

**「光 OFF 型オプシンによる高感度かつ自然な視覚再生」**

研究期間： 2018 年 10 月～2022 年 3 月

研究者： 永田 崇

## 1. 研究のねらい

動物が持つオプシンはヘテロ三量体 G タンパク質の情報伝達系を光操作するための光遺伝学ツールとして利用されている。既存の動物オプシンをベースとしたツールは、光でシグナル伝達系を ON にする“光 ON 型”に限られていた。私達は最近、動物オプシンの一種であるペロプシンが“光 OFF 型”という新規の性質を示すことを見出した。すなわち、アミノ酸配列の一部を置換したペロプシンのキメラ変異体は暗中で定常的に G タンパク質を活性化し、光を吸収すると活性化をやめる。このような既存のツールとは反転した特性を持つ光 OFF 型オプシンを用いることで初めて達成できる課題として、網膜色素変性症に対する“高感度かつ明暗反転のない視覚再生”に取り組む。

指定難病の一つである網膜色素変性症は、遺伝的な要因により視細胞が変性し、視機能の完全な喪失を含む重大な視覚障害をもたらす。モデル動物を用いた先行研究により、視細胞からシグナルを受け取るオン型双極細胞に視物質ロドプシンを発現させることで、一般的な室内の明るさで機能する視覚の再生が可能であることが示された。ところがこの方法で実現できるのは双極細胞の“光依存的な過分極応答”であり、本来の双極細胞の“光依存的な脱分極応答”から反転した応答となってしまふ。一方、光 OFF 型のキメラペロプシンを用いれば、このような反転は生じない。

そこで本研究では、網膜色素変性症に対する視覚再生のための遺伝子治療技術として、光 OFF 型オプシン・キメラペロプシンを用いて高感度（一般的な明るさの室内で機能）かつ明暗反転のない自然な視覚機能の再生をモデル動物で実現することを目指す。そのために、キメラペロプシンを使った視覚再生が可能であることを網膜変性の動物モデル（ゼブラフィッシュおよびマウス）を利用して実証する。また、高感度の視覚再生を目指すため、オン型双極細胞の神経応答に関わるシグナル伝達系を効率よく駆動するキメラペロプシンが必要である。培養細胞を用いた *in vitro* の実験系により、ターゲットとなるシグナル伝達系を駆動する効率の高いキメラペロプシンを視覚再生のための光遺伝学ツールとして創出する。

## 2. 研究成果

## (1) 概要

視覚再生においてより高い光感度を実現するために、オン型双極細胞の神経応答に関わる Go 型 G タンパク質(図1)を効率よく駆動する変異体の創出を目指した。まずは培養細胞を用いた Go の活性化効率を評価する実験系の検討を行った。複数の手法を検討したが、

Go の活性化を直接定量的に調べられる NanoBiT G protein dissociation assay (Inoue et al., *Cell*, 2019) について、複数の実験条件を最適化することで Go 活性化の光 OFF 反応をハイスループットで解析することに成功した。ペロプシンの変異体については、ペロプシン細胞内領域の一箇所あるいは複数箇所を、Go を活性化することがわかっているオプシンや受容体のアミノ酸配列で置換することにより 20 種類以上作製し、上記の方法を用いて Go の活性化効率について検討した。その結果、Go の活性化の効率を向上させるために効果的な置換領域と置換配列を見出し、最も高い効率を達成する変異体を特定した。この変異体は、視覚再生の先行研究に用いられた光 ON 型オプシンに対して 30–60% 程度の Go の活性化効率を示したことから、十分有用であることが *in vitro* において示された。

視覚再生の検証については、遺伝子導入ゼブラフィッシュを用いた実験を進めるため、網膜双極細胞での遺伝子発現系の確立、および視覚機能を評価する実験系の構築を行った。遺伝子導入による発現系に関しては、双極細胞特異的プロモーターと Gal4-UAS システムを組み合わせ、導入遺伝子を双極細胞に高いレベルで発現させることに成功した。またこれらの遺伝子導入系統の個体を、網膜変性を引き起こす遺伝子変異をもつ pde6cw59 系統と掛け合わせることで、この変異をヘテロで保持し、導入遺伝子を持つ個体を得た。この親から得られる稚魚のうち変異をホモで持つ個体は、錐体視細胞の機能を失う。その上で導入遺伝子(オプシン)を持つ場合に視覚がどの程度回復するか評価することで導入遺伝子の効果を調べることが出来る。視覚機能の評価は、視覚(光)刺激により生じる眼球運動 Optokinetic response (OKR) の計測により行うこととした。野生型の稚魚では正常な OKR が観察されたが、pde6cw59 の変異により錐体視細胞の機能を失った個体では眼球が視覚刺激を追従できないことがはっきりと見られ、視覚機能を評価することが出来た。以上の成果により、視覚再生のための光 OFF 型ツールの高効率化やそのための分子デザインの戦略、*in vitro* および *in vivo* における一連の機能評価を確立することができた。

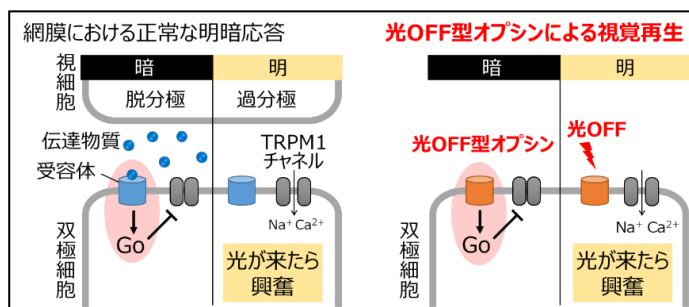


図1 Go 型 G タンパク質を活性化する光 OFF 型オプシンによる視覚再生の概念図。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「視覚再生のための光 OFF 型光遺伝学ツールの開発」

視覚再生においてより高い光感度を実現するために、オン型双極細胞の神経応答に関わる Go 型 G タンパク質(図1)を効率よく駆動する変異体(キメラペロプシン)の創出を目的として、研究をおこなった。

まず取り組むべき課題として、Go の活性化効率を評価する実験系について検討した。ある変異体の網膜中での光感度を予測するためには、1分子あたりの活性と、細胞における発現量という2つの変数の積を評価する必要がある。また多数の変異体を試すためある程度のスループットが求められる。そこでこれらの条件を満たすために、96 穴プレート中の培養細胞に一定量の DNA をトランスフェクションしてタンパク質を発現させ、そのまま培養細胞中で G タンパク質の活性化を定量的に測定することとし、該当する方法について検討を行った。はじめに、Go と同じ G $\alpha$  グループに属する Gi タンパク質の活性化を評価する GloSensor cAMP assay と、その応用であり Go タンパク質の C 末端領域(受容体との主な相互作用部位)を持つ Gs タンパク質の活性化を評価する GsX assay について、複数の変異体を用いて比較した。その結果、Gi に対する活性化効率は必ずしも Go に対する活性化効率と対応しないことが強く示唆された。そこで最近発表された、Go タンパク質そのものの活性化を調べられる NanoBiT G protein dissociation assay (Inoue et al., Cell 2019) について次に検討した。複数の実験条件(DNA 量、ルシフェリンの種類など)を最適化する必要があったが、その結果、十分高い SN 比でキメラペロプシンによる Go 活性化の光 OFF 反応を測定することができるようになった(図2)。

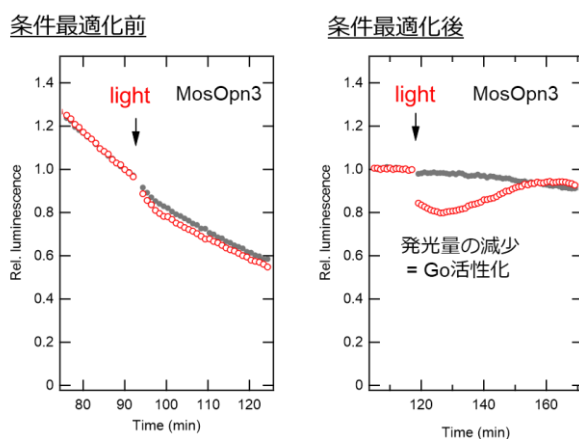


図2  
NanoBiT G protein dissociation assay の条件最適化。最適化により光照射前後のシグナル変化量が5倍程度向上し、またベースラインも安定した。

#### 新たなキメラペロプシンの変異体

については、ペロプシンの細胞内領域を、Go を活性化することがわかっている5種類のオプシン、あるいは双極細胞でシグナル伝達系を駆動している受容体である mGluR6 のいずれかのアミノ酸配列と置換することで作製した。その結果、3 種類のオプシンの配列を用いた場合、良好な結果が得られた。興味深いことに、第3ループ領域のみを置換した場合、Gi は活性化するが、Go はあまり活性化しなかった。また、細胞内の全領域を置換するよりも、第2ループと第3ループのみを置換した変異体の方が Go の活性化効率が高かった。これらの結果を踏まえ、第2ループと第3ループの2つの領域を、それぞれ上述の3種類のオプシンの配列のいずれかで置換した全9種類の変異体を総当りに解析した。その結果、図3に示す変異体9が最も高い Go の活性化効率を示し、本研究において検討した範囲ではこの変異体が最も効率の高い変異体であると結論づけた。この変異体は、視覚再生の先行研究で用いられているロドプシン(桿体オプシン)による Go 活性化の 30-60%程度の活性を示したことから、視覚再生における有用性が示唆される。また興味深いことに、この変異体は

Go, Gi ともに高い活性化効率を示したが、他の置換配列を用いた変異体などでは、同程度の Go 活性化を示しつつ、Gi の活性化は示さないことがわかった。

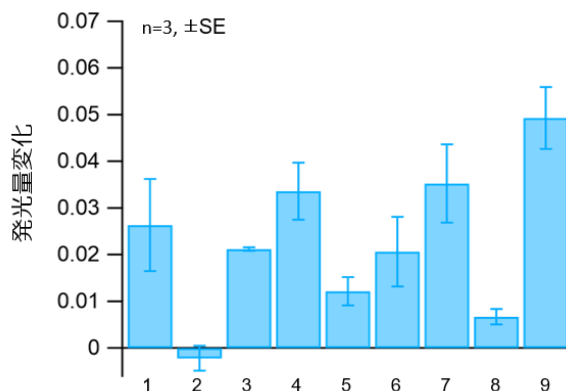


図3

第2・第3ループを3種類のオプシンの配列で置換したペロプシン変異体における、照射前後の発光量(Go 活性化量)の変化の比較。番号は変異体の種類を示す。

#### 研究テーマB「モデル動物を用いた視覚再生の実証」

まずゼブラフィッシュを用いて検証実験を行うため、遺伝子導入による網膜双極細胞での遺伝子発現系の確立、および視覚機能を評価する実験系の構築を進めた。遺伝子導入による発現系に関しては、はじめはオン型双極細胞特異的に発現する *Nyx* 遺伝子のプロモーターを単独で用いて発現を試みた。しかしながら遺伝子導入システムを複数得たが双極細胞での明確な導入遺伝子の発現が見られなかった。*Nyx* 遺伝子は発現量の多い遺伝子ではないためプロモーター活性が低いと予想し、発現量を向上させるためにこのプロモーターを Gal4-UAS システムを組み合わせた結果、GFP を双極細胞に高いレベルで発現させることに成功した(図)。また導入遺伝子を持つ個体のスクリーニングを簡便にするために、遺伝子導入に用いるプラスミドに、心筋に蛍光タンパク質 mCherry を発現させるための発現カセットを加え、蛍光スクリーニングを可能にした。*Nyx* プロモーター下で Gal4 を発現する系統(Gal4 系統)と、UAS 下でオプシンを発現させる系統(UAS 系統)をそれぞれ別々に作製し、交配させたときに双極細胞にオプシンが発現する個体が得られる。このようにして得た子(稚魚)でのオプシンの発現を RT-PCR によって確認した。また、これらの遺伝子導入系統の個体を、網膜変性を引き起こす遺伝子変異をもつ *pde6cw59* 系統と掛け合わせ、この変異をヘテロで保持し、導入遺伝子を持つ親を得た。掛け合わせで得られる稚魚のうち、変異をホモで持つ個体は、錐体視細胞の機能を失う。その上で導入遺伝子(オプシン)を持つ場合に視覚機能が回復するかについて評価するための実験系の構築に取り組んだ。

視機能の評価には、視覚刺激により生じる眼球運動 Optokinetic response (OKR) の計測により行うこととし、測定系を構築した。実際に、野生型の稚魚では正常な OKR が観察されたが、*pde6cw59* の変異により錐体視細胞の機能を失った個体では眼球が視覚刺激を追従できないことがはっきりと見られ、すなわち視覚機能を評価することが出来た。

当初の予定よりも進捗が遅れ、作製したシステムを用いた OKR による解析は今後の課題である。要因として、双極細胞での遺伝子発現系を確立するのに時間がかかったこと、また研究期間の途中に所属機関を異動し、ゼブラフィッシュの飼育系などを一から立ち上げたが、水質など維持に関して安定しない時期があり多くの個体が死んでしまう事があったことが挙

げられる。

#### 微生物ロドプシンに関する研究領域内外での共同研究

近年、様々な性質を持つチャンネル型ロドプシンが報告され、チャンネル型ロドプシンの持つポテンシャルの広がりが明らかになってきた。より高い光感度や異なるイオン選択性、さらには「暗中で開状態をとり、光を受けてチャンネルが閉じる」という光 OFF 型の性質を持ったチャンネルロドプシンが創出できれば、視覚再生研究に資する大きな成果となると期待できる。そこで、チャンネルロドプシンの開状態・閉状態の制御メカニズムに関する共同研究に参加し、ゲートキーパーの役割を果たすアミノ酸残基を特定した(Nagasaka et al., *Biophys Physicobiol*, 2020)。開状態・閉状態の制御に向けた足がかりの一つとなる成果となった。また、光 OFF 型チャンネルロドプシンの創出のためには、開状態の構造を決定することが重要である。そこで、構造生物学の専門家である加藤研究者(光操作領域)と、陽イオンチャンネル型ロドプシンの開状態構造の決定を目指した共同研究を開始した。クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析における光照射条件を決めるために、分光学的手法を用いてチャンネルロドプシンの開状態蓄積率が大きくなる光照射条件を探索する役割を果たした。共同研究の成果の一部については加藤研究者が主導し論文として発表された。

### 3. 今後の展開

遺伝子導入ゼブラフィッシュを用いた視覚再生について、今回 *in vitro* で最も高効率であった変異体を用い検証実験を続行中である。研究期間内ではマウスを用いた検証実験が行えなかったため、次のステップとしてはウイルスベクターを用いてマウス網膜へキメラロドプシンを導入し、行動学的に視覚再生の検証を行うことである。視覚再生を目的としたオン型双極細胞へのオプシン遺伝子(ロドプシンや錐体オプシンなど)の導入は、マウスだけでなく霊長類でも行われており(Q. Lu et al., *Gene Therapy*, 2016)、複数のグループやベンチャー企業が治験を目指して研究を進めている。キメラロドプシンはこれらの先行研究で用いられているオプシンと類似の遺伝子で同じ作用機序で働くため、先行研究で得られた知見・成果を応用しやすい。このことから、マウス網膜での機能性さえ確かめられれば、これらの先行研究に追いつくのに数年から5年程度であると予測できる。

また、これらの先行研究で用いられているオプシン遺伝子は本来は Gt 型 G タンパク質を活性化する性質を持ち、Go の活性化に最適化された遺伝子ではない。本さきがけ研究で確立した培養細胞での Go 活性化効率の評価系を利用し、今回キメラ変異体の作製に用いて良い成績が得られたアミノ酸配列を導入することなどにより、これら既存のオプシン遺伝子の改良が可能であることが見込まれる。

### 4. 自己評価

研究テーマのうち、ツールの開発については当初の目的をおおむね達成できたと考えている。Go の活性化を解析する培養細胞ベースの実験系を(オプシンの解析に関しては初めて)確立できたことで、*in vitro* での各変異体の評価をしっかりと行えた。実験の数を多くこなすことが必要であったが、そのために技術職員を雇用したことで結果的に十分研究を進めること

ができたので、技術職員の雇用は効果的だったと考えている。最終的に、既存の光 ON 型オプシンツール(ロドプシン)に近い活性化効率の変異体が得られただけでなく、研究を進める過程で、Go の活性化には細胞内第2・第3ループの置換が重要であることや、第1ループや C 末端領域の置換は必要でないことなどの経験則を得ることができた。動物のオプシン遺伝子を用いた光遺伝学ツール開発という観点でいえば、これらの成果はペロプシンに限らず今後広く役に立つ知見だと考えられる。また予想外な結果として、第2ループと第3ループの組み合わせにより、Go を活性化するが Gi はほとんど活性化しない Go 特異的な変異体や、その逆の Gi 特異的な変異体が得られた。Go は脳の中で最も量の多いタンパク質の一つであるが、そのシグナル伝達系がどのような生理的役割を担っているのか理解が進んでいない。本研究で得られた Go 特異的なキメラペロプシンや、同様の設計をして得られる可能性のある Go 特異的な光オン型ツールは、Go のシグナル伝達系についての研究に資する可能性がある。

一方で、モデル動物を用いた視覚再生の検証実験については、研究構想の段階で想定したよりもかなりスケジュールとして遅れてしまった。直接的な要因として挙げられるのは、ゼブラフィッシュにおいて当初使用した遺伝子発現系がよく機能せず、再検討が必要だったことや、所属機関の異動により飼育系を新たに立ち上げる必要があり、その際に飼育がうまくいかずゼブラフィッシュを死なせてしまったり卵を産ませるのに苦労したことなどである。研究者自身がそれまでゼブラフィッシュを扱った経験に乏しかったことがこれらの要因を作った大きな原因と考えられる。当初から経験不足であることを織り込んでリソースをより多く振り向けたりスケジュールを前倒しにするべきであったと反省している。今回の成果として得られた遺伝子導入系統と実験系を用いた視覚再生の検証については今後の課題として引き続き行っていく。

## 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. Yujiro Nagasaka, Shoko Hososhima, Naoko Kubo, Takashi Nagata, Hideki Kandori, Keiichi Inoue, Hiromu Yawo. Gate-keeper of ion transport—a highly conserved helix-3 tryptophan in a channelrhodopsin chimera, C1G2/ChRWR. *Biophysics and Physicobiology*. 2020, Volume 17 Pages 59-70

チャンネルロドプシンの膜貫通ヘリックス3の中央部にある Trp 残基は、微生物ロドプシンの間で高度に保存されているが、イオン輸送機能との関係は不明であった。本論文では変異体の解析によりこの Trp 残基がゲートオン/オフに関わる構造を安定化させる役割、すなわち「ゲートキーパー」の役割を担っていることを示した。不完全なゲートオフに起因する、暗中で H<sup>+</sup>リーク電流も観察され、光 OFF 型チャンネルロドプシンの創出への可能性を示した。

### (2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0件(特許公開前のもも含む)

(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. 永田崇 日本比較生理生化学会 2021 年度吉田奨励賞 2021 年 12 月 受賞
2. 永田崇 「視覚再生に向けた暗活性・光不活性化 GPCR 型光遺伝学ツールの開発」  
第 59 回生物物理学会年会 2021 年 11 月 26 日 招待講演
3. 永田崇, 寺北 明久 「ハエトリグモにおける視覚機能とオプシンの吸収波長特性の関係」  
*比較生理生化学 総説*, 第 36 巻, 第 3 号, pp 175-181 (2019)
4. Mikio Kataoka, Takashi Nagata 「Expanding horizons of biosciences by light-control」  
Commentary and Perspective, *Biophysics and Physicobiology* 18 13-15 (2021)
5. Koichiro E. Kishi, Yoon Seok Kim, Masahiro Fukuda, Tsukasa Kusakizako, Elina Thadhani,  
Eamon F.X. Byrne, Joseph M. Paggi, Charu Ramakrishnan, Toshiki E. Matsui, Keitaro  
Yamashita, Takashi Nagata, Masae Konno, Peter Y. Wang, Masatoshi Inoue, Tyler Benster,  
Tomoko Uemura, Kehong Liu, Mikihiro Shibata, Norimichi Nomura, So Iwata, Osamu  
Nureki, Ron O. Dror, Keiichi Inoue, Karl Deisseroth, Hideaki E. Kato  
「Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine」  
*Cell*, doi: 10.1016/j.cell.2022.01.007 (2022)