとしては、35S プロモーターの下流に膜電位感受性蛍光センサータンパク質、および膜電位感受性発光センサータンパク質をコードする遺伝子を導入した。

作製したコンストラクトは培養細胞への一過的導入系、及びアグロバクテリウムを用いた植物体の形質転換系を用いて植物体に導入した。培養細胞について蛍光顕微鏡下での観察を行い、カチオンチャンネル及びアニオンチャンネルと蛍光膜電位センサーの共発現系で膜電位操作・検出双方のタンパク質が細胞内に発現していることを確認した。また、同一のコンストラクトを用いて *A.thaliana* 形質転換個体を作製した。

## B. 膜電位操作ツールの細胞内発現確認と光電流測定

膜電位観察系を構築するに当たり、膜電位感受性タンパク質から得られるシグナルを実際の膜電位変化と比較して定量的に議論するために、膜電位操作ツールを発現している植物培養細胞を用いてパッチクランプ法による光電流測定を試みた。細胞膜にカチオンチャンネルロドプシンが局在している細胞から調整したプロトプラストを用いて、ルーズパッチ法により光電流を測定し、光刺激によって細胞内向きに流れる光電流の発生が確認できた。この結果、カチオンチャンネルロドプシンが植物細胞において膜電位操作ツールとして働くことが示された。

## C. 膜電位操作・観察用顕微鏡システムの構築

膜電位操作・観察系は蛍光顕微鏡に光刺激用のレーザー光源及び高速・高感度のEMCCDカメラを組み合わせて構築した(図1)。蛍光顕微鏡部は刺激光源と励起光源を別々に制御できるように光路を設定し、励起光源はLEDのON/OFF、刺激光源は電磁シャッターを用いてそれ

ぞれがミリ秒レベルでのON/OFFを制御できるようにした。また、膜電位センサータンパク質の検出波長が>700 nmと長波長であるため、EMCCDカメラは長波長領域の感度が高い製品を選択した。

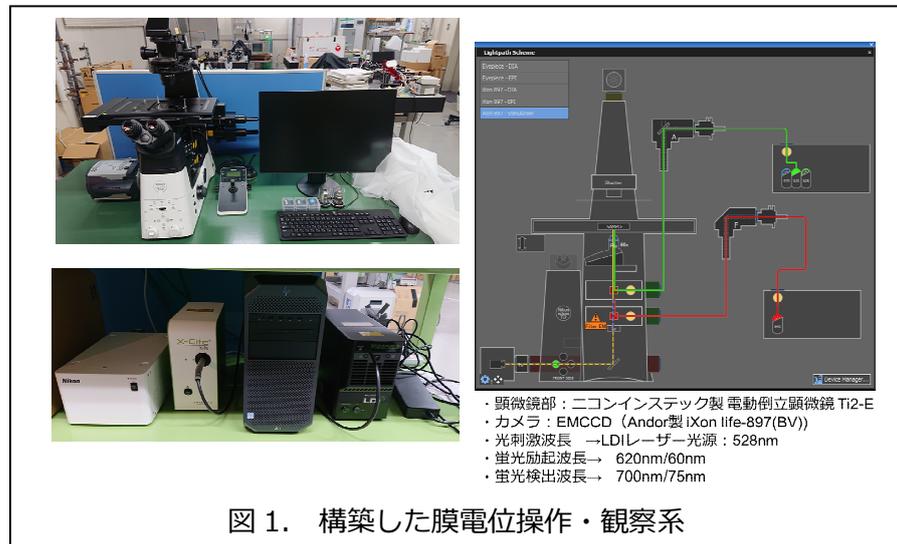


図1. 構築した膜電位操作・観察系

## D. 培養細胞レベルでの膜電位の可視化と観察条件の検討

上記の観察系を用い、細胞レベルでの膜電位可視化を試み、光刺激による膜電位変化に相当すると考えられる膜電位センサータンパク質のシグナル変化の検出を試みた。

まず、予備的に電位変化が観察されていた光駆動カチオンチャンネルロドプシンと蛍光膜電位センサータンパク質を一過的に *Arabidopsis* T87 細胞に発現する試料を用いた。光照射は528nmのダイオードレーザーを用い、「60ms 暗条件→300ms 光照射→330ms 暗条件」を単位サイクルとして行った。膜電位センサー由来のシグナルは30ms毎に取得した。取得した膜電位センサー由来の蛍光画像に対し、個別の細胞全体を囲む形で関心領域(Region of Interest, ROI)を設定し、ROI毎の蛍光強度の定量化を行った。この結果、光照射直後が最も高く、その後減衰して定常状態に近づいた後、光照射終了と共に急激に減衰するという蛍光変化のパターンが繰り返し観察された。この系ではカチオンチャンネルが膜電位を光依存的に

脱分極させることで膜電位センサーの光依存的な蛍光強度増加が見込まれたことから、ここで得られたシグナルは膜電位変化を反映したものであると考えた。また、アニオンチャネルと膜電位センサータンパク質の組み合わせについてもカチオンチャネルと同様の蛍光変化のパターンが観測された。先行研究 (Zhou et al. *Nature Plants* 7.2 (2021): 144–151) で植物細胞においてはアニオンチャネルロドプシンも脱分極ツールとして機能することが報告されていることから、ここで得られたシグナルも膜電位変化を反映したものであると考えられた。

一方、実際の観察過程で、クロロフィル蛍光に由来すると思われる高いバックグラウンドと、繰り返し刺激による膜電位センサーの蛍光褪色の問題が明らかになった。この点を解決するにあたり、蛍光顕微鏡のフィルターセットの検討、及び膜電位センサー分子種の検討が必要であると考えられた。

#### E. 微生物ロドプシンの分子物性に関する研究成果

新奇微生物ロドプシンの分子物性を研究することで植物の膜電位操作・検出に有用な性質を見出すことで今後の植物オプトジェネティクスの発展に寄与できると考え、微生物ロドプシンの分子機能に関する研究を国内外の共同研究者と共に行った。その中で、共生細菌である *Saccharibacteria* 由来の新奇ロドプシン *SacR* が分子外に存在するレチナールを高効率で取り込み、プロトンポンプとして機能することを明らかにした (Jaffe, Konno et al., 2022, *The ISME Journal*)。オプトジェネティクスの手法では細胞内に微生物ロドプシンが過剰に発現することからレチナールが枯渇しやすいため、この研究は発色団の結合過程を制御し、微生物ロドプシンをツールとして効率よく機能させるための足掛かりになると考えている。また、新奇微生物ロドプシンとしてアニオンチャネルであるベストロフィンとの融合タンパク質の発見に関する国際共同研究にも参加し、ロドプシンドメインの光可逆反応を明らかにした (Rozenberg et al., 2022, *Nature Structural & Molecular Biology*)。

### 3. 今後の展開

膜電位イメージングに際して現在問題になっているクロロフィル蛍光によるバックグラウンドについては、観察に用いているフィルターセットの検討を行っている。現在は検出フィルターに中心波長 700nm、バンド幅 75nm のバンドパスフィルターを用いているが、クロロフィル蛍光のメインピークである 700nm 以下の波長領域を除去するために、カットオフ波長が 700nm 付近のロングパスフィルターに変更する。また、ダイクロイックミラーについても現行では 730-740nm 付近より長波長側が減衰しているが、これをカットオフ波長が 700nm 付近のダイクロイックビームスプリッターに変更する。この変更により、クロロフィル蛍光の大半をカットすると共に、膜電位センサーのシグナル強度を稼ぐことが可能になる。

本課題の採択時には植物にオプトジェネティクスを適用した例は報告されていなかったが、採択後に海外のグループから微生物ロドプシンを用いた膜電位操作が報告された (Zhou et al. *Nature Plants* 7.2 (2021): 144-151)。このグループは現在も精力的に研究を進めており、今後植物オプトジェネティクス研究はさらに進展するものと予想される。本課題では膜電位イメージングの材料及び装置系の基礎的な部分は整備できたと考えており、今後 1-2 年程度で当初目標としていた膜電位イメージングを達成可能である。また、近年カルシウムイオン輸送能や cAMP/cGMP の生成・分解能を持つ新奇微生物ロドプシンが相次いで創出・発見されているこ

とから、本課題で構築したイメージングの手法は、ツールとなる分子を変更することによって膜電位以外の細胞内シグナル伝達の光操作・観察にも応用可能であり、生体内シグナル伝達機構の全容解明にとって重要な基盤技術になると見込まれる。

#### 4. 自己評価

本研究課題の目標のうち、植物の膜電位イメージングに関する材料及び装置系の基礎的な部分は整備できたと考えている。膜電位イメージングに必要な電動倒立顕微鏡高速光刺激・イメージングシステムは非常に高額な機器を複数組み合わせる必要があり、さきがけの研究助成がなければ到底実現不可能であったと考える。予備的ではあるが、培養細胞を用いて光刺激による膜電位の脱分極を示すシグナルが得られたことは、今後膜電位操作・検出システムを完成させるにあたって希望が持てる成果である。一方、最終目標として掲げていた植物個体の膜電位イメージングに到達できなかったことは大きな反省点である。最も大きな要因は、イメージングに用いる顕微鏡システムに関する理解と経験が私自身に不足しており、観察系の構築に思いのほか時間がかかってしまった点にある。コロナ禍という状況も多少は影響したと思うが、この点に詳しい他の研究者や顕微鏡メーカーの方に積極的に教を乞うて早めの対処をするべきであったと反省している。また、植物材料の管理や整備、実験系の立ち上げ等で多くの作業が必要になり、十分な時間を取ることができない部分があったので、研究費の一部は技術員の雇用に回す必要があったと考えている。

本研究課題で目標とした光による膜電位操作・検出システムは、植物のシグナル伝達ネットワークの全容を解明するにあたり、環境刺激の入力に伴い、細胞内で最初期に起こる反応の解明につながる技術である。物理的・化学的な刺激では光に匹敵するような高い時間/空間分解能を達成することは難しいため、このシステムを完成させることでこれまで全く見えていなかった環境応答機構の検出が可能になると期待している。

#### 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:1件

1. Jaffe, A.L., Konno, M., Kawasaki, Y., Kataoka, C., Béjà, O., Kandori, H., Inoue, K. and Banfield, J.F. Saccharibacteria harness light energy using type-1 rhodopsins that may rely on retinal sourced from microbial hosts. *The ISME Journal* (2022); pp.1-4.

共生細菌の一種である Saccharibacteria が持つ新奇微生物ロドプシン SacR のイオン輸送活性及び光反応特性を調べ、このタンパク質が光駆動外向きプロトンポンプであることを明らかにした。また、SacR が分子外から容易に発色団であるレチナールを取り込むことができることを発見した。Saccharibacteria が自身のレチナール合成系を持たない共生細菌であることから、SacR は宿主が合成するレチナールを取り込んで機能すると考えられ、共生細菌の光利用に関する新たな知見を得た。

##### (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)

1. Konno M., Yawo H., Kandori H., Inoue K. Development of an light regulatory system of membrane potential in plant cell. 第 58 回日本生物物理学会年会 2020 年 9 月 16 日 ポスター発表
2. 今野雅恵、神取秀樹、井上圭一 「植物細胞における膜電位の光制御系の開発」生体分子工学と低物理エネルギーロジスティクス融合による次世代非侵襲深部生体操作 第 1 回公開シンポジウム 2021 年 3 月 26 日 ポスター発表
3. 今野雅恵 「微生物ロドプシンのメカニズム研究と植物オプトジェネティクスへの応用」ISSP Workshop「物性女性若手研究交流会 2022」2022 年 11 月 15 日 ポスター発表
4. Suzuki K, del Carmen Marín M, Konno M, Bagherzadeh R, Murata T, Inoue K. “Structural characterization of proton-pumping rhodopsin lacking a cytoplasmic proton donor residue by X-ray crystallography.” *Journal of Biological Chemistry*. 2022; 298(3), 101722. (共筆頭著者)
5. 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, V. A., Chazan, A., Augustin, S., Wietek, J., Dine, J., Peleg, Y., Kawanabe, A., Fujiwara, Y., Yizhar, O., Sheves, M., Schapiro, I., Furutani, Y., Kandori, H., Inoue, K., Hegemann, P., Bèjà, O. and Shalev-Benami, M.. "Rhodopsin-bestrophin fusion proteins from unicellular algae form gigantic pentameric ion channels." *Nature Structural & Molecular Biology*. 2022; 29(6): 592-603.