

研究終了報告書

「構造情報を基にした新規チャンネル型抑制性光遺伝学ツール開発」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：加藤 英明

1. 研究のねらい

近年イオン輸送型ロドプシンは、光によって生命現象をコントロールするための実験ツール(光遺伝学ツール)として脚光を浴びている。2005年に光駆動性陽イオンチャンネルであるチャンネルロドプシン(ChR)を用いて光依存的に神経細胞を興奮させる技術が開発されて以降、様々な研究分野、特に神経科学分野において、イオン輸送型ロドプシンを用いた光遺伝学研究が行われており、その関連研究は現在まで増加の一途をたどっている。

こうした研究の積み重ねにより興奮性ツールが成熟してきた一方、神経細胞の興奮を抑制する光遺伝学ツール(抑制性ツール)の開発は立ち遅れている。2014年まで抑制性ツールと言えば光駆動性内向き Cl⁻ポンプであるハロロドプシン(HR)と光駆動性外向き H⁺ポンプであるアーキロドプシン3(AR3)であったが、ポンプであるHRやAR3はコンダクタンスや光感受性が低く、また長時間の活性化はCl⁻やH⁺の平衡電位を超えて膜電位を極端に変化させるため、細胞膜の不安定化やGABAAなどの内在チャンネルの機能を乱すことが報告されていた。そうした状況下で、2014年には研究代表者(加藤)が解明したChRの構造情報を基に人工の光駆動性Cl⁻チャンネルであるiClC2、ChloCが開発され(その後分子改変によってiC⁺⁺、iChloCへと改良)、2015年には緑藻類から天然の光駆動性Cl⁻チャンネルであるGtACR1,2が発見された。こうしたチャンネル型抑制性ツールは前述したポンプ型抑制性ツールの持つ問題点を解決してくれたが、興奮性ツールと比較して未だその多様性は低く、克服すべき課題も多い。本研究課題では近年開発、あるいは自然界より発見されたチャンネル型抑制性ツールの構造機能相関に関する理解を深め、その分子理解に基づき新たな抑制性光遺伝学ツールを創成することを目指す。具体的には、キネティクスやイオン選択性を改変させたチャンネル型抑制性光遺伝学ツール開発を主たる目標と定めるが、研究の展開によってはそれ以外の光遺伝学ツール開発や構造解析の手法開発も目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

チャンネル型抑制性光遺伝学ツールとして名高い、天然型アニオンチャンネルロドプシンGtACR1、および人工型アニオンチャンネルロドプシンiC⁺⁺の高分解能結晶構造を決定することに成功した(図1)。さらに、これら二つのアニオンチャンネルロドプシンを比較することにより、「人工型アニオンチャンネルロドプシンと天然型アニオンチャンネルロドプシンでは、全体構造こそ類似しているが、キネティクスやイオン選択性、コンダクタンスといったチャンネルの諸性質が異なる形でエンコードされており、これが両者の性質の違いを生み出している」ということを見出した。また、これらの立体構造をもとにGtACR1のアミノ酸を改変することで「高いチャンネルコンダクタンスと高いアニオン選択性を保持しながら、速いチャンネルキネティクスを合わせ持つ」アニオンチャンネルロドプシンFLASHの開発に成功した(図2)。さらには、このFLASHを既存のアニオンチャンネルロドプシンであるZipACRと比較することにより、FLASHが実際に優れたオプト

ジェネティクスツールであることを実証した。これらの結果を論文 2 報にまとめ、2018 年の 8 月に筆頭著者および責任著者の一人として、学術誌 *Nature* の article に連報として報告した。

また、GtACR1 の結晶構造から、そのコンダクタンス特性は主に TM1,2 に、その吸収波長特性は TM3-5 付近にコードされていることが判明したため、大きなチャネルコンダクタンスを持つ GtACR1 と、GtACR1 と比較して短波長側に吸収波長ピークを持つ別のアニオンチャネルロドプシン ACR1A の両者の特性を合わせることにはできないかと考え、GtACR1 と ACR1A のキメラ体を作成した。その結果、予想通り大きなチャネルコンダクタンスと短波長側に励起波長ピークを持つ新規 ACR を作成することに成功している。

(2) 詳細

研究テーマ A 「光駆動性 Cl⁻チャネルである iC⁺⁺、GtACR1 の X 線結晶構造解析」

研究の狙い:

抑制性光遺伝学ツールとして現在最もよく利用されている人工型アニオンチャネルロドプシン iC⁺⁺、天然型アニオンチャネルロドプシン GtACR1 の結晶構造解析を行い、そのチャネル特性(とくにキネティクス、イオン選択性、コンダクタンス、吸収波長)の違いの構造基盤を理解する。

成果:

GtACR1、iC⁺⁺の結晶構造をそれぞれ 2.9Å という分解能で決定し、分光学、計算科学、電気生理学的手法と組み合わせることで、そのキネティクス、イオン選択性、コンダクタンス、吸収波長を決定する構造基盤の一端を解明した(図 1)。その点で本研究テーマの目的は完全に達成済みであり、その成果として筆頭著者および責任著者の一人として、学術誌 *Nature* の article に論文を 2 報、連報として報告している。

研究テーマ B 「限定的光駆動性 K⁺チャネルの構造解析」

タンパク質の発現精製系の確立および必要な装置開発には成功したが、実際の構造解析には至っていない。

研究テーマ C 「立体構造情報を用いたツール開発と評価」

研究の狙い:

研究テーマ A で得られた構造情報を用いて、有用な抑制性ツール、特にオフキネティクスが数十分のアニオンチャネルロドプシンを開発する。また、研究テーマ B で得られた構造情報を用いて、生理的 pH で機能する K⁺チャネルロドプシンを開発する。

成果:

当初の予定とは異なるものの、GtACR1、iC⁺⁺の構造情報を用いて、高いコンダクタンスと早いキネティクスを併せ持つ初のアニオンチャネルロドプシン FLASH を開発することに成功し、これを論文発表している(図 2)。また、大きなチャネルコンダクタンスと短波長側に励起波長ピークを持つ新規 ACR の開発にも成功している。

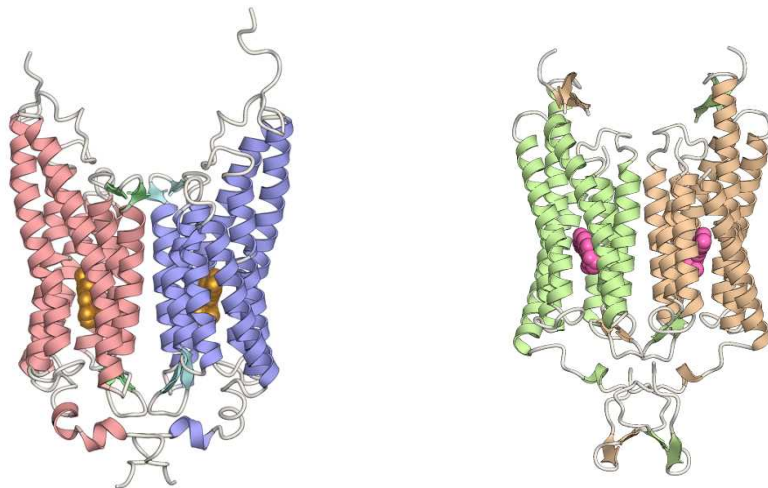


図 1 アニオンチャンネル型ロドプシンの結晶構造。左:天然型光駆動性陰イオンチャンネル GtACR1。右:人工型光駆動性陰イオンチャンネル iC++。

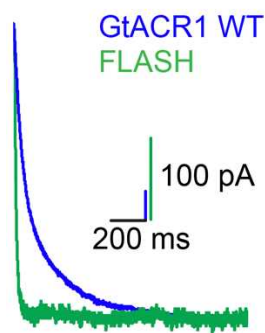


図 2 FLASH のオフキネティクス。比較のため野生型 GtACR1 を載せている。

3. 今後の展開

さきがけ研究期間中に開発した装置を用い、引き続き限定的光駆動性 K⁺チャンネルの構造解析を行う。また、アニオンチャンネル型ロドプシンの性質改良についても引き続き着手していく。より長期的な展望としては、本研究期間中に得た知識や経験を生かすことでアニオンチャンネル型ロドプシンの枠を超え、広く光駆動性タンパク質を利用した新規光遺伝学ツールの開発を目指す。

4. 自己評価

当初一番の目的としていた天然型アニオンチャンネル型ロドプシン GtACR1、人工型アニオンチャンネル型ロドプシン iC++の構造解析は予定通り完遂させることができ、また構造情報に基づいた新規のチャンネル型抑制性光遺伝学ツールを開発することができたという意味でも、目標の大半は達成できたのではないかと考えている。また、研究テーマ B についてもさきがけの研究期間中に完遂することは叶わなかったが、そのために必要な装置の開発や proof-of-concept 実験については成果を挙げており、その結果から新しいプロジェクトや新しい展望が生まれていることから一定の成功を収めていると考えている。加えて、医療応用などが可能と期待される光遺伝学ツールについてもそのプロトタイプを開発することに成功しており、さきがけ期間終了後も次に繋が

る成果を上げることが出来たのではないかと考えている。

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. Kim YS*, **Kato HE***†, Yamashita K, Ito S, Inoue K, Ramakrishnan C, Fenno LE, Evans KE, Paggi JM, Dror RO, Kandori H, Kobilka BK, Deisseroth K†. Crystal structure of a natural anion-conducting channelrhodopsin GtACR1. 2018, *Nature* 561, 343–348 (*equal contribution) (†co-correspondence)

基底状態におけるGtACR1の結晶構造を2.9Åで決定し、シッフ塩基周辺部やレチナールの結合部位、イオン透過経路に渡る特徴的な構造情報を明らかにした。

2. **Kato HE***†, Kim YS*, Paggi JM, Evans KE, Allen WE, Richardson C, Inoue K, Ito S, Ramakrishnan C, Fenno LE, Yamashita K, Hilger D, Lee SY, Berndt A, Shen K, Kandori K, Dror RO, Kobilka BK, Deisseroth K†. Structural mechanisms of selectivity and gating in anion channelrhodopsins. *Nature* 2018, 561, 349–354 (*equal contribution) (†co-correspondence)

基底状態において、異なるpHでiC++の結晶構造を解明した。さらに、iC++とGtACR1の結晶構造を比較し、分子動力学シミュレーションや電気生理学的解析を行うことで、天然型アニオンチャンネルロドプシンと人工型アニオンチャンネルロドプシンが異なる分子機構によってイオン選択性やキネティクスを担保していることを見出した。加えて、得られた構造情報からGtACR1に変異を加えることで、高いコンダクタンスを維持したままキネティクスを早めたアニオンチャンネル型ロドプシンであるFLASHを開発し、それが類似の既知ツールであるZipACRよりも優れたパフォーマンスを示すことを、培養神経細胞、線虫、マウスを用いた比較実験によって明らかにした。

3. **Kato HE** Structure-Function Relationship of Channelrhodopsins. 2021, *Advances in experimental medicine and biology* 1293, 35–53

論文1, 2の内容を含めたチャンネル型ロドプシンの構造機能相関についてこれまでの知見をまとめて総説として発表した。

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1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)

「代表的な学会発表」

1. 「Structural mechanisms of ion selectivity and high-speed gating in anion channelrhodopsins」, 18th International Conference on Retinal Proteins (Mono, Canada, 2018)
2. 「Structure-guided engineering and mining of channelrhodopsins」, Optogenetics 2020 (New York, US, 2020, Zoom)

「代表的な受賞」

3. 文部科学省 科学技術学術政策研究所「ナイスステップな研究者2019」賞(2019)

4. 令和 2 年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞 (2020)
5. フロンティアサロン永瀬賞 特別賞 (2020)
6. 島津科学技術振興財団 島津奨励賞 (2020)