

研究終了報告書

「内在受容体を利用した生命機能の新規光操作手法の開発」

研究期間： 2017 年 10 月～2021 年 3 月

(新型コロナウイルス感染症の影響を受け 2021 年 9 月まで延長)

研究者： 塚本 寿夫

1. 研究のねらい

現在、神経科学分野を中心に広く行われている光遺伝学解析の多くは、神経細胞など元来光に応答しない細胞種に、微生物由来の光感受性イオンチャネルであるチャンネルロドプシンやその類縁体を強制発現させて、様々なイオン電流を光で誘起することで細胞活動を操作している。つまり、光刺激によって膜透過するイオンの種類や量はチャンネルロドプシンの種類によって決まるため、効率よく光操作できないイオン電流が存在する。とりわけ、神経興奮を抑制する K^+ 電流をチャンネルロドプシンを用いて操作することは難しく、またチャンネルロドプシンのコンダクタンスは一般的なイオンチャネルより小さく、細胞活動を操作するために高レベルの発現と強い光刺激が必要なことが多い。

以上に述べた、チャンネルロドプシンを用いた光操作における難点を解決する方法として、光感受性 G タンパク質共役受容体である動物オプシンを利用して、三量体 G タンパク質の活性化を介して細胞内在のイオンチャネルを操作する手法がある。この手法では、受容体→G タンパク質経路を介して光シグナルが増幅されるため、比較的弱い光刺激でイオン電流を操作できる。また、G タンパク質を介して、 K^+ イオンを選択的に透過するイオンチャネル GIRK (Kir3)を操作することが可能である。そこで本研究では、異なる波長の光によって受容体のオン・オフ反応を起こすことができる無脊椎動物オプシンを用いて、 K^+ 電流(GIRK 電流)を異なる波長で増減できる光操作ツールの開発を目指した。

また、昆虫などの小型無脊椎動物は、光遺伝学解析のメインターゲットである哺乳類よりも単純な神経回路を持ち、外界の光情報に応じて単純な本能行動を示すことが多い。このような無脊椎動物の光依存的行動の中には、眼以外の組織に発現したオプシンが光を受容することで制御されるものがある。そこで、本研究では尾端組織が光受容することで生殖行動が制御されるアゲハチョウと、明確な光受容器官を持たないが、光環境に応じて遊泳して着底すると言われるサンゴ幼生について、どのようなオプシンを用いて外界の光情報を感知するか明らかにするとともに、それらの内在光受容タンパク質を光刺激によって活性化/不活性化することで、外来光受容分子の導入なしに本能行動を光操作する技術の開発を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

これまで K^+ チャネル GIRK を光操作するツールとしては、哺乳類の視細胞ではたらくオプシンが用いられてきた。しかし、哺乳類の(桿体・錐体)視細胞で機能するオプシンは、光刺激で活性化しかできず、11シス型という網膜内の特殊な酵素系によって生じる異性体型のレチナールの供給が必要となる。それに対し本研究では、異なる波長の光によって受容体の活性化と不活性化を起こすことができ、また広範な組織に存在する全トランス型のレチナール

を結合することでも光受容能を発揮できる無脊椎動物オプシンを用いて、GIRK チャネルを活性化/不活性化するツールの開発を目指した。

GIRK は、Gi/o タイプの三量体 G タンパク質の $\beta \gamma$ サブユニットの作用によって活性化される。そこで、ゴカイなど種々の無脊椎動物から、Gi/o と共役するオプシンを見出した。そして、これらのオプシンと GIRK を単離細胞に導入することにより、GIRK を透過する K^+ 電流を光操作できることを確認した。また、様々なオプシンを使い分けることで、GIRK 電流を操作する光の波長を変える(チューニングする)ことができ、また光刺激を生じる K^+ 電流のキネティクスも調節できることも見出した。今後、これらのオプシンに部位特異的変異の導入やシグナル伝達調節タンパク質を融合させることなどにより、より高効率・高感度に GIRK 電流を光操作できるツールを作製し、それらを神経細胞や非興奮性の細胞などに導入して、生体の光遺伝学解析に活用できることを実証していく。

無脊椎動物に内在する光受容タンパク質(オプシン)を利用して本能行動を光操作する研究については、共同研究を通じて、アゲハチョウ尾端組織のトランスクリプトーム解析ならびにサンゴのゲノム解析から、それぞれの動物種が持つオプシン遺伝子を同定し、その中から、アゲハチョウの尾端光受容器の応答特性やサンゴの遊泳行動の光応答性に合致する光反応を示すオプシンの同定に取り組んだ。その結果、これらの生理機能・行動の波長応答特性とよく一致した吸収波長を示すオプシンを見出した。今後、これらのオプシンを欠損した個体を作製して、それらの光依存的な本能行動がどのように変化するか解析するとともに、それらの行動を光で制御することで、小型無脊椎動物の生態を遺伝子改変せずに光でコントロールする技術の開発につなげていく。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け 6 ヶ月間研究期間を延長し、元々の研究期間内に作製した光操作ツールについて、(組織透過性の高い)より長波長の光によって活性制御できるように改変することに取り組んだ。その結果、光操作ツールとして好ましい分子特性を持つ各種オプシン類について、発色団レチナール周辺のアミノ酸残基に変異を導入することで、より長波長の光で活性操作できるように改変することができた。

(2) 詳細

研究テーマ A「無脊椎動物オプシンをベースにした哺乳類内在 K^+ チャネルの光操作ツールの開発」

GIRK は、Gi/o タイプの G タンパク質(の $\beta \gamma$ サブユニット)の作用によって活性化される。かつては、無脊椎動物は Gq タイプの G タンパク質と共役するオプシンのみを持つと考えられていた。しかし、これまでの研究から、無脊椎動物には Gi/o 共役型のオプシンも存在することを見いだしていた。Gi/o 共役型の無脊椎動物オプシンのうち、本「さきがけ」研究提案申請中に出版した論文(Tsukamoto et al., *J. Biol. Chem.*, 2017)で、Gi/o への共役と光によるオンオフ、全トランス型レチナールの結合を見出した、環形動物ゴカイのオプシンに加えて、同様の分子特性を持った無脊椎動物オプシン合計3種について、光操作ツールとしての機能性を調べた(図 1)。

これらのオプシンはそれぞれ異なる波長の光刺激によって、不活性化状態(R)と活性化状

態(R*)との間を相互変換するとともに、RとR*の吸収スペクトルが大きく(>50 nm)離れているため、R*のみが吸収できる長波長側の光刺激で、完全に不活性化(Rのみを生成)させることができる(図1, A-C)。このように、長波長の光刺激でオフすることのできる分光学的特性は、GIRK電流の光操作ツールとして好都合だと考えた。実際にこれらのオプシンがGIRK活性を光で操作できることを確認するため、生理学研究所の久保義弘教授と共同で、アフリカツメガエル卵母細胞にオプシン遺伝子とGIRK遺伝子を導入し、GIRK由来のK⁺電流が光刺激によって操作できるかどうか検討した。その結果、吸収スペクトル変化と合致した光電流の変化、すなわちオプシン1では紫外光刺激でGIRK電流が増加し黄色光照射で減少した(図1D)。同様にオプシン2とオプシン3では青色光刺激でGIRK電流が増加して、橙色刺激で減少した(図1E, 1F)。さらに興味深いことに、オプシン1では活性化する光刺激を止めると経時的に電流が減衰したが、他の2種では光刺激を止めても電流応答が持続した(図1, D-F)。つまりこれらのオプシン種を使い分ければ、GIRK電流を異なる波長の光でオン・オフできるとともに、異なるキネティクスのGIRK応答を引き起こすこともできることが明らかとなった。

以上の結果は、無脊椎動物由来のGi/o共役型オプシンがGIRKチャンネル応答の光操作ツールとして有用であることを示している。今後、部位特異的変異をこれらのオプシンに導入することにより、紫外光・青色光だけでなく、より長波長の光(生体組織に散乱されにくい)で光操作できるように改変することや、シグナル伝達調節タンパク質と融合させることで、より速いキネティクスでK⁺電流を光操作できるようにすることに取り組む。GIRKは、多くの神経細胞のシナプス後部に局在している。そこで、これらのオプシンをGIRK近傍に留めるように機能改変したうえで、神経細胞に導入して光依存的にGIRK電流を操作することで、抑制性の光遺伝学ツールとして利用することに挑戦する。

上述した研究進行状況は、無脊椎動物オプシンを用いたGIRKチャンネルの光操作ツールの開発という点は達成できたと考えているが、神経など生体組織に開発したツールを導入する解析までは到達できなかった点が不十分である。

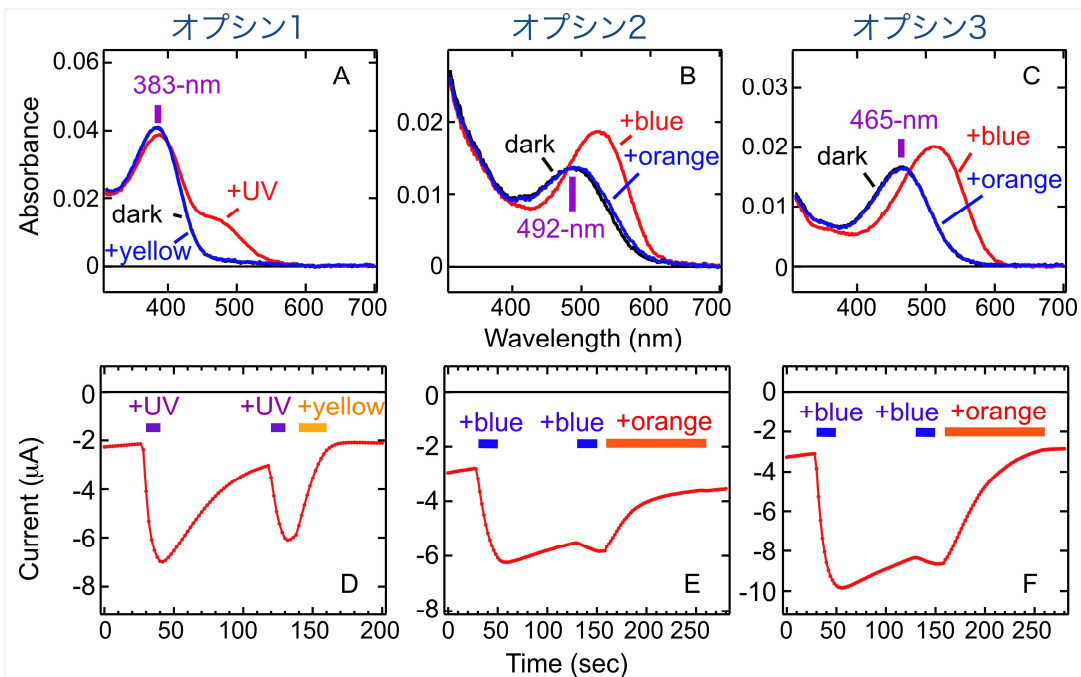


図1 Gi/o 共役無脊椎動物オプシンの吸収スペクトルと GIRK 活性の光操作特性

A-C 3種類の無脊椎動物オプシン(オプシン 1, 2, 3)の吸収スペクトルと光反応 これらのオプシンは紫外光(UV)あるいは青色光で活性化し、黄色あるいは橙色の刺激で不活性化される。

D-F それぞれの無脊椎動物のアフリカツメガエル卵母細胞における GIRK 活性の光操作特性 オプシン 1 は紫外光刺激で一過性の電流応答を生じ、オプシン 2, 3 は青色光刺激で持続的な GIRK 電流を生じる。それぞれの電流応答はオプシンを不活性化する光刺激で「オフ」できる。

研究テーマ B「小型無脊椎動物に内在する光受容タンパク質を活用した本能行動の光操作手法の開発」

アゲハチョウ尾端組織の光受容機能を担うタンパク質を同定するため、尾端組織で発現している遺伝子を RNA-seq 解析から網羅的に同定し、全身組織の遺伝子発現パターンと比較した。その結果、アゲハチョウが持つオプシン遺伝子のうち一つ(以下尾端オプシンと記す)が、尾端組織で高度に発現していることを確認した。このオプシン遺伝子をクローニングして、哺乳培養細胞に強制発現させたタンパク質を精製して、吸収スペクトルを測定した。その結果、このオプシンのスペクトル特性とアゲハチョウ尾端組織の波長応答特性とよく一致することを見出した。また、組織染色からもこの尾端オプシンが尾端光受容細胞に発現していることを示す結果を得た。これらの結果から、このオプシンが尾端光受容機能を担っていることが強く示唆された。今後、このオプシン遺伝子を機能しなくしたアゲハチョウ個体を作製し、生殖行動にどのような影響が出るか確認し、このオプシンを活性化・不活性化する光刺激で生殖行動を制御できるかどうかを調べていく。以上のアゲハチョウを用いた研究は、総合研究大学院大学の蟻川謙太郎教授とカリフォルニア大学の Michael Perry 助教授との共同研究として進めている。

現在、サンゴ礁の破壊が全世界的に問題となっているが、サンゴの幼生は「適切」な環境の場所まで遊泳してそこで着底して成体に成長する。「適切」な環境には光環境も含まれ、紫外線が弱い環境を好むと考えられている。基礎生物学研究所の酒井祐輔博士（現大阪市立大学）、上野直人教授がサンゴからいくつかのオプシン遺伝子を見出していたので、それらのオプシン群を哺乳培養細胞に強制発現させた組み換えタンパク質を精製して、吸収スペクトルを測定した。その結果、少なくとも1つのオプシンが紫外光を受容できることを見出した。今後、このオプシン遺伝子をノックアウトしたサンゴ幼生の遊泳行動の光応答性を調べて、このオプシンの生理機能を明らかにしていく。さらにこのオプシンが遊泳行動を制御している場合は、このオプシンを活性化・不活性化する波長の光を用いてサンゴ幼生の遊泳行動を光操作することでサンゴを保全する技術の開発を目指す。

上述した研究進行状況は、小型無脊椎動物の本能行動を遺伝子改変なしに光操作するためのターゲット光受容分子（オプシン）の同定までは達成できたが、その分子の光応答を利用した行動操作までには到達できていない。

3. 今後の展開

「1 研究のねらい」に示したように、様々な波長の光刺激によって GIRK 電流を増減させることができる無脊椎動物のオプシンは、神経細胞(GIRK が発現する)の新しい抑制性の光操作ツールとしての利点があると考えられる。図 1 に示したように、オプシンの種類を選ぶことで、様々な波長の光刺激に応じて一過的あるいは持続的な GIRK 電流を誘起することができるので、異なるキネティクスの K^+ 電流によって異なった様式で細胞興奮を抑制させられると考えられる。このような異なる特性を持ったオプシンを用いた神経応答の光遺伝学解析に適用することに取り組む。

動物オプシンは GPCR であるので、イオン電流とは無関係の代謝応答（非興奮性応答）も光で誘起することができる。そこで、非興奮性で神経細胞の機能を調節すると考えられている（が生理機能はよくわかっていない）アストロサイトにオプシンを導入し、cAMP 応答や Ca^{2+} 応答などを光操作したときのアストロサイト・神経細胞の応答を解析する。

アゲハチョウおよびサンゴ幼生の内在光受容体を光で活性化・不活性化することで、これらの小型無脊椎動物の本能行動を光操作する手法を確立することで、単純な光応答行動・光応答機能を示す動物について、その光受容を担うタンパク質の吸収波長特性と光反応を解析して、それらを光で活性化・不活性化すること行動制御する、という一連の方法論を確立することにつなげていく。

4. 自己評価

本研究は、動物に内在する光受容体やイオンチャネルを光操作することで、最小限の遺伝子改変によって光遺伝学解析を可能にすることを目的としている。これまでの約3年半の研究によって、この目的を達成するための光操作ツールの開発や本能行動を操作するに適した光受容体の同定まで到達できたという点は、研究開始時点に設定した目的をある程度達成したと言える。

研究代表者の塚本は、「さきがけ」研究に求められているアウトプットは「ハイインパクトな研究成果」と「独立した研究環境の獲得」に大別されると理解している。前者のアウトプットについ

ては、開発した光操作ツールや光操作手法を原著論文のかたちまで十分にまとめられなかった点について不十分であると自己評価している。論文発表までまとめられなかった原因として、研究代表者の力不足に加えて、新型コロナウイルス対応や研究代表者の異動に伴う時間ロスなどがあつた。そこで、「新型コロナウイルス支援」の研究費執行期間の延長を利用し(2021年9月まで6ヶ月間延長された)、認められた延長期間中に、期間内に到達できなかった研究・研究発表を進めた。また後者のアウトプットについては、さきがけ研究などが評価され神戸大学において新しい研究室を立ち上げることができたのはよかったと感じている。

研究成果の波及効果については、「3 今後の展開」に述べたように、光遺伝学解析のさらなる発展や、経済的に有用な生物種の生態をコントロールする技術への応用が見込まれるので、特許などのわかりやすいかたちではないが、十分に社会還元できる成果が得られたと評価している。

以上に述べたような研究成果は、「さきがけ」のサポートなしでは全く達成できなかったものであり、これらの研究遂行のために十分な支援をいただくとともに適正に執行できたのは、研究者として幸せであったの一言に尽きる。また、研究実施体制については、手のかかるポイントについて研究支援員を雇用し、また研究代表者一人では実行困難な研究については、適切な国内外の研究者と共同研究を行うことで困難を克服できたため、非常に効率よく研究実施することができたと考えている。

上述したように、研究代表者の力不足のため、本研究開始時に描いた「理想的な」研究進展には及ばず、とくに研究成果の論文のかたちでのアウトプットについては不十分であった。一方、他の点については相応の成果が得られたのではないかと自己評価している。

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: 3件

1. Ayers T, [Tsukamoto H](#), Gühmann M, Veedin Rajan VB, Tessmar-Raible K., “A Go-type opsin mediates the shadow reflex in the annelid *Platynereis dumerilii*.” *BMC Biol.*, 2018, 16, 41.

概要: ウィーン大学 Tessmar 教授との国際共同研究を通じて、ゴカイ成体のアンテナ上の感覚器に発現する光受容タンパク質の同定に取り組み、Gi/o タイプの G タンパク質と共役するオプシン(図1のオプシン2)を見出した。さらにこのオプシンが490nm付近の青緑光によって活性化し、580nm付近の橙色刺激で不活性化することを見出した。この光応答性は、「2 研究成果」で述べたように、GIRK チャンネルの光操作ツールとして有用な特性である。

2. [Tsukamoto H](#), Higashi M, Motoki H, Watanabe H, Ganser C, Nakajo K, Kubo Y, Uchihashi T, Furutani Y., “Structural properties determining low K⁺ affinity of the selectivity filter in the TWIK1 K⁺ channel.” *J. Biol. Chem.* 2018, 293, 6969–6984.

概要: 赤外分光解析、原子間力顕微鏡解析、生化学解析などを組み合わせて、細胞の静止膜電位の発生に関わるK⁺チャンネル TWIK-1の「緩い」イオン選択性がどのように生み出

されているのかを明らかにした。この研究を進める過程で、種々の K⁺チャンネルの機能特性を調べることとなり、ここで得られた知見をもとに、動物オプシンを用いて GIRK チャンネル活性を光操作するという研究アイデアの着想に至った。

3. Nagata T, Koyanagi M, Tsukamoto H, Mutt E, Schertler GFX, Deupi X, Terakita A., “The counterion–retinylidene Schiff base interaction of an invertebrate rhodopsin rearranges upon light activation.” *Commun. Biol.* 2019 2, 180.

概要：異なる波長の光刺激で活性化・不活性化される無脊椎動物オプシンについて、吸収波長を制御する非常に重要なアミノ酸残基である「対イオン」と発色団レチナールとの相互作用様式について、部位特異的変異体などを用いて詳細に検討した。この論文で得られた知見は、無脊椎動物オプシン由来の光操作ツールの波長応答特性を改変する取り組みをする上で非常に有用となる。

(2) 特許出願

研究期間累積件数：0件(特許公開前のももの含む)

(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)

招待講演

1. 「無脊椎動物オプシンの物性を利用してイオンチャンネルを光操作する」、塚本寿夫、ISSP ワークショップ「レチナールタンパク質の光機能発現の物理と化学」、2019年9月
2. 「“総力戦”としての光操作技術」、塚本寿夫、第57回日本生物物理学会年会、2019年9月(七田総括と共同でオーガナイズしたシンポジウムでの発表)
3. 「無脊椎動物オプシンの光遺伝学ツールとしての可能性」、塚本寿夫、第4回極みプロジェクトシンポジウム、2020年9月
4. 「Optical control of cellular signaling pathways using animal opsins」、Hisao Tsukamoto、OPTICS & PHOTONICS International Congress 2021、2021年4月
5. 「リサイクル型オプシンの光応答特性を利用した光操作ツールの開発」、塚本寿夫、生理研研究会「構造情報を基盤とした膜機能分子の生理機能理解に向けて」、2021年9月

著作物

6. Tsukamoto H, Shichida Y. “Session 2SFA—the symposium “Elucidation of biological functions by optical control” on BSJ2019 at Miyazaki, Japan.”, *Biophys. Rev.* 2020, 12, 279–280. (七田総括と共同オーガナイズした、第57回日本生物物理学会年会でのシンポジウムの内容をまとめた総説)
7. Tsukamoto H, Furutani Y. “Optogenetic modulation of ion channels by photo-receptive proteins.” *Optogenetics: Light-Sensing Proteins and Their Applications in Neuroscience and Beyond* (edited by Hiromu Yawo, Hideki Kandori, Amane Koizumi, and Ryuichiro Kageyama). Springer, 2021, *in press*. (本研究提案のコンセプトである、動物オプシンを用いたイオンチャンネルの光操作について概説したチャプター)
8. Tsukamoto H, “Optical control of cellular signaling pathways using animal opsins” *Proc. SPIE*

11925, Biomedical Imaging and Sensing Conference 2021, 119250E. (招待講演 4 の内容をまとめた総説)