

# 研究報告書

## 「新規酵素型ロドプシンを用いた視覚再生の挑戦」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 角田 聡

### 1. 研究のねらい

チャンネルロドプシン2(ChR2)等の光感受性イオンチャンネルを応用した神経活動の光操作技術開発によって、中枢神経をはじめとする神経回路の光操作法が確立され、生命機能の理解、解明に大きく貢献してきた。本研究では光遺伝学の新規ツールとなりうる酵素活性をもつ新たな光感受性分子の開発を行い、オプトジェネティクス(光遺伝学)のボトムアップを目指す。チャンネルロドプシンによる光操作では、細胞膜内外のイオン流入によって膜電位の「脱分極」、「過分極」を制御しているが、本研究では細胞内のサイクリックヌクレオチド(cAMP、cMP)の環境を光により抑制することでシグナル伝達を高い時空間精度で阻害するための新たな手法を確立する。cAMPやcGMPは細胞内シグナル情報伝達物質であり、細胞内で働くさまざまな生体分子機能を調節している。例えば平滑筋の収縮や網膜視細胞の光情報伝達、嗅覚情報伝達などが挙げられる。サイクリックヌクレオチドは細胞内において必要に応じてシクラーゼ(Cyclase)により合成され、フォスフォジエステラーゼ(Phosphodiesterase、PDE)により分解されることで、細胞内での濃度が変動する。

サイクリックヌクレオチドの光操作を実現するために、本研究では襟鞭毛虫ゲノム中に見つかったロドプシン-フォスフォジエステラーゼ(Rh-PDE)の分子物性の解析を行う。Rh-PDEの分子機能を生化学的、分光学的手法により解析することで分子機構理解を目指す。まずは新規分子であるRh-PDEが光依存的なフォスフォジエステラーゼ活性を示すかを*in vitro*における酵素活性測定によって検証する。その後、過渡吸収分光法、フーリエ変換赤外分光法等を用い分子解析を行う。得られた知見をもとに改変体分子の開発を試みる。基質特異性、吸収波長特性、酵素活性の異なる改変体Rh-PDEの開発を行う。

さらにはこの新規光遺伝学ツールであるRh-PDEの応用性についても検証を行う。ここでは視覚機能再生のためのオプトジェネティクス実験を試みる。網膜変性モデルマウスの視細胞にRh-PDEを導入し、光感受機能が回復するかを電気生理学的手法や動物行動実験によって検証する。オプトジェネティクスを用いた今までにない高感度でより生理条件に近い視覚再生に向けた基盤技術形成が狙いである。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

襟鞭毛虫ゲノム解析から発見された新規酵素型ロドプシンは光スイッチ型フォスフォジエステラーゼ(Rh-PDE)として機能すると期待された。本研究では 1)分子機能の解明、2)光スイッチとしての性能評価、3)視覚再生への応用の3つのテーマを設定した。

#### 1)分子機能の解明

Rh-PDE 遺伝子を HEK293 細胞に発現させ細胞膜から可溶化後、タンパク精製を試みた。

得られた標品の分光学的測定により光吸収特性等の物性を調べた。レーザーフラッシュフォトリス法により光反応サイクルを測定し、反応中間体を同定後、サイクルの時定数を決定した。さらに、FTIR 法を用いることで光照射前後のタンパク質骨格の構造変化を検出した。このようにいくつかの分光法を駆使してこのタンパク質分子の基本的物性を解明した。また HPLC を用いた生化学的手法により *in vitro* における光依存的 PDE 活性 (cAMP、cGMP 加水分解活性) を測定することで、Rh-PDE は cGMP に対する特異性が高いことを見出した。また、暗状態においても PDE の恒成活性が存在した。さらに、cAMP、cGMP の加水分解活性は非対称的な pH 依存性を示したことから、タンパク質中の His 残基が基質選択性に寄与することを提唱した。

さらに、2019 年に発見された 8 種の新規 Rh-PDE についても機能解析を試みた。

## 2) 光スイッチとしての性能評価

哺乳類培養細胞である HEK293 細胞へ Rh-PDE を導入し、発光アッセイ (Glo-sensor assay) による光依存的な細胞内サイクリックヌクレオチド濃度減少を測定した。一方、cGMP 濃度の光操作は、Rh-PDE の恒成活性により検出することができなかった。

## 3) 視覚再生への応用

まず Rh-PDE 遺伝子のマウス視細胞への発現を試みる。Rh-PDE 発現用のアデノ随伴ウイルスベクター (7M8 ベクター) を作成し、網膜下注射によって網膜変性モデルマウス (rd1 マウス) 視細胞への遺伝子導入を行った。また対照実験用にチャンネルロドプシン遺伝子を組み込んだウイルスベクターも作成した。

視細胞への安定的な発現が達成された後、電気生理学的手法により視細胞の visual evoked potential (VEP) を計測することで光応答性を検証した。

## (2) 詳細

### 1) 分子機能の解明

精製 Rh-PDE タンパク質を用いた分光計測により、その吸収極大波長が 492 nm であり、光照射後その波長は 392 nm へシフトしたことから、M 中間体を形成し光サイクル反応を検出することを試みた。Rh-PDE の全長タンパク質、および膜貫通ドメインのみの精製タンパク質を用いて、紫外可視領域の過渡吸収分光測定を行い、それぞれのタンパク質の光反応サイクルを測定した (図 1) (論文 3)。全長タンパク質 (図 1A-C) および膜貫通ドメイン (図 1D-F) はいずれもほぼ同様の光反応サイクルを示し

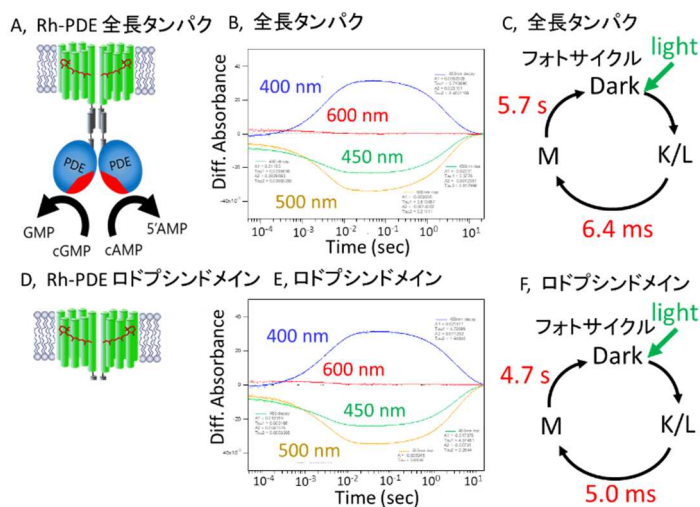


図 1、過渡吸収分光測定

た。光吸収に伴い K/L 中間体形成後、レチナルが脱プロトン化した M 中間体を経て始状態に戻ることが判明した。それぞれの中間体形成、減衰の時定数も酵素ドメインの有無にかかわらずほぼ同様であった。

次に、フーリエ変換赤外分光法 (FTIR 法) により膜貫通ドメインタンパク質の測定を行い、K 中間体、M 中間体でのスペクトルを得た (図 2) (論文 3)。このスペクトル解析により、all-*trans* 型レチナルから 13-*cis* 型レチナルへの異性化が観察された。K 中間体形成時にはシフベースの水素結合強度が増加したが、これはバクテリオロドプシン等のポンプ型ロドプシンでは観察されない特徴である。また、M 中間体の形成に伴いアルファヘリックスの再配置が観測されたことから、この構造変化が酵素ドメインへのシグナル伝播に重要であると結論付けた (図 3)。

*in vitro* における光依存的 PDE 活性 (cAMP、cGMP 加水分解活性) の結果を図 4 に示す (論文 1)。cAMP、cGMP 両方に対する加水分解活性を示すが、cGMP の分解活性が cAMP のおよそ 10

倍であることから、Rh-PDE は cGMP への高い特異性をもつことが示唆された。また、暗状態 (dark) においても活性を示すことが分かった。加水分解活性の pH 依存性は cAMP と cGMP において非対称な挙動を示したことから、中性 pH 付近に pKa を持つヒスチジン残基が基質認識に寄与していることが示唆された (図 5) (投稿準備中)。

2019 年には 8 種の新規 Rh-PDE 遺伝子が同定されたため、それらの機能検証を行った (図 6)。既存の Rh-PDE

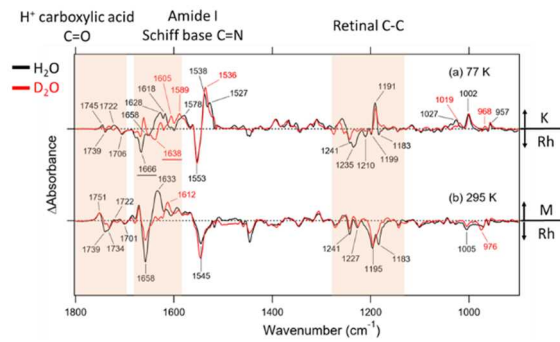


図2、FTIRスペクトル (a) K中間体と始状態との差スペクトル (b) M中間体と始状態との差スペクトル

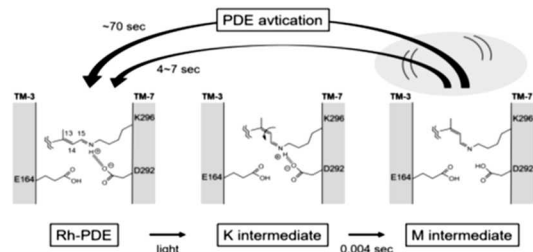


図3 光反応サイクルに伴うタンパク質内部の構造変化モデル

A, Rh-PDE 1D4 tag 付き

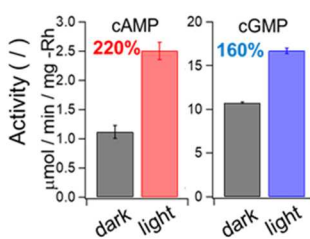


図4、Rh-PDEによるcAMP、cGMPの加水分解活性

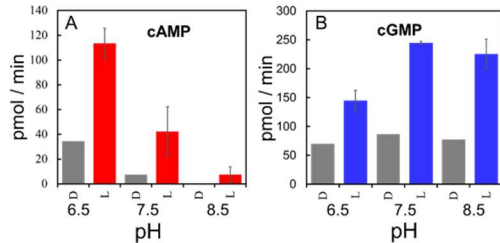


図5、Rh-PDE における活性のpH依存性

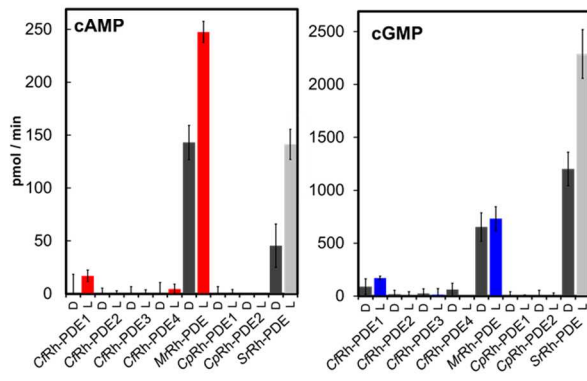


図6、8種の新規Rh-PDEの活性比較

(SrRh-PDE)と比較して *Microstomoeca roanoka* 由来 Rh-PDE (MrRh-PDE) は cAMP に対する高い基質特異性を示すことが判明した (Sugiura et al. 印刷中)。その他の分子については著しく低い機能のみが検出された。

以上のように分子機能については分光学的解析、生化学的解析により詳細な検証を行った。

## 2) 光スイッチとしての性能評価

HEK293 細胞へ Rh-PDE を導入し、発光アッセイ (Glo-sensor assay) による光依存的な細胞内サイクリクヌクレオチド濃度減少を検出し、光操作ツールとしての有用性を示した (図 7A) (論文

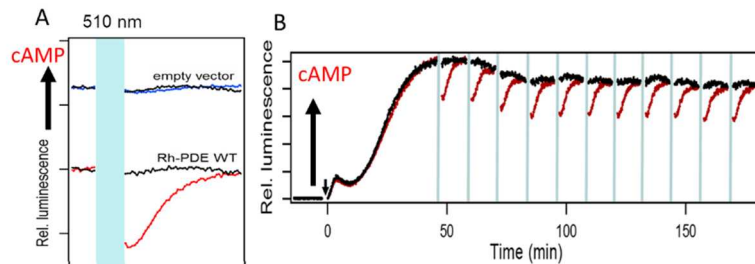


図7. Glo-sensor assayによる細胞内cAMP濃度の測定  
A, Rh-PDE発現細胞へ光照射時のみcAMP濃度の低下が観察された。B, 繰り返しの光刺激。

1)。また、cAMP 濃度については繰り返しの操作が可能であり、この反応が可逆であることを示した (図 7B)。一方、cGMP 濃度の光操作は、Rh-PDE の恒成活性により検出することができなかった。

## 3) 視覚再生への応用

Rh-PDE 発現用のアデノ随伴ウイルスベクター (7M8 ベクター) を井上謙一博士 (京大、霊長研) の協力により作成し、網膜下注射によって網膜変性モデルマウス (rd1 マウス) の網膜へ遺伝子導入を行った (上野真司博士 (名大、医学部) の協力による)。

## 3. 今後の展開

現在までに、Rh-PDE の分子機構を生化学的手法、分光学的手法により解明しつつある。今後は変異体や新規 Rh-PDE との機能比較を通して、さらに詳細な分子メカニズム解明を目指す。また、視覚再生への応用実験に関しても実験系がほぼ確立しつつある。今後はより詳細な計測を行うことでオプトジェネティクスツールとしての有用性を検証する。

## 4. 自己評価

本研究開始当初、以下の3つの研究テーマを掲げた。

### 1) 分子機能の解明、2) 光スイッチとしての性能評価、3) 視覚再生への応用

1) については、当初の計画通り生化学的手法や分光学的手法によりその分子機能解析を行い、計画通りの研究を遂行し十分な目標を達成した。さらに、2019年に発見された新規酵素型ロドプシンについてもその機能を検証することができたことから、予想以上の成果を得た。本研究を礎として、将来的にはさらに広がりつつある酵素型ロドプシンファミリータンパク質の分子機構解明がなされると期待される。

2) についても、哺乳類細胞において細胞内 cAMP の光操作を実証した。従っておおむね目的を達成できた。しかし、cGMP の操作ツールとしてはいまだ有用性が示されておらず、今後の研究に期待される。

3)については、ウィルス作成、マウス網膜への酵素型ロドプシンの導入、電気生理学実験系がほぼ構築できた。当初の計画ではこの系を用いた視覚再生の検証まで行う予定であったが、時間的制約により最終目標に間に合わなかった。しかし、実験系は確立することができたため、引き続き視機能回復の検証を遂行する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

- |   |
|---|
| 1. Yoshida K, <u>Tsunoda SP</u> , Brown LS, Kandori H. "A unique choanoflagellate enzyme rhodopsin exhibits light-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase activity." <i>J Biol Chem.</i> <b>292</b> , 7531-7541, 2017   |
| 2. Pushkarev A, Inoue K, Larom S, Flores-Urbe J, Singh M, Konno M, Tomida S, Ito S, Nakamura R, <u>Tsunoda SP</u> , Philosof A, Sharon I, Yutin N, Koonin EV, Kandori H, B $\hat{e}$ $\grave{a}$ O. "A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics" <i>Nature</i> <b>558</b> , 595-599, 2018   |
| 3. Watari M, Ikuta T, Yamada D, Shihoya W, Yoshida K, <u>Tsunoda SP</u> , Nureki O, Kandori H. "Spectroscopic study of the transmembrane domain of a rhodopsin-phosphodiesterase fusion protein from a unicellular eukaryote." <i>J Biol Chem.</i> <b>294</b> , 3432-3443, 2019   |
| 4. S. Shigemura, S. Hososhima, H. Kandori, <u>SP. Tsunoda</u> "Ion Channel Properties of a Cation Channelrhodopsin, <i>Gt_CCR4</i> " <i>Appl. Sci.</i> <b>9</b> , 3440, 2019  |
| 5. W. Shihoya, K. Inoue, M. Singh, M. Konno, S. Hososhima, K. Yamashita, K. Ikeda, A. Higuchi, T. Izume, Okazaki S, Hashimoto M, Mizutori R, Tomida S, Yamauchi Y, Abe-Yoshizumi R, K. Katayama, <u>SP. Tsunoda</u> , M. Shibata, Y. Furutani, A. Pushkarev, O. B $\hat{e}$ $\grave{a}$ T. Uchihashi, H. Kandori, O. Nureki "Crystal structure of heliorhodopsin" <i>Nature.</i> <b>574</b> , 132-136, 2019 |

### (2)特許出願

研究期間累積件数:3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、角田聡、吉田一帆  
発明の名称: ロドプシンホスホジエステラーゼ  
出願人: 名古屋工業大学  
出願日: 2017/9/12  
出願番号: 2017-174601

2.

発明者: 重村竣太、細島頌子、角田聡、神取秀樹  
発明の名称: 光応答性タンパク質及びその利用  
出願人: 名古屋工業大学  
出願日: 2018/9/14  
出願番号: 2018-172990

### (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)

主要な学会発表等

- ・「酵素型ロドプシン：細胞内シグナル伝達を光で操る」、第 42 回日本分子生物学会年会、2019 年 12 月 3-6 日、博多
  - ・「光を使って細胞の働きを操作する技術」、JST 新技術説明会～光科学～、2019 年 10 月 18 日、東京
  - ・「酵素型ロドプシンの分子機構と光遺伝学への応用」、東京大学物性研ワークショップ「レチナールタンパク質の光機能発現の物理と科学」、2019 年 9 月 5-6 日、柏
  - ・“Enzyme rhodopsins, potential optogenetics tools for modulating intracellular cyclic-nucleotide levels” International symposium on Optobiotechnology, 2019 年 2 月、名古屋
  - ・“Enzyme rhodopsins –potential optogenetics tools for modulating intracellular cyclic-nucleotide levels –“ 18<sup>th</sup> International Conference on Retinal Proteins, September 24-29, 2018, Ontario, Canada
  - ・“Enzyme Rhodopsins –Molecular Properties of potential optogenetics tools-” 56<sup>th</sup> Annual meeting of the Biophysics society of Japan, 2018 年 9 月、岡山
- プレスリリース
- ・「光で働くホスホジエステラーゼ分子を自然界から初めて発見～新しい光遺伝学ツールとしての応用に期待～」、2017 年 3 月 21 日、  
<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20170321/index.html>