

眼の光センサータンパク質を眼以外でも活用

—細胞の機能に重要な分子 cAMP の濃度を光で一過的に変化させる分子ツール—

概要

京都大学大学院理学研究科 山下高廣講師、同 酒井佳寿美研究員、同 七田芳則名誉教授（現・立命館大学総合科学技術研究機構 客員教授）、同 今元泰准教授の研究グループは、眼の光センサータンパク質を改変して、多くの細胞で重要な働きをする cAMP（環状アデノシン酸）の濃度を光で一過的に変化させられる分子ツールを開発しました。

cAMP は、多くの細胞において分化・生存・極性形成・ホルモン分泌など重要な機能を果たすことが知られています。そのため、細胞内の cAMP 濃度を人為的に変化させることができれば、細胞の機能を自由に操作してその重要性を明らかにすることができます。眼の中で視覚に働く光センサータンパク質であるロドプシンは、光で細胞内の cAMP 濃度変化を誘導できることが知られていました。そのため、細胞に直接触れることなく光を使って cAMP 濃度を変えることができる低侵襲的な操作ツールとなり得ます。しかし、視覚ロドプシンを用いた場合には、光による cAMP 濃度変化が比較的長く続き、短時間で繰り返しの応答を誘導することが難しい、などの課題もありました。そこで本研究チームは、これまでに蓄積した種々の光センサータンパク質の知見に基づいて、視覚ロドプシンにアミノ酸変異を加えることにより、cAMP 濃度変化を短時間で一過的に起こすことのできる光センサー分子の作製に成功しました。また、さらなる変異により cAMP 濃度変化を起こす時間を変えられることも分かりました。眼の光センサータンパク質を眼以外の細胞で利便性よく活用できるように改変した新たな分子ツールとしての応用が期待できます。

本成果は、2022 年 2 月 25 日に、国際学術誌「eLife」にオンライン掲載されました。

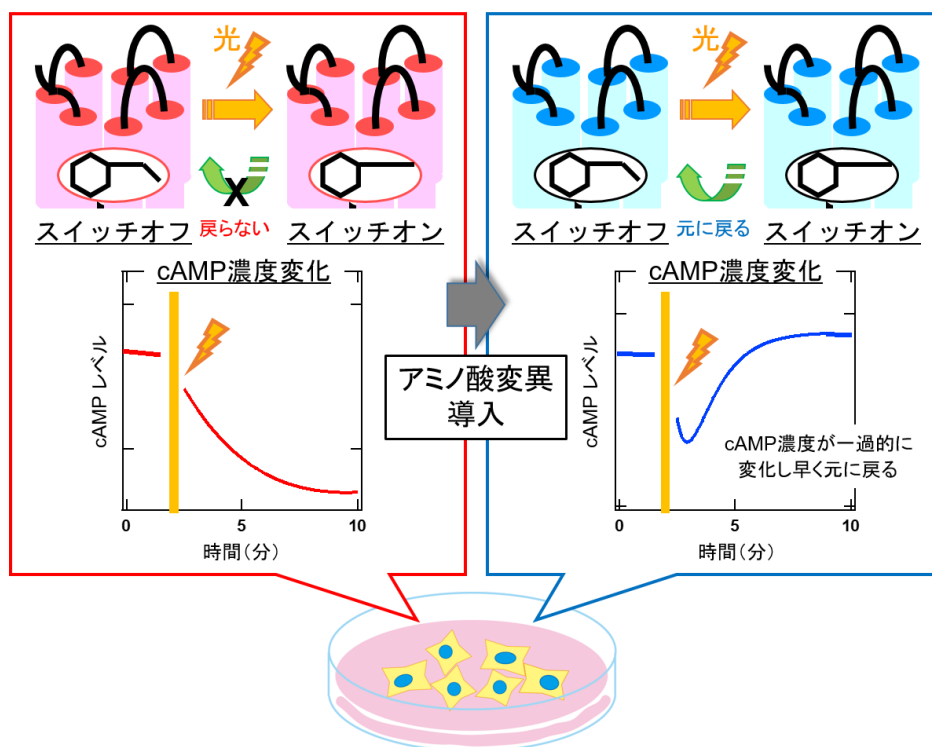


図 眼の光センサータンパク質を改変することで、光を使って一過的に cAMP の濃度変化を誘導できる

1. 背景

ヒトを含む多くの動物は、多種類の細胞から構成されます。個々の細胞の機能を理解するにあたり、その機能を人為的・特異的に操作する技術の開発・改善が強く望まれています。そのような技術の1つとしてここ10年余りで急速に発展しているのがオプトジェネティクス（光遺伝学）です。光を使って細胞に直接触れることなく細胞の機能を操作する技術で、高校の教科書にも登場する単細胞の緑藻クラミドモナスから見つかった光センサータンパク質チャンネルロドプシン^{*1}を用いた研究が最も有名です。チャンネルロドプシンは、光を受容するための補因子としてレチナール（ビタミンA誘導体）を持ち、光を受けて陽イオンを透過します。このチャンネルロドプシンを神経細胞に発現させることで、細胞に直接触れることなく光を使って低侵襲的に細胞を興奮させることができます。

ヒトもレチナールを含む光センサータンパク質を持つことが古くから知られています。このような光センサータンパク質をオプシンと呼び、眼の中の視細胞で視覚に関わるロドプシン^{*2}が最も有名です。視覚ロドプシンは、視細胞ではcGMP（環状グアノシンーリン酸）の濃度を変化させることで細胞の電氣的応答を引き起こし、それが脳に伝達されます。ただ、他の細胞に視覚ロドプシンを発現すると、cAMP（環状アデノシンーリン酸）の濃度を光刺激で減少させられることが知られています。cAMPは、多くの細胞において分化・生存・極性形成・ホルモン分泌など重要な機能を果たします。そのため、視覚ロドプシンは多くの細胞で重要なcAMP濃度を光で操作する分子ツールとして利用できると考えられます。しかし、視覚ロドプシンは光を受けて活性化（スイッチオン）した後、その状態がしばらく続いた後自発的には元の状態に戻らず、レチナールを離してスイッチオフの状態になります（図1）。そのため、視覚ロドプシンを用いた場合には、光によるcAMP濃度変化が比較的長く続き、短時間で繰り返し応答を誘導することが難しい、という課題もありました（図2）。

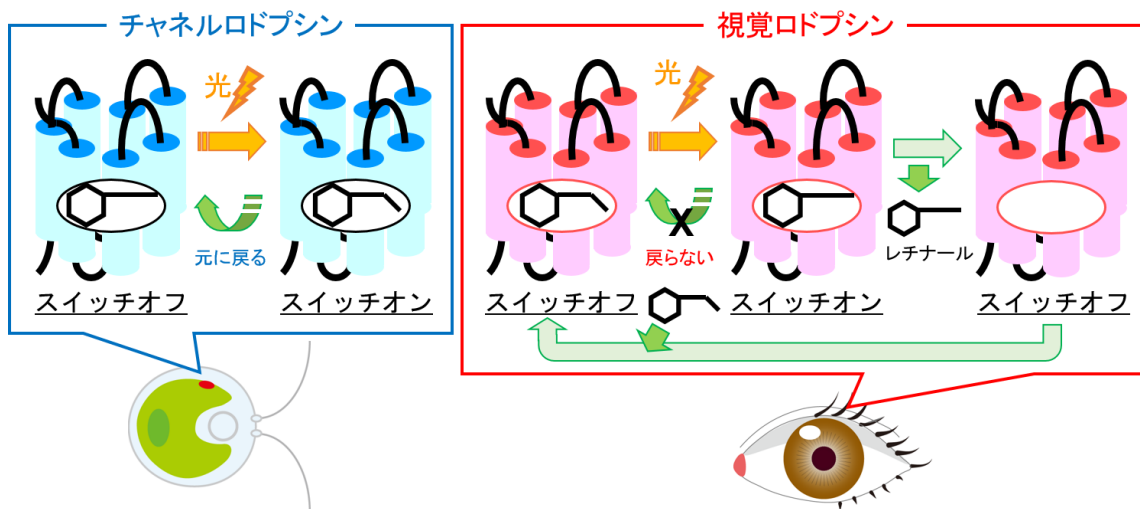


図1：チャンネルロドプシンと視覚ロドプシンの比較 クラミドモナスから見出されたチャンネルロドプシンは光でスイッチオンした後、レチナールを離さずに自発的にスイッチオフします。一方、視覚ロドプシンは光でスイッチオンした後、レチナールを離してスイッチオフし、新たなレチナールを取り込むことで次の光に対応します。

2. 研究手法・成果

私たちは、視覚ロドプシンを光操作ツールとして利用する際の問題点を克服することを考えました。チャンネルロドプシンが光操作ツールとして優れている点はいくつかありますが、その中に、光刺激で活性化（スイッチオン）した後、レチナールを離すことなく自発的に元に戻る（スイッチオフする）ことができる光サイクル

特性がありました（図1）。この特性により、光を使って短時間のスイッチオンを繰り返し引き起こすことができます。そこで、視覚ロドプシンにアミノ酸変異を加えることでチャンネルロドプシンと同様に光でスイッチオンした後に自発的に元に戻ってスイッチオフするものを作製しようと試みました。その過程で参考にしたのが、私たちが以前に発見していた視覚ロドプシンとは別のオプシンでした。このオプシン（Opn5L1^{*3}）は、動物が持つオプシンの中で唯一光サイクル特性を有するもので、その光サイクル特性をもたらす重要なアミノ酸残基も既に見出していました。そこで、視覚ロドプシンに対してこの重要なアミノ酸残基を導入したところ、光でスイッチオンした後に自発的に元に戻りスイッチオフする光サイクル特性を持たせることができました。さらに別の変異を導入すると、自発的にスイッチオフする時間を変えられることも分かりました。そして、実際にヒト由来の細胞を用いて実験を行ったところ、この改変型視覚ロドプシンは、細胞内の cAMP 濃度を光で一過的に減少させた後、短時間で元の濃度レベルに戻すことが確認できました（図2）。一過的な濃度減少のおかげで、短時間のうちに繰り返しの光刺激で濃度変化を導くことができます。つまり、ここで作製した光センサータンパク質は、cAMP 濃度変化を短時間で一過的に起こさせる新たな分子ツールとして利用できます。

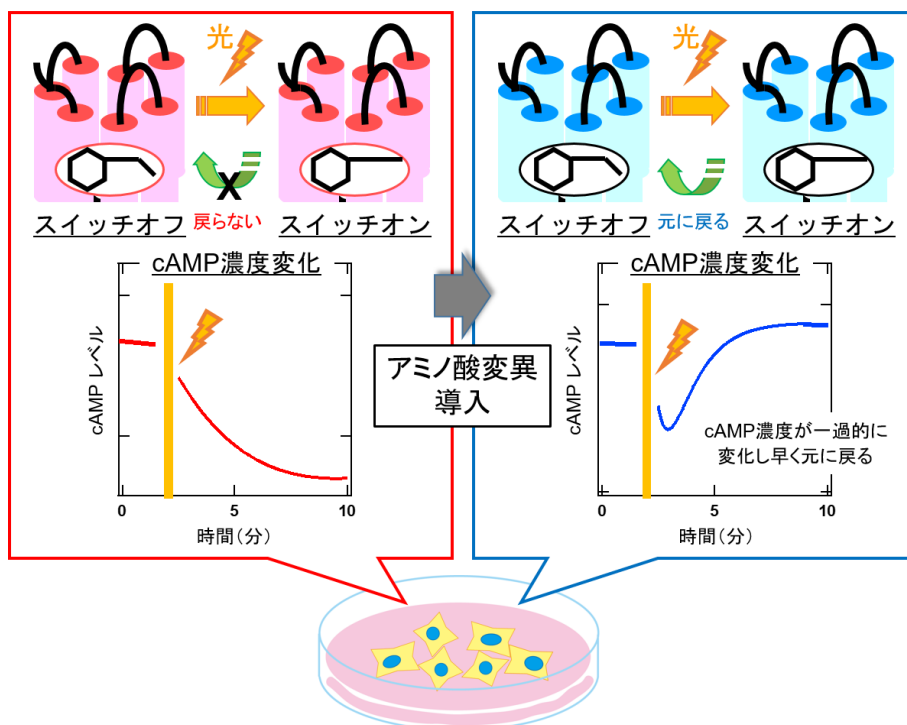


図2：改変型視覚ロドプシンによる cAMP 濃度変化 視覚ロドプシン（左）はヒト由来の細胞で cAMP 濃度を減少させることができますが、比較的長時間その減少が続きます。一方、改変型視覚ロドプシン（右）は cAMP 濃度を一過的に減少させた後、短時間で元に戻ります。そのため、短時間のうちに繰り返しの光刺激で濃度変化を導くことができます。

3. 波及効果、今後の予定

動物は、周りの光環境の変化から様々な情報を入手して、活動に利用しています。私たちは、このような動物が光情報を利用する巧みな仕組みを解明する研究を行っています。そのような研究を行っているとき、光センサータンパク質であるオプシンの性質をうまく変化させて光情報の入手に役立てていることに驚かされることがあります。本研究は、あるオプシン（Opn5L1）が光サイクル特性を持つことにつながった自然界の進化の仕組みを利用して、別のオプシンである視覚ロドプシンを人工的に進化させたことにより達成されました。

自然界には様々な性質をもつオプシンが見つっています。それらの仕組みを知ることにより、自然に倣ってさらに役立つ分子ツールの作製につながれると期待します。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 (CREST)「光の特性を活用した生命機能の時空間制御技術の開発と応用」(JPMJCR1753)、文部科学省科学研究費補助金 (16H02515、16K07437、19K21848)、公益財団法人武田科学振興財団、京都大学教育研究振興財団の支援を受けて行われました。

<用語解説>

*¹チャンネルロドプシン：クラミドモナスから見出された光センサータンパク質で、光を受けると陽イオンを透過します。動物の視覚ロドプシンとはレチナールを持つことが共通します。ただ、視覚ロドプシンとチャンネルロドプシンにはアミノ酸配列の類似性はなく、光センサータンパク質としての分子機能も異なります。

*²視覚ロドプシン：視覚ロドプシンは、光を受けてスイッチオン（活性化）した後、レチナールを一旦離してスイッチオフの状態になります。そして、新たなレチナールを取り込むことで次の光に対応します。眼の中では、常に新たなレチナールの供給を受けることで視覚ロドプシンの機能が維持されます。

*³Opn5L1：Opn5L1 は光を受けるとスイッチオン（活性化）ではなくスイッチオフ（不活性化）します。その後レチナールを離すことなく保持し、自発的に元の状態に戻る光サイクル特性を有します。このような光サイクル特性を有する動物のオプシンは他には見つかりません。詳細は以下の URL のプレスリリースをご覧ください。 <https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2018-04-02-1>

<研究者のコメント>

動物の視覚に関する研究は長い歴史があり、ロドプシンも 100 年以上前からその存在が報告されています。一方、オプトジェネティクスはここ 10 年余りで急速に広がってきた技術です。19 世紀から続く研究が 21 世紀の研究と融合することで新たに進展し、さらにそれが多様な生命現象の理解に役立てられる可能性があることに、連綿と続く基礎研究の重要性を再認識します。(山下高廣)

<論文タイトルと著者>

タイトル：Creation of photocyclic vertebrate rhodopsin by single amino acid substitution

(脊椎動物の視覚ロドプシンを 1 アミノ酸置換で光サイクル型に改変する)

著者：Kazumi Sakai, Yoshinori Shichida, Yasushi Imamoto, Takahiro Yamashita

掲載誌：eLife DOI：10.7554/eLife.75979