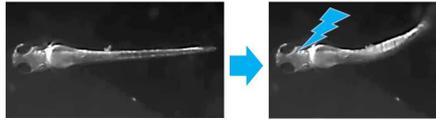


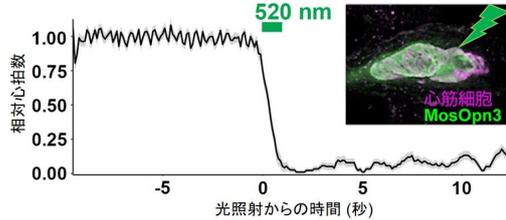
ゼブラフィッシュの神経細胞と心筋細胞の活性を光で自由自在に操る！

ゼブラフィッシュの特定の細胞や器官に
光遺伝学ツールを発現させて評価するシステムを開発

チャンネル型ロドプシン'KnChR'による尾びれ運動の光操作



Gi/o型GPCRロドプシン'MosOpn3'による心拍の光操作

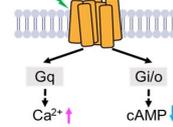


神経回路や心臓の機能を光制御可能に

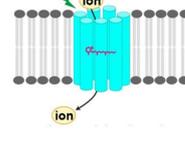


活性を評価した様々な新規光遺伝学ツール

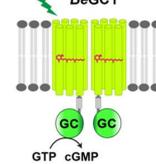
動物由来のGタンパク質共役型ロドプシン



微生物由来の
新規チャンネルロドプシン



グアニル酸シクラーゼロドプシン
光活性化型アデニル酸シクラーゼ



ゼブラフィッシュの神経細胞と心筋細胞を光操作 ～光遺伝学ツールを用いて細胞や器官の機能を光で制御～

【本研究のポイント】

- ・動物由来の G タンパク質^{注1)}共役型ロドプシン^{注2)}、微生物由来の新規チャンネルロドプシン、グアニル酸シクラーゼ^{注3)}ロドプシン、光活性化型アデニル酸シクラーゼ^{注4)}の光遺伝学ツールを、ゼブラフィッシュ^{注5)}の特定の細胞や器官に発現させるシステムを開発した。
- ・光遺伝学ツールをゼブラフィッシュの神経細胞と心筋細胞に発現させ、神経回路や心臓の機能を光制御することができた。
- ・動物個体の特定の細胞や器官で、cAMP/cGMP^{注6)}や Ca²⁺等の細胞内 2 次メッセンジャーを光操作することが可能になった。
- ・細胞や器官機能を制御する、ホルモンや神経伝達物質のシグナル伝達の解析ツールとして、今後多くの研究で使用されるものと期待される。

【研究概要】

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院理学研究科の日比 正彦 教授、清水 貴史 准教授、小山 航 博士後期課程学生、高等研究院・大学院生命農学研究科の萩尾 華子 特任助教らの研究グループは、名古屋工業大学の神取 秀樹 教授、大阪公立大学の寺北 明久 教授のグループとの共同研究で、モデル動物であるゼブラフィッシュの任意の細胞に、種々の光遺伝学ツールを発現させるため、トランスジェニック^{注7)}ゼブラフィッシュの開発を行いました。これらを用いて、魚の遊泳に関わる神経細胞と心筋細胞に光遺伝学ツールを発現させ、神経回路と心臓の機能を光で自由に操作できることを示しました。

本研究で開発した光遺伝学ツールにより、ゼブラフィッシュの神経回路や心臓機能の制御だけでなく、哺乳類を含む脊椎動物一般の、ホルモンや神経伝達物質による細胞や器官機能を制御するシグナル伝達機構の解明にも役立つことが期待されます。

本研究成果は、2023年8月17日付生物医学・生命科学雑誌『eLife』に2報の論文として掲載されました。

【研究背景と内容】

研究背景

細胞は、神経伝達物質やホルモン等、様々な細胞間シグナルに応答することでその機能を発揮します。例えば神経系では、神経伝達物質が受容体に結合することで、神経細胞の機能が制御されます。神経伝達物質の受容体は、大きくイオンチャンネル型受容体と G タンパク質共役型受容体(GPCR)に分けられます。神経伝達物質がイオンチャンネル型受容体に結合することで、細胞質内のイオンの濃度が変化します。一方、神経伝達物質が GPCR に結合した場合、細胞内で、生化学的反応が起こり、Ca²⁺や cAMP 等の細胞内 2 次メッセンジャーを増減させます。同様に、心筋細胞の機能は交感神経と副交感神経によって制御されており、それぞれノルアドレナリン受容体とコリン作動性受容体^{注 8)}が関与し、細胞内のイオン濃度や細胞内 2 次メッセンジャーを制御しています。細胞や器官の機能の制御機構を理解するためには、受容体シグナルや細胞内 2 次メッセンジャーを正確なタイミングと場所で操作し、生体内の細胞や組織の機能に及ぼす影響を調べる必要があります。

これまで、光反応性タンパク質の遺伝子を発現させ、細胞機能を光で制御する光遺伝学(オプトジェネティクス)という技術が開発され、種々の生物学分野で使用されるようになってきました。特に、レチナル^{注 9)}に結合し光感受性で機能を制御できるロドプシンを用いた光遺伝学が、細胞機能の制御や解析に用いられてきました。中でも、微生物由来のチャンネルロドプシン(ChR2 など)およびイオンポンプ型ロドプシン(ハロロドプシンなど)は、神経細胞や心筋細胞の活動を制御するために利用されてきました。しかし、これらロドプシンは、光刺激依存的に細胞の膜電位の脱分極、または過分極を正確なタイミングと場所で誘導しますが、イオンの選択性がないという問題点がありました。また、これらのロドプシンは、GPCR を含む多くの非イオンチャンネル型受容体のシグナル伝達を、直接制御することはできません。近年、動物由来の G タンパク質共役型ロドプシン、微生物由来の新規ロドプシン、酵素型ロドプシン、光活性化型アデニル酸シクラーゼが、培養細胞や一部の生物種で、光遺伝学実験に使用できることが報告されてきました。しかし、解析された細胞や生物種は限定的でした。さらに、脊椎動物個体の同じ実験系を用いて、光遺伝学ツールの有用性や活性の比較は行われてきませんでした。本研究では、遺伝子導入が容易で、透明な仔魚が使用できる、ゼブラフィッシュを用いて、種々の光遺伝学ツールの活性を測定しました(図 1)。

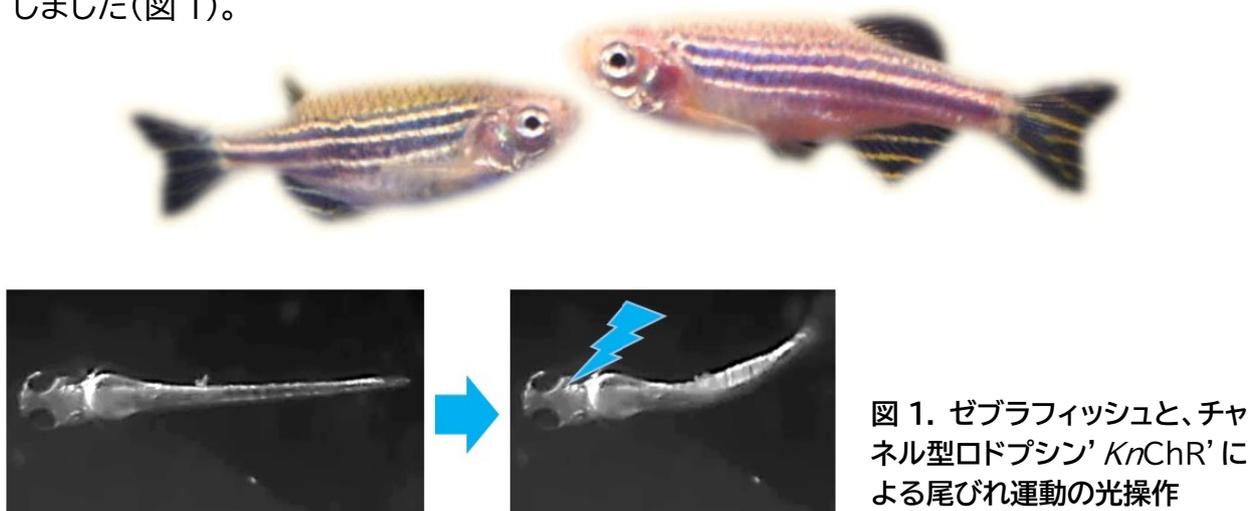


図 1. ゼブラフィッシュと、チャンネル型ロドプシン' *KnChR'* による尾びれ運動の光操作

研究内容

本研究では、改変型の酵母転写因子 Gal4 とその応答配列 UAS (upstream activating sequence) を用いた発現系 (Gal4-UAS システム)^{注10)} を用いて、ゼブラフィッシュの細胞・器官特異的に多様な光遺伝学ツールを発現するシステムを開発しました。今回使用した光遺伝学ツールは、種々の動物由来の Gq および Gi/o タンパク質共役型ロドプシン (bistable rhodopsin)、藻類のカチオンチャネル^{注11)} ロドプシンである *GtCCR4* と *KnChR*、真菌のグアニル酸シクラーゼロドプシンである *BeGC1*、シアノバクテリア (*OaPAC*) やバクテリア (*bPAC*) の光活性化型アデニル酸シクラーゼ (PAC) です。これら光遺伝学ツールを、ゼブラフィッシュの遊泳に関わる神経細胞 (後脳網様体脊髄路 V2a ニューロン) と心筋細胞に発現し、パターン照射装置を用いて、これら細胞の光刺激を行いその影響を調べました。

一つ目の論文では、G タンパク質共役型ロドプシンの解析を行いました。ハエトリグモ由来の Gq 共役型ロドプシン Rh1 (SpiRh1) を発現させた後脳網様体脊髄路 V2a ニューロンを光刺激すると、細胞内 Ca^{2+} レベルが上昇し、遊泳行動が誘発されました (図 2 上段)。一方、ハマダラカ由来の Gi/o 共役型ロドプシン Opn3 (MosOpn3)、フグ由来の TMT オプシン、ヤツメウナギ由来のパラピノプシンを発現する心筋細胞を光刺激すると心停止が起こり (図 2 下段)、この効果は百日咳毒素やバリウムで処理すると抑制されたことから、Gi/o 依存的な内向き整流 K^+ チャンネルを介して、心機能を制御していることが示唆されました。このことは、これらの動物由来の G タンパク質共役型ロドプシンが、ゼブラフィッシュの神経細胞や心筋細胞における、GPCR を介したシグナル伝達の光遺伝学的制御に有用であることを示しています。

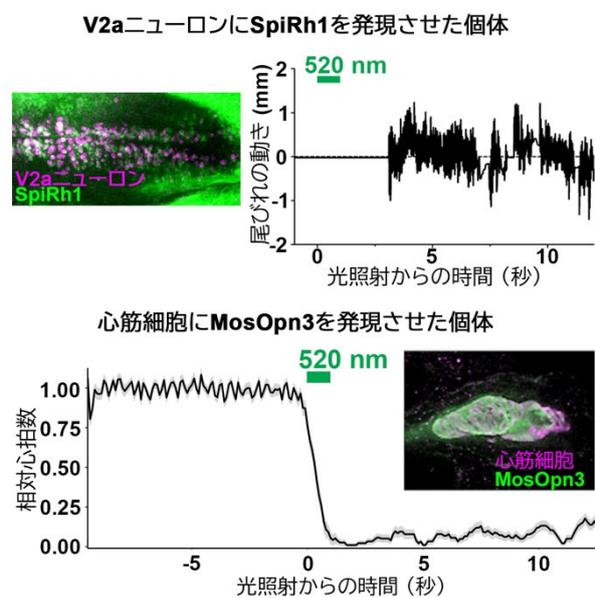


図 2. (上段) SpiRh1 による遊泳行動の誘発 (下段) MosOpn3 による心停止の誘発

二つ目の論文では、微生物由来の光遺伝学ツールの活性を検討しました。後脳網様体脊髄路 V2a ニューロンで、カチオンチャネルロドプシン *GtCCR4* と *KnChR* を活性化すると、比較的短い潜時で遊泳行動が誘導されましたが、グアニル酸シクラーゼロドプシン *BeGC1* や光活性化型アデニル酸シクラーゼ PAC を活性化すると、長い潜時で遊泳行動が誘導されました(図 3)。心筋細胞における *GtCCR4* と *KnChR* の活性化は心停止を誘導しましたが、*bPAC* の活性化は徐脈を徐々に誘導しました。*KnChR* の活性化は心臓の細胞内 Ca^{2+} の増加をもたらし、脱分極が心停止を引き起こしたことを示唆しました。このことは、これらの微生物由来の光遺伝学ツールが、ゼブラフィッシュの神経細胞と心筋細胞の機能と制御を解明するために有用であることを示しています。

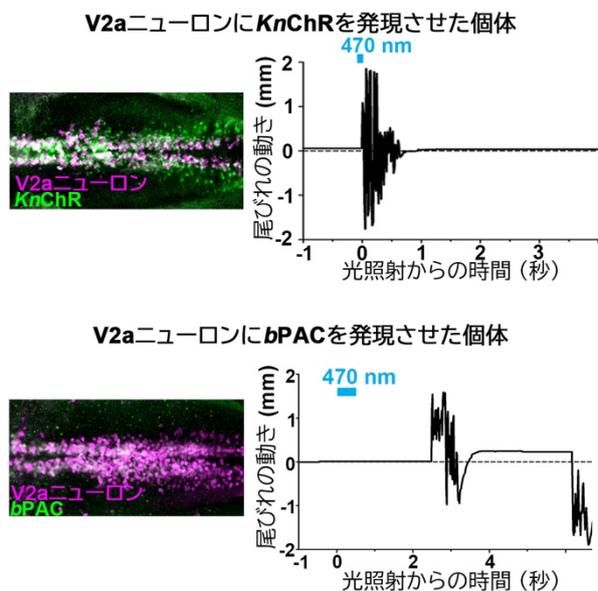


図 3. *KnChR*(上段)と *bPAC*(下段)による遊泳行動の誘発

【成果の意義】

二つの論文を通じて、ゼブラフィッシュの神経細胞と心筋細胞で、ホルモンや神経伝達物質の受容体シグナル伝達やその下流で機能する細胞内 2 次メッセンジャーを、効率よく光操作できる多くの光遺伝学ツールを明らかにしました。ゼブラフィッシュでは、多くの細胞・器官特異的に Gal4 を発現させるトランスジェニック系統が数多く樹立されており、本論文で開発されたゼブラフィッシュ系統を用いて、これら光遺伝学ツールを発現させることで、神経や心臓だけでなく、あらゆる細胞・器官の制御機構や発生・発達機構の解明につながることを期待されます。また、今回開発した光遺伝学ツールは、非常に光感受性が高く、これまでのツールで解析できなかった、新規の器官機能や神経回路の同定にもつながることが期待されます。

本研究では、様々な光波長で、様々な細胞内シグナルを光操作できることを示しました。例えば、同じ神経伝達物質でも、イオンチャネル型受容体と GPCR 型受容体を活性化します。また、同じホルモン・神経伝達物質が、異なる G タンパク質共役型受容体(Gq, Gi/o, Gs タンパク質共役型)を活性化することが知られています。今回の光遺伝学ツールを使い分けることにより、複数の受容体シグナルの個別の役割を解明できるようになりました。

本研究では、ゼブラフィッシュを用いて有用な光遺伝学ツールを明らかにしてきましたが、これらのツールは、同じ脊椎動物であるヒトを含む哺乳類にも応用可能と考えられます。今後、これらの光遺伝学ツールが、脊椎動物全般に適用できる、細胞や器官の機能制御機構の解明に貢献することが期待されます。

本研究は、2017 年度から始まった国立研究開発法人 科学技術振興機構 CREST [オプトバイオ]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の支援のもとで行われたものです。

【用語説明】

注1)G タンパク質:

細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質である。不活性時には細胞膜に存在する受容体分子と結合した GDP 結合型であるが、受容体などからの刺激により GTP 結合型となると活性化され、情報を伝達する。

注 2)ロドプシン:

発色団レチナールに結合し、視細胞の桿体の光に反応して G タンパク質を介して細胞内シグナル伝達を駆動する視物質で、7 回膜貫通ドメインを有する。近年、多くの生物でも、同様の構造をもつ光反応性タンパク質が見つかり、総称してロドプシンと呼ぶこともある。ロドプシンには、G タンパク質共役型ロドプシン、イオン透過型ロドプシン(チャンネルロドプシン・ポンプ型ロドプシン)、酵素型ロドプシンなどが含まれる。

注 3)グアニル酸シクラーゼ:

細胞内情報伝達物質である cGMP の産生を触媒する酵素である。

注 4)光活性化型アデニル酸シクラーゼ:

細胞内情報伝達物質である cAMP の産生を光で制御できるタンパク質である。

注 5)ゼブラフィッシュ:

モデル動物の一つで、胚が透明で、世代交代期間が短く、遺伝子改変が容易な魚である。

注 6)cAMP/cGMP:

細胞内 2 次メッセンジャーとして働く情報伝達物質である。

注 7)トランスジェニック:

ある特定の遺伝子を受精卵などの細胞に注入し、注入された遺伝子情報を人為的にその生物のゲノムに取り込ませることである。このような操作によって作製された個体を遺伝子改変動物(トランスジェニック動物)という。

注 8)コリン作動性受容体:

神経伝達物質のアセチルコリンと結合して信号を受け取り伝達するタンパク質である。

注 9)レチナール:

ロドプシン内の発色団で、光を受容するとレチナールが活性化状態となってロドプシン全体の構造が変化し、シグナル伝達が生じる。

注 10)Gal4-UAS システム:

酵母に由来する転写因子 Gal4 とその応答配列 UAS を用いた遺伝子発現システム。ショウジョウバエの遺伝子発現に良く使われてきたが、近年ゼブラフィッシュでも良く使用されるようになってきている。細胞・器官特異的 Gal4 システムと、任意のタンパク質遺伝子を UAS の下流に配置した遺伝子を持つシステムを交配することで、細胞・器官特異的な遺伝子発現を行うことができる。

注 11)カチオンチャンネル:

細胞の脂質二重膜を貫通する細孔を形成するタンパク質をイオンチャンネルといい、各チャンネルは活性化すると特定のイオンを通すが、陽イオンを透過させるイオンチャンネルをカチオンチャンネルという。

【論文情報】

雑誌名:eLife

論文タイトル: Optogenetic manipulation of Gq- and Gi/o-coupled receptor signaling in neurons and heart muscle cells

著者: Hanako Hagio^{1,2,3}, Wataru Koyama¹, Shiori Hosaka¹, Aysenur Deniz Song¹, Janchiv Narantsatsral¹, Koji Matsuda¹, Tomohiro Sugihara⁴, Takashi Shimizu¹,

Mitsumasa Koyanagi⁴, Akihisa Terakita⁴, Masahiko Hibi^{1*}

1: 名古屋大学大学院理学研究科、2: 名古屋大学大学院生命農学研究科、3: 名古屋大学高等研究院、4: 大阪公立大学大学院理学研究科

DOI: 10.7554/eLife.83974

URL: <https://elifesciences.org/articles/83974>

雑誌名:eLife

論文タイトル: Optogenetic manipulation of neuronal and cardiomyocyte functions in zebrafish using microbial rhodopsins and adenylyl cyclases

著者: Hanako Hagio^{1,2,3}, Wataru Koyama¹, Shiori Hosaka¹, Aysenur Deniz Song¹,

Janchiv Narantsatsral¹, Koji Matsuda¹, Takashi Shimizu¹, Shoko Hososhima⁴,

Satoshi P Tsunoda⁴, Hideki Kandori⁴, Masahiko Hibi¹

1: 名古屋大学大学院理学研究科、2: 名古屋大学大学院生命農学研究科、3: 名古屋大学高等研究院、4: 名古屋工業大学大学院工学専攻

DOI: 10.7554/eLife.83975

URL: <https://elifesciences.org/articles/83975>