

研 究 報 告 書

「新規光受容タンパク質が先導する新しいオプトジェネティクス」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 12 月～2019 年 3 月

研 究 者: 井上 圭一

1. 研究のねらい

オプトジェネティクスは遺伝学的に生体内に光受容タンパク質を導入し、それらを介することで、光によってニューロンの神経活動などの生理機能を制御する技術であり、近年神経生理学分野を中心に高い注目を浴びており、視覚再生などの疾患治療にもその応用が期待されている。その中でも最も広範に用いられているのが、光によって細胞へのイオンの流入を制御する、光受容型膜タンパク質である微生物型ロドプシンである。しかし現在オプトジェネティクスで光操作ツールとして用いられているロドプシンは限られた機能やイオン選択性、イオン輸送量、吸収波長などにおいて問題点が指摘されており、分子機能の大きな改良が望まれている。

それに対して本研究では既存のロドプシン分子に対してアミノ酸変異導入などを中心に分子改変を行うと共に、新たに新奇機能を有するロドプシンを広範な生物種のゲノムデータから探索することで、これまでにないタイプのイオン輸送を行う分子や、より厳密なイオン選択性、高いイオン輸送能、さらには細胞毒性が低い操作が可能な長波長に吸収域を持つ、既存のものを多く凌駕した性能を持つ光分子ツールを実現することを目的とする。そしてそのもととなるロドプシン遺伝子群についてはNCBIなどの公的データベースや独自に獲得したものを合わせて 5,000 種類以上を同定済みである。これらについて、特異なアミノ酸配列を持つものに着目して、新奇機能性分子の探索を実施する。それに加え実験的な知見だけでは困難である吸収波長制御について量子化学計算や機械学習法など、計算科学および情報科学的アプローチを総合的に取り入れることで、オプトジェネティクスツールの吸収波長の多様化に向けた知見を集める。そしてそれらの知見をもとに、さらに野生型分子に対して分光計測や構造解析によって輸送メカニズムや分子構造をより詳細に理解し、それをもとに機能向上に有用であると期待されるアミノ酸変異を行うことで、論理的な新奇分子ツール開発に挑む。

以上のように、本研究では我々独自のロドプシンライブラリーとこれまでにない総合的なアプローチを組み合わせ得ることで、既存のロドプシンでは達成できなかった、理想的な性能を持つオプトジェネティクスツールの開発に挑むことを主たる目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では「井上らがこれまでに構築した 70 種類におよぶ微生物型ロドプシンライブラリーに含まれる分子に対して、アミノ酸変異などを行うことで高機能分子の創出を目指す」(研究テーマ A)、または「自然界に存在する過去に研究例がない分子に対して、新たに機能解析を行うことでより高機能もしくは新機能を有する分子を明らかにする」(研究テーマ B) の二つのアプローチを取ることで、既存のオプトジェネティクスツールを大きく凌駕した機能を有するロドプシ

ン分子の実現を目指した。

その結果まず前者の研究テーマにおいては井上らが独自に発見した Na^+ ポンプ型ロドプシンの輸送経路上にアミノ酸変異を導入することで、初めて Cs^+ や Ca^{2+} の輸送が可能なロドプシンの作製に成功した。これらは光のエネルギーを用いた環境中からの放射性 Cs^+ の回収や、神経伝達や筋収縮、細胞分裂など、広範な生体現象の操作に向けた基盤ツールとなることが期待される。また新たに機械学習法を応用することで、アミノ酸配列上のそれぞれの残基が発色団レチナールの吸収波長にどれだけ影響するかを定量的に評価し、一次配列情報のみから $\pm 7.8 \text{ nm}$ の精度で絶対吸収波長の予測が可能なアルゴリズムの開発に成功した。これにより既存のロドプシンにレチナールの長波長化が予想されるアミノ酸変異を導入することで、低侵襲かつ高い組織透過率を示す赤色～近赤外域での光操作が可能な分子設計が大きく効率化されると期待される。

一方後者の研究テーマにおいては、これまでに構築した広範な生物種が持つロドプシン遺伝子のデータベースから、新奇なアミノ酸配列を持つ分子に着目してその機能測定を行った。その結果既存のチャンネル型ロドプシンより大きなイオン輸送能を持ち、さらに光による輸送量の減弱(不活化)がない分子(GtCCR4)や、自然界で初めての内向きに H^+ を輸送する内向きプロトンポンプ型ロドプシン(PoXeR)が見出された。これらの分子は今後より高感度の生体光操作や、細胞内小器官の光による pH 制御などへの応用が期待される。またさらに既存のいずれのロドプシンとも大きく配列の異なるロドプシン(ヘリオロドプシン、 HeR)を見出した。 HeR は既存のロドプシンと比べてタンパク質分子の膜内配向が逆転し、また光を照射してもイオンを輸送しないことから、これまでのものとは全く異なる機能を有すると考えられる。これは生物の光利用戦略について新たな知見を与えるだけでなく、分子機能が今後解明された暁には、それをもとにした新たな生体光操作技術の創出につながると期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A「新規イオン輸送型ロドプシンの開発」

本研究では井上らが独自に発見した Na^+ ポンプ型ロドプシンについてアミノ酸変異を行うことで、これまでにないイオン輸送性能を持った新規ロドプシン分子の実現を目指した。これに際し、タンパク質の細胞質側表面に Na^+ の取入口であると思われるボトルネック構造が存在することに着目し、この部分に存在するアミノ酸について変異体スクリーニングを行ったところ、アルカリ金属で最大のイオン半径を有する Cs^+ まで輸送可能な分子の作製に成功した(図 1、

Konno et al., *J. Phys. Chem. Lett.* (2016))。 Cs^+ は福島原発の事故以降環境中や人体中の蓄積がしばしば問題とされるイオンであり、このロドプシンを用いて選択的に光のエネルギーで輸送し、膜小胞などに封入して回収することができれば、環境保全や医学応用などに重要な新規技術開発につながることが期待される。

またさらに Na^+ ポンプ型ロドプシンは発色団レチナール付近にイオン結合サイトが存在して

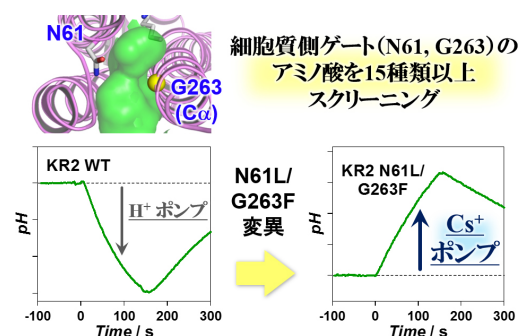


図 1. イオン輸送経路のアミノ酸変異によって作製された、 Cs^+ ポンプ型ロドプシン

いることが過去の研究で明らかとしているが、この付近のアミノ酸の電荷バランスを変えることで、異なる価数のイオンの結合が可能になると予想される。そこで Na^+ 結合サイトを形成するアミノ酸の一つである Asn112 を、側鎖構造はほとんど同じで負に帯電したアスパラギン酸へ変異したところ、二価カチオンである Ca^{2+} の輸送が確認された。 Ca^{2+} は神経伝達や筋収縮、細胞分裂など、あらゆる生体現象に関わるイオンであり、今後この Ca^{2+} ポンプ型ロドプシンを用いることで、従来神経活動操作にのみ限定されていた、オプトジェネティクスによる光操作の応用対象が大きく拡大されると考えられる(論文準備中)。

一方、既存のロドプシンの多くは 450~560 nm 付近に吸収極大を有するため、オプトジェネティクスツールとして利用するには、これらの波長域に応じた励起光を用いる必要がある。しかしこの場合、脳などの生体組織の高い散乱性により 2 mm 以上の深部にある組織の操作は困難であり、また比較的高いエネルギーを持った光子が多数のラジカル種を生成してしまい、生体ダメージを引きおこすという問題点がある。従って既存のロドプシンの吸収波長を長波長化することで、これらの問題を解決することが臨まれているが、変異体作製や、構造解析、量子化学計算など従来のアプローチでは大きなコストが必要となり、機能向上の低コスト・ハイスループットが求められている。そこで本研究では新たにこれまで井上らが文献調査や独自の実験などで蓄積した、およそ 800 種類のロドプシン分子のアミノ酸配列と吸収波長のデータベースに対して、機械学習法を応用することで、レチナールの吸収波長に各位置のアミノ酸が与える影響を定量化することに成功した。これによりアミノ酸一次配列のみから ± 7.8 nm の精度でロドプシンの吸収波長予測が可能である事が示され (Karasuyama, Inoue et al. *Nature* (2016))、今後この技術を活用することでこれまでにない長波長変異体の作製や、野生型ロドプシンのスクリーニング効率の大幅な向上が期待される。

研究テーマ B「新規機能性ロドプシン遺伝子探索」

本研究課題では自然界に存在し、より応用に適した輸送機能を持つロドプシンの探索を行った。その際、まずはオプトジェネティクスツールで最も注目度の高い分子である、カチオンチャネルについて微生物の遺伝子データベースを探索したところ、クリプト藻類がこれまでの緑藻などが持つものと、進化的に異なるタイプのチャネル型ロドプシン (CCR) 持つことが明らかとなった。そこで新たにその機能を評価したところクリプト藻の一種である *Guillardia theta* の持つロドプシン (GtCCR4) が従来のチャネル型ロドプシンよりも数倍大きなイオン輸送能を持つことが明らかとなった(図 2)。またさらに既存のチャネル型ロドプシンは光を照射し続けると電流量が減弱する「不活化」と呼ばれる現象を示すが、GtCCR4 はほぼ一定の電流を示し、不活化が起こらないことが明らかとなった(Yamauchi et al. *Biophys. Physicobiol.* (2017))。この結果は GtCCR4 がより応用に適した分子であることを示唆しており、今後さらに生体応用に向けた研究を実施していく。

また深海性の細菌である *Parvularcula oceani* のゲノムに存在する、新奇配列を持ったロド

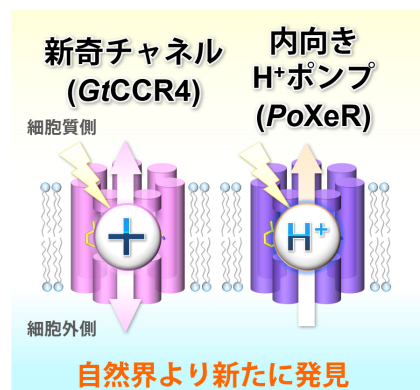


図 2. 本研究で新たに発見した新奇チャネルロドプシン (GtCCR4) と内向き H^+ ポンプ型ロドプシン

プシン (PoXeR) について機能解析を行ったところ、これまでに自然界では見られていなかった、内向きプロトンポンプ機能を有することが示された(図 2) (Inoue et al. *Nature Commun.* (2016)、5. 主な研究成果リスト(1)–3)。これまで細胞外へ H^+ を排出する外向き H^+ ポンプ型ロドプシンは数多く見出されているが、PoXeR は光で細胞内へ H^+ を輸送できる初めての分子であり、リソソームやシナプス小胞などの細胞小器官内の pH を制御する新たな分子ツールとしての応用が期待される。その目的のためさらに PoXeR の輸送メカニズムを分光学的に調べ、それによって明らかとされた H^+ 輸送経路上のアミノ酸を変位することで、野生型より3倍程度輸送活性の高い分子の作製に成功しており、今後この分子を細胞内小器官に発現させることで、実際に小器官内の pH の光制御が可能かを検証する。

そしてこれら新奇分子探索において、これまでの既存のどのロドプシンともアミノ酸配列が大きく異なる(アミノ酸一致度 < 15%) 分子を同定し、ヘリオロドプシン (HeR) と名付けた。興味深いことに HeR は既存のロドプシンとタンパク質の分子配向が逆転した極めて新奇な特徴を持つ(図 3、Pushkarev and Inoue et al. *Nature* (2016)、同(1)–5)。また HeR はイオンの輸送を示さないことから、これまでのロドプシンと異なる機能を持つと考えられるが、それについては今後解明を目指す。そしてさらにその機能を応用することで、全く新しいタイプの光操作技術の創出につながると期待される。

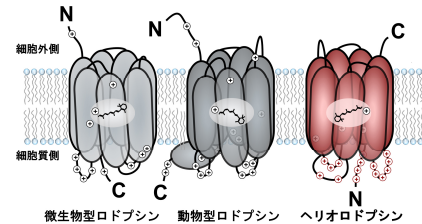


図 3. 既存の微生物型および動物型ロドプシンと本研究で新たに見出されたヘリオロドプシン (HeR)

3. 今後の展開

本研究では Cs^+ や Ca^{2+} などを輸送することが可能な新たなロドプシンのほか、高機能性チャネルロドプシンや内向きプロトンポンプ型ロドプシンを得ることに成功した。今後は実際にこれらの分子を神経細胞や生体に導入することで、オプトジェネティクスツールとして十分に実用に資するかどうかを検討する。またさらに本研究で作製した機械学習法や量子化学計算技術と組み合わせることで、吸収波長のさらなる長波長化にも取組み、既存のものを大きく凌駕する分子ツールの実現を目指す。

そしてそれにより十分に医療転用が可能な性能を有することが実証された分子については、iPS 細胞など再生医療技術や遺伝子のウイルス導入技術などと組み合わせることで、網膜再生や神経疾患治療などへの応用を展開する。

4. 自己評価

①研究目的の達成状況

本研究では研究期間内に、 Cs^+ ポンプ、 Ca^{2+} ポンプ、高輸送性チャネル、内向き H^+ ポンプなど数多くの新規な分子の創出および発見に成功した。またさらなる分子改良に向けた機械学習法の開発を実施し、今後より理想的な分子ツールをデザインする上で重要となる技術的基盤の構築を行った。またさらに既存のロドプシンと大きく異なる性質を持った HeR について、生物の光利用戦略について基礎生物学的に大きな知見を与えるのみでなく、現在未解明のその機能を明らかにすることで、これまでにない生体光操作へとつながることが大いに期待される。これらのことから研究目的で求められる要件について、本研究では十分な結果を達成したとい

える。

②研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本研究では研究代表者の井上および学生による実験研究を中心に、さらにメタゲノミクスや分子構造解析、量子化学計算、機械学習法などを専門とする国内外の数多くの研究者と共同研究体制を構築することによって、新規分子ツール開発に向け包括的なアプローチのもと、極めてハイスループットな研究の実施を達成した。また研究費についてもナノ秒パルスレーザーや赤外量子カスケードレーザーを順次導入することで、分子の反応素過程について数多くの知見を得ることに成功し、研究期間内で 25 報の原著論文としてその成果を発表した。

③研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果、領域独自の評価項目

本研究で見出された新規ロドプシンの多くが既存のオプトジェネティクスツールにはない高機能・新機能を有しており、今後のオプトジェネティクス技術の開発に向けて新たな技術要素的基盤をもたらすものである。またさらにそれをもとに視覚再生や光による疾患治療などの医療応用への大きな波及効果が期待される。特に HeR については既存のロドプシンと全く異なった存在であることから、今後基礎生物学的にも応用研究的にも数多くの知見を与えると予想される。

④異分野との交流他による新たな研究ネットワークの構築

本研究ではロドプシンの分子探索・分子開発を通じて、先端的分光計測、メタゲノム解析、分子構造解析、量子化学計算、人工知能開発などの異分野間での研究者ネットワークを構築することに成功し、今後はそれをもとにした新たな研究領域の開拓が期待させる。

⑤新たな視点や発想の創出、もしくは創出への貢献)

本研究のアプローチ A では、分子構造や分光学的な知見をもとにロドプシンのイオン輸送経路を明らかにすることで、それをもとにした論理的な分子改変に基づき、新規機能性分子の開発が可能であることを示した。この観点でのアプローチについて、今後さらに量子化学計算や機械学習法などの知見を総合的に取り入れることで、より効率的な分子ツールの開発につながると期待される。

また高機能性チャネルや内向きプロトンポンプの発見は、膜タンパク質による新たなイオン輸送モデルを与えるだけでなく、HeR の発見は極めて新規な光生物学的視点の創出につながると期待され、これらについて本研究の成果は大きな貢献を果たしたといえる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. **Inoue** et al. Asymmetric Functional Conversion of Eubacterial Light-driven Ion Pumps. *J. Biol. Chem.* (2016) **291**, issue 19, pp 9883–9893 (Selected for “Highlights of 2016” in the Journal)

2. Inoue et al. Natural Light-driven Inward Proton Pump. *Nature Communications*, (2016) 7, Article number:13415
3. Inoue et al. Spectroscopic Study of Proton Transfer Mechanism of Inward Proton Pump Rhodopsin, *Parvularcula oceani* Xenorhodopsin. *The Journal of Physical Chemistry B* (2018) 122 (25), pp 6453–6461
4. Karasuyama[†], Inoue[†] et al. Understanding Colour Tuning Rules and Predicting Absorption Wavelengths of Microbial Rhodopsins by Data-Driven Machine-Learning Approach. *Scientific Reports* (2018) 8, Article number:15580 (†: Equally contributed)
5. Pushkarev[†], Inoue[†] et al. A Distinct Abundant Group of Microbial Rhodopsins Discovered via Functional Metagenomics. *Nature* (2018) 558 (7711), pp. 595–599 (†: Equally contributed)

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

1.

発 明 者: 神取秀樹、井上圭一
 発明の名称: プロトンポンプおよびその利用
 出 願 人: 国立大学法人名古屋工業大学
 出 願 日: 2016/9/6
 出 願 番 号: 特願 2016-173556

(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)

国内会議受賞講演(3件)

1. 光受容膜タンパク質ロドプシンの光化学の基礎研究と応用
井上圭一 日本化学会第 96 春季年会(2016)・進歩賞受賞講演 2016 年 3 月 24 日 京田辺
2. 光駆動ナトリウムポンプロドプシンのイオン輸送メカニズムの解明と新規機能性分子創成
井上圭一 第 10 回分子科学討論会・奨励賞受賞講演 2016 年 9 月 15 日 神戸
3. 物理化学的アプローチによる新奇光駆動型 Na^+/H^+ ハイブリッドポンプロドプシンの研究
井上圭一 第 20 回日本光生物学協会年会 2018 年 8 月 8–9 日 京都

国際会議招待講演(11件)

1. Light-driven sodium pump rhodopsin and its transport mechanism
Keiichi Inoue, OWLS (Optics Within Life Sciences) 2016, March 18, 2016, Mumbai, India
2. Spectroscopic study on the ion-transport mechanism of eubacterial light-driven ion pumps
Keiichi Inoue, Satellite Symposium of the Retinal Protein Conference 2016 on the Molecular Reaction Mechanism of Retinal Proteins, October 2, 2016, Potsdam, Germany
3. Microbial rhodopsins: New types of machinery from marine bacteria

Keiichi Inoue, IMS Asian International Symposium “Japan–China Joint Interdisciplinary Symposium on Coordination–based Hybrid Materials”, June 25, 2017, Okazaki, Japan

4. Microbial rhodopsins: New types of machinery from marine bacteria

Keiichi Inoue, VI International Symposium Topical Problems of Biophotonics – 2017, July 30, 2017, St. Petersburg – Nizhny Novgorod, Russia

5. Biophysical study on heliorhodopsin

Keiichi Inoue, 18th International Conference on Retinal Proteins September 26, 2018, Ontario, Canada

他5件

国内会議招待講演(22件)

1. 光駆動イオンポンプ・微生物型ロドプシンのイオン輸送メカニズム

井上圭一, 第 89 回日本生化学会大会・シンポジウム「膜輸送体学の「温故知新」～長年の謎の解明をめざして」 2016 年 9 月 27 日 仙台（招待講演）

2. 新規微生物型ロドプシンを用いたオプトジェネティクス技術基盤開発

井上圭一, 第 39 回日本分子生物学会年会・シンポジウム「バイオイメーキングの技術躍進と医学生物学への応用最前線」 2016 年 12 月 1 日 横浜

3. タンパク質の動的構造研究とミュオン科学の融合に向けて

井上圭一 日本物理学会第 72 回年次大会(2017 年) 2017 年 3 月 19 日 豊中

4. イオンの輸送を決定するロドプシタンパク質の柔らかさ

井上圭一, 第 66 回高分子討論会 2017 年 9 月 20–22 日(講演:2017 年 9 月 22 日) 松山

5. 新奇微生物型ロドプシン探索が拓く新たなオプトジェネティクス

井上圭一, 日本学術振興会光ネットワークシステム技術第 171 委員会・第 63 回研究会「生命ネットワーク・細胞操作と光技術」 2018 年 2 月 23 日 東京

他17件

受賞

1. 日本化学会平成 27 年度進歩賞

2. 26th IUPAC International Symposium on Photochemistry, Awards for excellent presentations: Young researcher oral presentation awards, Photochemical & Photobiological Sciences



3. 平成 28 年度 名古屋工業大学 職員褒賞制度に基づく褒賞・優秀賞

4. 第 4 回日本光生物学協会奨励賞

著作(1件)

1. 光と生命の事典「キサントロドプシン」、日本光生物学協会・光と生命の事典編集委員会編集、(2016)、pp 60-61

新聞報道(2件)

1. 平成 30 年 6 月 21 日 中日新聞 3 面 「光認識のタンパク質 ロドプシン新種発見 名工大など」
2. 平成 28 年 3 月 10 日 化学工業日報 5 面 「感光分子 イオン運搬機能を転換 名古屋工大 医療分野に応用」