

大阪大学 大学院理学研究科 宇宙地球科学専攻

准教授 久富 修

はじめに

生物が利用するエネルギーの大半は、植物が光合成を通して生成した有機化合物に由来する。また、我々ヒトが得る情報の80%以上は視覚に由来するとも言われている。光は地球上の生命を育んできたエネルギー源であり情報源であると見なすことができる。そのため、生物は進化の過程で光を受容するための様々な分子を作り上げてきた。

近年、それらの光受容分子を利用して、脳神経回路や生物個体の行動決定機構を解析するとともに、細胞の活性を光制御しようとする試みが進められている。この研究手法は「光遺伝学(オプトジェネティクス)」と呼ばれる。今から10年程前に初めて報告されたこの研究手法は、急速に発展して様々な研究分野で用いられるようになってきた。オプトジェネティクスを概説するにあたり、まず、我々動物の網膜に存在する光受容タンパク質(視物質)の説明をしておきたい。

1. レチナールタンパク質

動物の網膜には光を受容するために特殊化した視細胞が存在している。視細胞には多層に重なりあった膜系が存在していて、その膜中に埋まる形で視物質が存在している。視物質は350個程度のアミノ酸と、発色団であるレチナールから構成されるレチナールタンパク質である。視物質が光を受容するとレチナールのシス・トランス異性化が生じ、それが引き金となって視物質の構造が変化して、GTP結合タンパク質を活性化する。それが一連の反応を経由して視細胞の電位変化を引き起こし、最終的に脳に伝えられて光として認識される。視物質の中で最もよく理解されている

のが桿体の視物質であるロドプシンである。ロドプシンは、GTP結合タンパク質共役型受容体(G-protein coupled receptor, GPCR)の中でも最も研究が進んでいるものの一つである。

現在までの研究により、レチナールタンパク質は動物以外にも様々な生物の光受容に関与することが示されている。原核生物のレチナールタンパク質には、受容した光エネルギーを利用して H^+ 、 Cl^- 、 Na^+ 等のイオンを細胞膜の電気化学ポテンシャルに逆らって移動させるイオンポンプとして働いているものが知られている。また、緑藻の一種であるクラミドモナスの走光性には、光活性化すると Na^+ などのカチオンを通過させるチャネルとして働くチャネルロドプシン(ChR-2など)が関与することが明らかにされている。

2. 光遺伝学の幕開け

このチャネルロドプシンは、神経回路の解析にブレイクスルーをもたらすことになる。一般的な神経細胞内部の電位は、 Na^+ - K^+ 交換体と K^+ チャネルの働きにより、細胞外より数十mV低い状態にある。この細胞内外の電位差が刺激により減少(脱分極)して閾値以下になると、神経細胞の膜中に存在する電位依存性 Na^+ チャネルが一過的に開き、流入した Na^+ により神経細胞内部の電位がパルス的に上昇する。この一過性の膜電位の変化は活動電位と呼ばれており、細胞膜に沿って細胞全体に伝えられる(神経細胞の興奮)。もし、神経細胞の膜中に適量のChR-2を導入して光照射すれば、脱分極が生じて神経細胞を興奮させることができるであろう。Deisserothらは、特定の神経

細胞のみで遺伝子を発現させるプロモーターとChR-2遺伝子を導入したウイルスベクターをマウスの神経組織に感染させ、神経細胞の興奮を光依存的に制御できることを2005年に報告した。さらに、2007年には、ウイルスベクターを感染させたマウスの脳内に光を照射することで、マウスの行動を光制御できることを示した。この手法では、プロモーターを変化させることで、ChR-2を異なる神経細胞種に発現させることが可能であり、それぞれの細胞種が果たす役割を高い時空間分解能で解析することができる。また、この手法は哺乳類だけでなく、ショウジョウバエの逃避行動や線虫の運動性神経の制御などにも利用できることが示されている。さらに、長波長側に波長感受性を持つCl⁻ポンプやH⁺ポンプ・タンパク質を用いて、波長依存的に神経細胞を沈静化することも可能である。現在では、マウスの光照射と行動観察のためのオプトジェネティクス解析システムが市販されているとともに、トンボの飛行を光制御してドローンとして利用しようとする試みもなされている。

3. 水溶性タンパク質の光制御

動物の光情報受容がレチナールタンパク質によって行われることに対し、植物の光情報受容ではLight-oxygen-voltage (LOV) ドメインを持つ光受容タンパク質が重要な役割を果たしている。LOVドメインは約100アミノ酸からなる水溶性領域で、発色団としてフラビンモノヌクレオチド(FMN)を保持している。LOVタンパク質の代表的なものにフォトトロピンがあり、青色光に依存した屈性、葉緑体の定位、気孔の開閉などに関与するとされている。LOVドメインが光を受けると構造変化が生じ、それが近傍の領域の構造変化やLOVドメインの二量体化を誘起したりする。これまでに、LOVタンパク質を利用して培養細胞中の葉状仮足の形成を光制御するシステムが報告されている。さらにLOVドメインとDNA結合

領域を融合したタンパク質を用いて、青色光依存的に外来遺伝子の転写を活性化するシステムも開発されている。

4. 光ジッパー

2007年に黄色植物であるフシナシミドロから新たなタイプのLOVタンパク質が報告され、オーレオクロームと名付けられた。オーレオクロームにはAUREO1とAUREO2が存在し、それぞれ青色光依存的な分枝反応と生殖器官の形成に関与することが示唆された。興味深いことに、オーレオクロームのLOVドメインのN末側には、FosやJunなどの転写因子に見られる塩基性ロイシンジッパー(bZIP)ドメインが存在している。我々はAUREO1が還元的な環境下で単量体として存在し、青色光照射により一過的に二量体を形成することを示した。また、酸化的環境下ではジスルフィド結合による二量体化が生じた。これら二量体の形成により、DNAの標的配列への結合性が増大することも明らかになった。

我々は、AUREO1のbZIPとLOVドメインをコードする人工遺伝子を作成した。この遺伝子は、大腸菌や培養細胞での発現を考慮してコドン最適化し、ジスルフィド結合の形成を防ぐアミノ酸置換を加えるとともに、単離・精製のためのヒスチジンタグが付加されるように設計した。我々は、この遺伝子から得られるタンパク質を光ジッパー(Photozipper, PZ)と呼んでいる。PZは水溶性のコンパクトなタンパク質であり、光情報変換やDNA結合を解析するうえでの(1)モデルタンパク質として利用することが可能である。現在、分子生物学的手法や生物物理学的手法により、PZの構造変化の解明や分子動態の可視化などを行っている。また、PZは(2)オプトジェネティック・モジュールとしての利用が期待される。そこで、PZと他のタンパク質を融合して活性の光制御を試みるとともに、培養細胞や動物個体に導入して生理活性を光制御することを目指して研究を進めている。

おわりに

光遺伝学的手法を用いた解析は、今後ますます普及していくと予想される。利用価値の高い分子ツールを作成するためには、光受容モジュールの作動機構を正確に理解することが必要とされる。基礎的な解析と生体への応用が相補的に作用して、オプトジェネティクスが発展して行くことを期待したい。