

# 研究報告書

## 「光の色を使った細胞内情報伝達因子の時空間的に精密な制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 小柳 光正

### 1. 研究のねらい

細胞は、さまざまな刺激に対して適切に応答することで個体の生命活動を支えている。さまざまな刺激を受容するための受容体は、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)に限っても、ヒトで約800種類にも上るのに対して、細胞内でその情報を伝える役割を担う因子は、環状ヌクレオチドやカルシウムイオンなどわずか数種類である。したがって、これら細胞内情報伝達因子を制御できれば、さまざまな刺激が引き起こす細胞の分化や形態の変化、転写の調節、膜電位の変化といった多様な細胞応答を制御でき、さらにその先にある多様な生理機能を制御することが可能である。

本研究のねらいは、動物の視覚を支えるロドプシンに代表される光感受性GPCR(GPCR型オプシン)を起点として、細胞内cAMP濃度およびカルシウムイオン濃度を光で制御できる新しい光操作ツールを開発することである。個体レベルでも通用する頑強で汎用性の高いGPCR型光操作ツールの創出に成功すれば、GPCRから始まるさまざまな生理機能を、光を用いることで高い時空間的分解能で制御することが可能となり、さまざまな生命機能研究分野に対し、従来にない精度と角度からの研究手法をもたらすと期待できる。

さらに本研究では光の色に着目する。GPCR型オプシンには、吸収極大波長が360nmのUVオプシンから560nmの赤オプシンまで幅広い波長感受性をもつオプシンが存在する。この波長感受性の多様性を利用することで、2つの色を使って、活性状態と不活性状態を速やかに切り替えできるGPCR型光操作ツールの開発も可能である。このツールを用いることで、細胞内情報伝達因子の時間的に精密な制御に加え、活性化する色の光と不活性化する色の光を細胞や組織の部位ごとに照射し分けることで、空間的にも精密な細胞内情報伝達因子の制御が可能になると期待できる。また、近赤外光は、“生体の窓”と呼ばれる生体深部に届きやすい波長域の光であるため、近赤外光に高い感度をもつ光操作ツールを開発し、光刺激のために挿入するファイバーで組織を傷つけない、すなわち非侵襲的な光操作を目指す。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、多様な細胞機能や生理機能の光による精密な制御をめざし、動物に存在する多様なGPCR型オプシンを起点に、細胞内情報伝達因子を光の色によって精密に制御できる実用的な光遺伝学ツールの開発を試みた。その結果、従来のGPCR型オプシンでは出来なかった、血清中に含まれる程度の微量なレチナル環境下でのGPCR型オプシンの機能発現に成功し、GPCR型光操作ツールが生体内の多様な組織で機能できることを示した。また、光の色依存的な細胞内cAMP濃度の制御やシグナル伝達の繰り返し操作にも成功した。さらに、個体レベルでの実用性の評価として、線虫の特定の神経細胞にGPCR型オプシンを

導入し、光による GPCR シグナル伝達を介した行動制御に成功した。また、非侵襲的な光操作をめざして長波長感受性オプシンの探索を行い、ある種の昆虫から動物界最長波長感受性の赤オプシンを見出した。さらに、昆虫の赤オプシンの感度を向上させ、活性化する G タンパク質選択性の改変を行うことで、非侵襲的光操作ツールとして有望な長波長感受性ツールを開発した。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「さまざまな組織で高効率に機能できる GPCR 型光操作ツールの開発」

ハマダラカから見出した Opn3 (MosOpn3) は、光吸収により生じた活性化型が安定で、再度の光吸収により不活性型に戻るといった“光再生型”オプシンであった。さらに、従来のオプシンが 11 シス型レチナールという一般的な組織には存在しないレチナール異性体型を発色団として要するのに対し、MosOpn3 は「13 シス型レチナールという生体内にユビキタスに存在するレチナール異性体型でも発色団として結合して機能できる」というユニークな性質をもっていた。そこでこの 13-シス型レチナール結合能をもつ光再生型オプシンをベースとして、血清中に含まれるような微量かつ 11 シス型がほとんどないレチナール環境下でも機能する光操作ツールの開発を行った。具体的には、Gi および Go 共役型オプシンである野生型 MosOpn3 と Gs 共役型オプシンであるクラゲオプシンあるいは Gq 共役型オプシンであるミツバチオプシンとの間でキメラ変異体を作製し、MosOpn3 の特性をもちながら、Gs あるいは Gq を活性化できる光操作ツールを開発した。これらのツールを用いることで、細胞内の cAMP 濃度の増加と減少およびカルシウム濃度の増加を光によって制御することが可能となった(招待講演 1-5)。さらに、MosOpn3 が、生体内で、毒性なくかつ分子特性を反映した機能性を発揮できるかについて線虫を用いて検証した。その結果、忌避行動を引き起こす神経細胞に MosOpn3 を発現するトランスジェニック線虫は、11 シス型レチナールを加えなくても光によって忌避行動を引き起こした(招待講演 3, 5)。この結果は、MosOpn3 型光操作ツールが生体レベルでも十分に使えることを示している。

### 研究テーマB「色依存的にオン・オフ可能な GPCR 型光操作ツールの開発」

ヤツメウナギの松果体から見出したパラピノプシンは、“光再生型”オプシンである点は MosOpn3 と同じであるが、「不活性型が UV 感受性」で「活性型が緑色感受性」と2状態の波長感受性が大きく異なる点特徴的である。すなわち、少なくとも受容体レベルでは、UV 光刺激で活性型が生じ、緑色光刺激によって完全に不活性型に戻る。そこでこの“色”依存的なオン・オフの性質に着目し、細胞内情報伝達因子の色依存的制御を試みた。その結果、Gi 共役型オプシンである野生型パラピノプシンを発現させた培養細胞において、UV 光による cAMP レベルの減少と緑色光による上昇を引き起こすことが出来た(図1)(原著論文 3)。さらに、Gs 共役型クラゲオプシンとのキメラ変異体によって、野生型とは逆に、UV 光による cAMP の上昇と緑色光による減少を引き起こすことに成功した(招待講演 1, 2, 5)。このパラピノプシンによる色依存的な応答は、繰り返し何度でも起きること、11 シス型レチナールを加えなくても起きること、一般に有害とされる UV 光ではなく青色光でも起きることを確認した。また、魚類松果体から青色光に最大感度をもつパラピノプシン(PP2)を見出した(原著論文 2)。さらに、MosOpn3

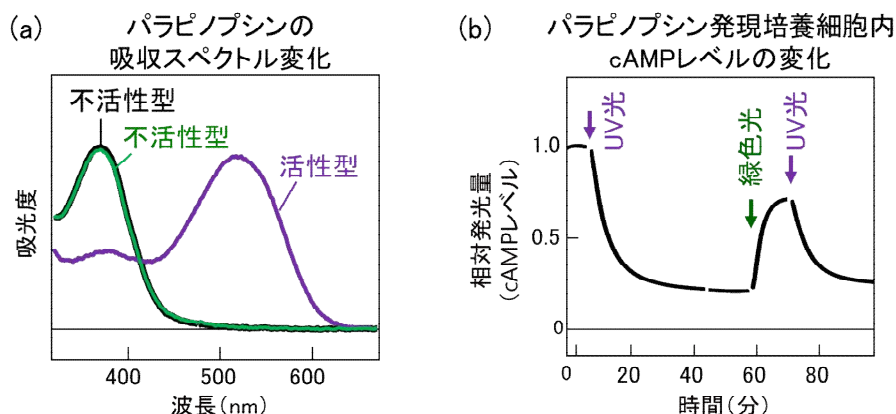


図1 パラピノプシンを用いた細胞内情報伝達因子の色制御

(a) UV感受性オプシンであるパラピノプシン(黒曲線)は、UV光照射により緑色光感受性の安定な活性型(紫曲線)となり、活性型に緑色光を照射すると元の不活性型(緑曲線)に完全に戻る。すなわち、UV光と緑色光によって活性状態と不活性状態を切り替えることができる。(b) Gi共役型であるパラピノプシンを導入することで、培養細胞内のcAMPレベルをUV光によって減少、緑色光によって増加させることができる。

と同様、線虫の忌避行動を引き起こす神経細胞にパラピノプシンを導入し、生体内での機能性を調べた結果、パラピノプシンを導入したトランスジェニック線虫は、UV 光依存的に忌避行動を引き起こした。興味深いことに、緑色光存在下では、このUV 光依存的な忌避行動は起きなかった(招待講演 5)。このことは、パラピノプシンが受容体レベルの分子特性、すなわちUVでオン、緑色光でオフという特徴を備えた“色”操作ツールとして成体内でも使えることを示している。

#### 研究テーマC「近赤外光で作動する GPCR 型光操作ツールの開発」

近赤外光は、“生体の窓”と呼ばれる生体深部に届き易い波長域の光であるため、近赤外光で作動する光操作ツールを開発できれば、光刺激のために挿入するファイバーで組織を傷つけずに、非侵襲的な光操作が可能である。これまでに知られている動物のオプシンの中で最も長波長に感受性のあるオプシンは脊椎動物の赤感受性視物質(吸収極大が~560nm)であるが、これは光再生能がなく光操作ツールに不向きであると考えられていた。一方、光操作ツールとして有用な光再生型オプシンの中で吸収極大が最も長波長にあるのはクモの緑感受性オプシン(吸収極大が~535nm)であり、近赤外光に対する高い感受性は望めない。そこで本研究では、生理学的に長波長光を感じる動物のオプシンについて網羅的に解析を行った。その結果、チョウの赤オプシンが、動物界で最も長波長感受性(吸収極大が~575nm)の光再生型オプシンであることを見出した(招待講演 1, 2, 3)。さらに、配列の改変によって感度を約8倍に上げることに成功した。これら昆虫の赤オプシンについても、野生型の Gq 共役型に加え、Gs 共役型を作製し、培養細胞において、>700nm 光によるカルシウム濃度の上昇と cAMP 濃度の上昇をそれぞれ引き起こすことに成功しており、近赤外光で作動する光操作ツールとして期待できると考えている。

### 3. 今後の展開

本研究によって、いろいろな特徴をもつ GPCR 型光操作ツールを開発し、それらの実用性を示すことに成功した。現在、トランスジェニックマウスを用いた機能性の検証を進めており、その結果によってはさらなる改良が必要かもしれない。また、開発した光操作ツールをアデノ随伴ウイルス(AAV)にパッケージングする体制も整えており、さまざまな生理機能の解析系において GPCR 型光操作ツールの機能性を検証していく予定である。さらに今後は、“非侵襲的な光操作の実現”や“遅い・長期間の細胞応答への応用”といった GPCR 型光操作ツールならではの光操作へと成果を発展させたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

##### (研究者)

本研究の第一の目標であった「実際に使える GPCR 型光操作ツールの開発」は達成できたと考えている。また、細胞内情報伝達因子の色依存的制御を可能とするツールの開発にも成功し、研究課題名に掲げた「光の色を使った精密な制御」が可能となった。さらに、長波長感受性の GPCR 型光操作ツールの開発では、当初の予想よりも長波長で高感度なツールが得られたと考えており、近赤外光を用いた非侵襲的な光操作への期待がもたれる。ただし、長波長感受性ツールについては、まだ生体内での機能性の検証が十分にできておらずその点は今後の課題である。

GPCR 型光操作ツールは、さまざまな生命活動の光操作を可能とすることから、本研究成果の生命科学研究への波及効果は大きいと思われる。すでに、開発したツールを AAV として配布する体制も整っており、さまざまな研究分野への速やかな波及が見込める。

#### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

##### (研究総括)

Opn3をベースとして、Gi型共役型に加え、Gs共役型、Gq共役型およびG12共役型ツールの開発に成功し、GPCRシグナル伝達系の主要4カスケードの光操作を可能とする成果を挙げている。また、UV感受性のbistableオプシンをベースにしたツールを開発し、色によるシグナル伝達のON/OFFの切り替え、さらに色に応じた細胞内cAMPレベルの調節に成功した。さらに、オプシンの新規探索によって、チョウおよびトンボから動物界最長の波長感受性の赤オプシンを見出し、近赤外光で作動する光操作ツールの開発にも成功した。このように、GPCR型光操作ツールは、当初提案の通り、実際に新規に設計して生体内で機能するところまで実証した点は高く評価できる。さらに、波長や性質の異なるGPCRの設計も手掛けており、評価できる。GPCR型のメリットを強調できる系の共同研究者と共にGPCR型オプシンの技術(GPCR型光操作ツール)をさらに普及させて頂きたい。タンパク質の主鎖二面角を5つの領域に分割し、タンパク質の3次元立体構造を主鎖二面角パターンとして捉えることで、タンパク質の二次構造をつなぐループの形状に、いくつかのパターンがあることを発見した。さらに、局所および非局所構造に関するルールを用いることで様々な形状や大きさを持つ $\alpha$ 型タンパク質構造の様々なデザイン

ンに成功した。このルールとATP結合・加水分解に関わるP-loopモチーフを組み合わせることで、リン酸に結合するタンパク質のデザインに成功したことは高く評価できる。タンパク質分子を自在にデザインする手法を広めて、細胞の制御・設計の基礎分野から、新規素材の開発、新規医薬品など広い産業分野で貢献すること期待したい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

- |   |
|---|
| 1. Sun L, Kawano-Yamashita E, Nagata T, Tsukamoto H, Furutani Y, Koyanagi M, Terakita A. Distribution of mammalian-like melanopsin in cyclostome retinas exhibiting a different extent of visual functions. PLoS One (2014), 9(9):e108209.                                  |
| 2. Koyanagi M, Wada S, Kawano-Yamashita E, Hara Y, Kuraku S, Kosaka S, Kawakami K, Tamotsu S, Tsukamoto H, Shichida Y, Terakita A. Diversification of non-visual photopigment parapinopsin in spectral sensitivity for diverse pineal functions. BMC Biology (2015), 13:73. |
| 3. Kawano-Yamashita E, Koyanagi M, Wada S, Tsukamoto H, Nagata T, Terakita A. Activation of Transducin by Bistable Pigment Parapinopsin in the Pineal Organ of Lower Vertebrates. PLoS One (2015), 10(10):e0141280.   |
| 4. Sugihara T, Nagata T, Mason B, Koyanagi M, Terakita A. Absorption Characteristics of Vertebrate Non-Visual Opsin, Opn3. PLoS One (2016), 11(8):e0161215.   |

### (2)特許出願

研究期間累積件数:1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)

#### 【招待講演】

1. Mitsumasa Koyanagi. Molecular properties of diverse and engineered bistable pigments and their optogenetic potential. 16th International Conference on Retinal Proteins. (2014).
2. Mitsumasa Koyanagi. Introduction of animal rhodopsins and their optogenetic potentials. 2015年光化学討論会 (2015).
3. Mitsumasa Koyanagi. Optical control of cell signaling using bistable animal opsin-based pigments. 17th International Conference on Retinal Proteins. (2016).
4. Mitsumasa Koyanagi. Potential of bistable pigments for optical control of cell signaling. 22nd International Congress of Zoology & 87th meeting of Zoological Society of Japan. (2016).
5. Mitsumasa Koyanagi. Optogenetic potentials of bistable animal opsin-based pigments for regulating GPCR signalings. 第54回生物物理学会年会 (2016).

#### 【著書・総説】

1. 小柳光正, 寺北明久. “非視覚”型光受容タンパク質 Opn3 とその GPCR 研究への応用.

ファルマシア 50 巻 9 号 (2014).

2. 小柳光正. 「細胞内情報伝達分子の時空間的に精密な制御」 生体の科学 Vol.65 No.5 (2014).
3. Terakita A, Nagata T, Sugihara T, Koyanagi M. “Optogenetic Potentials of Diverse Animal Opsins.” Optogenetics. pp77-88 (Springer) (2015).