

# 研究報告書

## 「光で“創る”オプトジェネティクスへの挑戦」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 井上 圭一

### 1. 研究のねらい

ヒトなど高等動物の細胞内ではヘテロ三量体Gタンパク質が、光や味物質、臭い物質、ホルモンなど細胞外からの刺激に応じて、様々な細胞の生理活動を制御し、環境の変化に細胞が適応する上で重要な役割を果たしている。この時細胞外刺激を受容し、その情報をGタンパク質へ伝達するのが G タンパク質共役型受容体(GPCR)である。GPCR と G タンパク質が関与するシグナル伝達経路は細胞の生理活動を制御する最も主要なものの一つで、大部分の薬剤のターゲットとなっており、そのメカニズムの理解は医学・薬学の両分野においても重要なものとして注目されている。

しかし細胞内に複数種が存在する G タンパク質の各サブファミリーが関与するシグナル伝達経路が細胞活動をどのように制御するのか、そのメカニズムには不明な点が多い。その理由として挙げられるのが特定の G タンパク質の関与するシグナル伝達経路のみを高い精度で活性化させることが困難なためである。通常 G タンパク質の活性化には特定の GPCR に結合するリガンドを細胞に添加し、GPCR を活性化させ、それを通じて G タンパク質を活性化する方法がとられる。しかし多くの GPCR は複数の G タンパク質と共役しており、また生体内では特定の細胞に投与するリガンドの濃度の正確な制御が困難なことから、それぞれの G タンパク質の関与するシグナル伝達経路のみを適切な強さで活性化することは極めて難しい。

そこで本研究では従来のリガンドを用いる方法とは大きく異なる、光を使ったGタンパク質制御法の創出を目指す。光は極めて高い時空間分解能のもと、任意の強度で照射することが可能であることから、光でGタンパク質を操作することができれば、従来法よりも簡便かつ正確にシグナル伝達経路を活性化し、その役割を調べることが可能になる。しかし網膜に存在するロドプシンと G タンパク質のサブファミリーの一つである  $G_t$  のような特殊な例を別にして、GPCR や G タンパク質は光に応答しない。従って本研究では新たに光応答性のタンパク質である微生物型ロドプシンに光依存的なGタンパク質活性化能を持たせることで、それを用いた細胞内 G タンパク質の光制御法の開発を行った。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

ヘテロ三量体 G タンパク質はヒトなどの細胞中において、様々な信号伝達カスケードの制御に関わり、また生体機能の調節に重要な役割を果たす。従ってそれぞれの G タンパク質が関与するシグナル伝達を任意に操作することができれば、細胞の生存に関わる役割やそれに関連する疾患のメカニズム解明、さらには薬剤開発につながることを期待される。また G タンパク質のシグナルカスケードを利用することで、任意のタンパク質を細胞内に発現させるこ

とも可能となる。そしてその際に光を用いて G タンパク質を活性化することができれば、従来のリガンド結合による GPCR の活性化を介した手法では困難だった、ミリ秒・サブマイクロメートル程度の高時空間分解能での制御が可能となる。そこで本研究では細胞内 G タンパク質の光操作が可能なタンパク質分子ツールの開発のため、光受容膜タンパク質である微生物型ロドプシンに GPCR の細胞質側ループを組み合わせた、キメラタンパク質の構築に取り組んだ(図 1)。

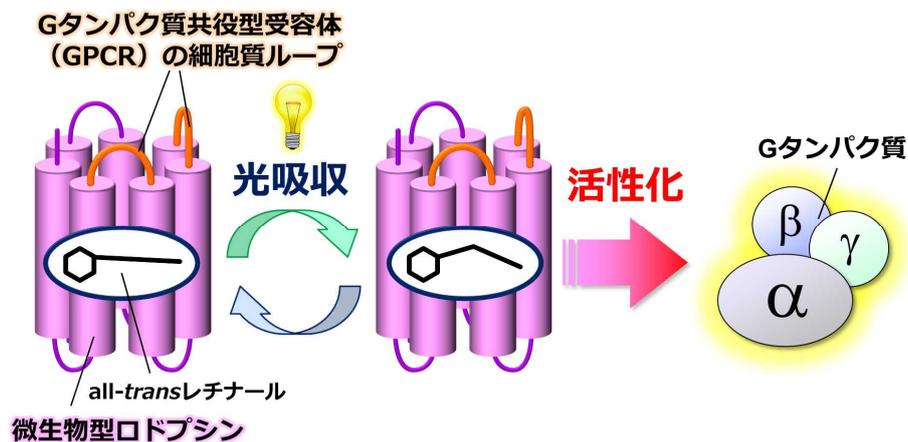


図 1. 微生物型ロドプシンと GPCR 細胞質ループのキメラタンパク質を用いた  
ヘテロ三量体 G タンパク質の活性の光操作

その結果、GPCR の一種であるウシロドプシンの細胞質ループを組み込んだキメラタンパク質を作製したところ、*in vitro*において G タンパク質のサブファミリーの一つである  $G_t$  の光依存的な活性化を達成した。そしてさらに  $\beta_2$ -アドレナリン受容体 ( $\beta_2$ -AR) の細胞質ループを導入したところ、より多様な細胞種に普遍的に存在し、細胞内の cAMP 産生に関与する  $G_s$  タンパク質の光操作にも成功した。そしてこのキメラタンパク質をホ乳類細胞に導入したところ、細胞内に内在的に存在する  $G_s$  を活性化し、cAMP 濃度を上昇させ、さらに  $Ca^{2+}$  の流入を引き起こすことに成功し、実際に構築したキメラタンパク質が細胞内で機能することを実証した。これらの詳細について以下に記す。

## (2) 詳細

### 研究テーマ(A): 新規キメラタンパク質作製

本研究ではまず GPCR で最も活性が高い視覚受容体であるウシロドプシンの細胞質ループを微生物型ロドプシンに導入してキメラタンパク質を構築し、網膜内でウシロドプシンによって活性化される  $G_t$  タンパク質の光依存的な活性化能を評価した。その結果シアノバクテリアの持つ  $H^+$ ポンプ型の微生物型ロドプシンである GR を用いることで、*in vitro*において  $G_t$  を活性化し、GDP/GTP 交換反応を起こさせることに成功した(論文発表リスト2)。

これにより微生物型ロドプシンと GPCR のキメラタンパク質を用いることで G タンパク質が活性化可能であることが示されたが、 $G_t$  はもともと動物型のロドプシンを介して光依存的に活性化するタイプのサブファミリーであり、生体内でも視細胞にしか存在しないことから、キメラタンパク質による光操作の持つ応用に向けた重要性はそれほど高くない。そこで非視覚系の G タンパク質操作に向け、多様な細胞種に普遍的に存在する G タンパク質のサブファミリーである

G<sub>i</sub>, G<sub>s</sub>に共役した GPCR(それぞれウシロドプシン、β<sub>2</sub>-AR)の細胞質ループを微生物型ロドプシンに組み込んだキメラタンパク質を新たに作製した。

このとき鑄型となる微生物型ロドプシンについて、様々なタイプのものを検討したが、GR を用いることで、最も高い発現が達成されることが明らかとなった。一方でウシロドプシンのループを用いた場合、複数の GPCR のループを導入したタンパク質の発現に成功したが、それ以外の GPCR については一つ以上のループを微生物型ロドプシンに導入して発現させることは非常に困難であることが明らかになった。

また今回鑄型となる微生物型ロドプシンについて、メタゲノム解析で新たに明らかとなった様々な分子の性質を調べたところ、その中にNa<sup>+</sup>イオンを濃度勾配に逆らって、細胞外側へ能動輸送する光駆動型 Na<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンが存在することが明らかとなった(論文発表リスト1)。そしてこのロドプシンを神経細胞に発現したところ、光照射にともなって高い神経活動抑制能を示すことが明らかになり、今後の新たなオプトジェネティクスツールとなることが期待される(論文発表リスト4、5)。

### 研究テーマ(B):キメラタンパク質物性・性能評価

研究テーマ(A)で作製したG<sub>i</sub>, G<sub>s</sub>共役型キメラについて、*in vitro*でGタンパク質活性を評価したところ、有意なG<sub>i</sub>およびG<sub>s</sub>の光依存的な活性化が確認された。また微生物型ロドプシン部分に活性化中間体の寿命を長くする変異を導入することで、さらにGタンパク質活性を向上させることに成功した。

続いてホ乳類細胞内Gタンパク質の活性化の評価のため、新たにHEK293T細胞とFura2を用いたCa<sup>2+</sup>イメージング系を構築した。この時、細胞内にcAMP依存性カルシウムチャンネル(CNGA2)を共発現させ、活性化されたG<sub>s</sub>によるcAMPの上昇によって引き起こされるCNGA2のCa<sup>2+</sup>イオンの取り込みを見ることで、細胞内におけるG<sub>s</sub>共役型キメラによる光依存的なG<sub>s</sub>活性化を検出することができる。このようなアッセイ系を用いて光依存的なCa<sup>2+</sup>の流入を見たところ、予想に反してGPCRループを持たない微生物型ロドプシンのみでもCa<sup>2+</sup>の取り込みが確認された。詳細な検討の結果、これは鑄型に用いたロドプシンのH<sup>+</sup>輸送によって、細胞内pHが変化したことによる内在性Ca<sup>2+</sup>チャンネルの開放によるものだということが明らかになった。この問題についてはロドプシン部分に変異を加えて、H<sup>+</sup>輸送を阻害することで解決された。そしてさらにシグナル配列を最適化することにより、キメラタンパク質の膜移行効率を上昇させた結果、光依存的な細胞内G<sub>s</sub>タンパク質の活性化を示すCa<sup>2+</sup>の取り込みを観測することに成功した(図2)。

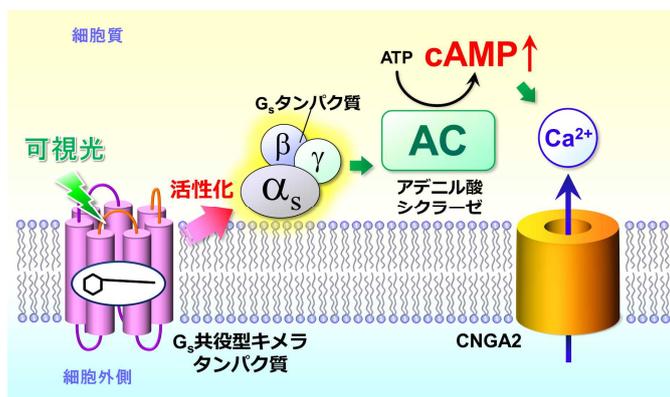


図2. G<sub>s</sub>共役型キメラタンパク質による細胞内G<sub>s</sub>の活性化と増加したcAMPが引き起こすCNGA2を介したCa<sup>2+</sup>流入

またキメラタンパク質がG<sub>s</sub>を光依存的に活性化した事によるCa<sup>2+</sup>の流入量を、β<sub>2</sub>-ARにアゴニストを結合させた場合のものと比較したところ、およそ1/10程度の大きさのCa<sup>2+</sup>流入が引

き起こされることが分かった。これによりキメラタンパク質を用いて、ホ乳類細胞中の G タンパク質を光によって活性化することにより、細胞の状態を操作できることが可能であることが証明された。

### 3. 今後の展開

本研究において微生物型ロドプシンと GPCR のキメラタンパク質を作製することにより、光依存的に細胞内の G タンパク質を活性化できる事が示された。しかし現時点ではその活性は本来の GPCR と比べるとそれ程高くない。これについては GPCR と G タンパク質の相互作用に重要と考えられる GPCR の細胞質側ループをより多くキメラタンパク質に導入することが求められる。しかし第2および第3ループのそれぞれを単独で導入したキメラタンパク質については細胞内に発現させることができたが、複数のループを同時に導入したものについてはタンパク質の発現が確認されなかった。これについては今後他の GPCR のループを検討することで、複数を導入したものが発現可能なコンストラクトを開発する必要がある。

一方で今回の研究において  $G_t$ 、 $G_i$ 、 $G_s$  については、これらを光依存的に活性化するキメラタンパク質の作製に成功したが、 $G_q$  や  $G_{12/13}$  などのサブファミリーについてはそれらに共役した GPCR を用いた新たなキメラタンパク質の作製が求められる。これらについても今後本研究で培われた分子デザイン技術をもとに開発に取り組む。

そして将来的には本研究で開発を行ったキメラタンパク質を生体に導入することによって、生体中での G タンパク質の光操作法の確立を目指す。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究では微生物型ロドプシンと GPCR のキメラタンパク質を用いたオリジナリティの高い手法を用いることによって、 $G_t$  や  $G_i$ 、 $G_s$  三種類の G タンパク質の光操作に成功した。そして  $G_s$  については細胞内の  $G_s$  を光依存的に活性化し、cAMP を上昇させ、CNGA2 チャネルを解放し、 $Ca^{2+}$  の流入を誘起することにも成功した。これらのことから本研究によって、キメラタンパク質を用いることで細胞内の G タンパク質の操作が可能であることが実証されたことは極めて意義深いことであると考えられ、研究目標の主要な部分については達成されたといえる。

G タンパク質は様々な生理現象に関与し、医学・薬学的な観点からも重要な分子であることから、その光操作技術の実現は幅広い分野に大きな波及効果があると期待される。今後はさらに高機能な分子デザインを行い、またより多様な G タンパク質サブファミリーの活性化が可能な分子を構築することで、応用に向けた可能性が高まると考えられる。さらにマウスなどの生体に導入することによって、G タンパク質の関与する生命現象の解明に向けた研究への応用が期待される。

また本研究で様々な微生物型ロドプシンの性質について検討を行う中で発見された  $Na^+$ ポンプ型ロドプシンについては、すでに神経細胞に発現させると、高い光依存的な神経発火の抑制機能を持つことが示されており、昨今高い注目をもたれているオプトジェネティクス分野への応用が期待される。

## (2) 研究総括評価

細胞内Gタンパク質の光操作が可能なタンパク質分子ツールを開発するため、非視覚系のGタンパク質操作に向け、一般的に存在するGタンパク質のサブファミリーであるGi, Gs, Gqに共役したGPCRの細胞質ループを微生物型ロドプシンに組み込んだキメラタンパク質を創出した。Gi, Gs, Gq共役型キメラのうち、in vitroでGタンパク質活性能の評価が可能なGi, Gs共役型のものについて光照射によってGタンパク質の活性化が可能であることが示した。微生物型ロドプシン部分に活性化中間体の寿命を長くする変異を導入することで、さらにGタンパク質活性化能を向上させることに成功した。また、新たにNa<sup>+</sup>イオンを濃度勾配に逆らって、細胞外側へ能動輸送する光駆動型Na<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンを新たに発見した。このように次々に計画通りに着実に成果を出してきたことから、本人のこの最先端分野の洞察の深さを知ることができ、大いに評価します。同領域の神谷厚輝研究者と、Na<sup>+</sup>ポンプロドプシンのイオン輸送メカニズムについての研究を実施している。

今後は、これらのツールを用いて、生物系の研究者と連携し、新しいオプトジェネティックスのカテゴリーを切り開いていってほしいと思います。

第8回分子科学会奨励賞、分子科学研究奨励森野基金(平成26年度)、平成26年度文部科学大臣表彰若手研究者賞などを受賞し、国内外で多くの招待講演を行っていることから、その業績に高い評価を受けていることが窺えます。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表(15件中主要5件)

1. Kengo Sasaki, Takahiro Yamashita, Kazuho Yoshida, **Keiichi Inoue**, Yoshinori Shichida, Hideki Kandori\*. “A light-driven sodium ion pump in marine bacteria” (2013) *Nat. Commun.*, **4**, 1678
2. **Keiichi Inoue**, Hikaru Ono, Rei Abe-Yoshizumi, Susumu Yoshizawa, Hiroyasu Ito, Kazuhiro Kogure, Hideki Kandori\*. “Chimeric Proton-Pumping Rhodopsins Containing the Cytoplasmic Loop of Bovine Rhodopsin” (2014) *PLoS ONE*, **9**, issue 3, e91323
3. **Keiichi Inoue**, Takashi Tsukamoto, Kazumi Shimono, Yuto Suzuki, Seiji Miyauchi, Shigehiko Hayashi, Hideki Kandori, Yuki Sudo\*. “Converting a Light-driven Proton Pump into a Light-gated Proton Channel” (2015) *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, issue 9, 3291-3299
4. Hideaki E. Kato, **Keiichi Inoue**, Rei Abe-Yoshizumi, Yoshitaka Kato, Hikaru Ono, Masae Konno, Toru Ishizuka, Mohammad Razuanul Hoque, Shoko Hososhima, Hirohumi Kunitomo, Jumpei Ito, Susumu Yoshizawa, Keitaro Yamashita, Mizuki Takemoto, Tomohiro Nishizawa, Reiya Taniguchi, Kazuhiro Kogure, Andrés D. Maturana, Yuichi Iino, Hiromu Yawo, Ryuichiro Ishitani, Hideki Kandori\*, Osamu Nureki\*. “Structural Basis for Na<sup>+</sup> Transport Mechanism by a Light-Driven Na<sup>+</sup> Pump” (2015) *Nature*, **521**, Number 7550, 48-53
5. **Keiichi Inoue**, Masae Konno, Rei Abe-Yoshizumi, Hideki Kandori\*. “The Role of the NDQ-motif in Sodium Pump Rhodopsin” (2015) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, issue 39, 11536-11539

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(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)

主要な学会発表

国内会議受賞講演(1件)

1. 物理化学的アプローチによる新奇光駆動型  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ハイブリッドポンプロドプシンの研究

井上圭一 日本化学会第93春季年会(2013)・若い世代の特別講演会 2013年3月25日  
草津(受賞講演)

国際会議基調講演(1件)

1. Microbial rhodopsins of marine bacteria: Nano-scale biological light-driven ion pumps

Keiichi Inoue, 25th 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, November, 12, 2014, Nagoya, Japan (基調講演)

国際会議招待講演(6件)

1. Function and mechanism of sodium pump rhodopsin

Keiichi Inoue, 16th International Conference on Retinal Proteins, October, 7, 2014, Nagahama, Japan (招待講演)

2. Spectroscopic study on the dynamics and structure of sodium pump rhodopsin

Keiichi Inoue, 日本化学会第95春季年会(2015)・アジア国際シンポジウム 2015年3月27日 船橋(招待講演)

3. Microbial rhodopsins: Light-driven biological proton, chloride and sodium transporters

Keiichi Inoue, BIT's 4th Annual World Congress of Advanced Materials-2015, May 29, 2015, Chongqing, China (招待講演)

4. The role of proton on the function of sodium pump rhodopsin

Keiichi Inoue, The 53th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, September 14, 2015, Kanazawa, Japan (招待講演)

5. Infrared spectroscopic study on the structure and dynamics of sodium pump rhodopsin

Keiichi Inoue, SCIX 2015, The Great Scientific Exchange Meeting, September 28, 2015, Providence, USA (招待講演)

6. Photochemistry of sodium pump rhodopsin

Keiichi Inoue, DFG-Rundgespräch Photoreceptors, October 12, 2015, Frauenchiemsee, Germany (招待講演)

#### 国内会議招待講演(4件)

1. 光駆動ナトリウムポンプの発見と展開

井上圭一, 分子研研究会「ロドプシン研究の故きを温ねて新しきを知る」2013年11月18日 岡崎 (招待講演)

2. 海洋性細菌から発見された光駆動ナトリウムポンプ型ロドプシン

井上圭一, 日本生体エネルギー研究会 第39回討論会 2013年12月19日 静岡 (ブレイクスルー講演)

3. 分光学者と微生物型ロドプシン:分子の基礎研究と応用への路

井上圭一 第45回分子病態医学セミナー 2013年7月10日 東温 (招待講演)

4. H<sup>+</sup>ポンプとNa<sup>+</sup>ポンプ:2つのロドプシンから見えるもの

井上圭一, 分子研研究会「膜タンパク質内部のプロトン透過を考える」2015年4月21日 岡崎 (招待講演)

#### 受賞

1. 第8回分子科学会奨励賞(平成26年度)
2. 日本化学会第95春季年会(2015) 優秀講演賞(学術)
3. 分子科学研究奨励森野基金(平成26年度)
4. 平成26年度 文部科学大臣表彰・若手研究者賞
5. 平成25年度 公益財団法人 光科学技術研究振興財団 研究表彰