

## レチナル類似体により長波長シフトさせたチャネルロドプシンの電気生理学的解析

田中 海帆 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 櫻井 啓輔 (筑波大学 生命環境学系)

## 1. 背景

チャネルロドプシンは藻類で発見された7回膜貫通型の光駆動性カチオンチャネルであり、結合する発色団レチナルが光を受けて異性化することによりチャネルが開口し脱分極が引き起こされる。今日では光によって神経細胞の活動を制御する光遺伝学のツールとして広く利用され、生きた状態の生物個体に対して非侵襲的に、チャネルロドプシン遺伝子を発現させた細胞を選択的に興奮させることができることから、特に脳科学や神経科学の分野で注目されている。これまで知られているチャネルロドプシンの多くは青色から緑色光の波長帯の光によって活性化されるが、これらの波長帯は血中に含まれるヘモグロビンによって吸収・散乱されやすく、組織深層への浸透が制限されるという問題点がある。この問題の克服には、より長波長の光の吸収を示す性質を有したチャネルロドプシンの開発が重要である。近年、レチナルの直鎖ポリエンを伸長させた「レチナル類似体」を用いると、チャネルロドプシンの吸収がより長波長シフトを示すことが分光学的に示された。しかし、レチナル類似体を結合したチャネルロドプシンの光電流は不明である。本研究では培養細胞に発現させたチャネルロドプシンについて電気生理学的に光電流の作用スペクトルを解析し、今後のより光遺伝学的に有用性の高いレチナル類似体の開発の一助となることを目的とした。

## 2. 方法

**<培養細胞における発現>** ポリ-D-リジンでコーティングした15mm丸型カバーガラスにて培養したHEK293T細胞に対し、プラスミドDNAをリポフェクション法により導入した。プラスミドはマーカーとして蛍光タンパク質 Venus とチャネルロドプシン遺伝子 C1C2 または ReaChR を導入し、1日以上培養後、野生型レチナルまたはレチナル類似体を  $1\mu\text{M}$  添加して2時間から1終夜培養し電気生理実験を行った。レチナル類似体は、オールトランスレチナル2 (ATR2) のポリエン鎖のうちそれぞれ C6-C7, C10-C11, C14-C15 の位置に二重結合を付加したものを用いた。以降 C6-C7 へ二重結合を加えた ATR2 を導入した C1C2 を ATR2-6ex-C1C2 のように記述する。

**<電気生理学実験>** 電気生理実験では、蛍光タンパク質 Venus の発現を示した細胞に対して細胞膜を穿孔し、ホールセルパッチクランプ法により、細胞膜電位を固定した状態で 420, 460, 520, 560, 600, 640, 680 nm の各波長の1秒間の定常光によって生じる電流を測定した。なお、還流液の組成は NaCl 140, KCl 1, CaCl<sub>2</sub> 2, CsCl 1, MgCl<sub>2</sub> 2 (mM) を、電極内溶液の組成は NaCl 110, KCl 1, CaCl<sub>2</sub> 2, CsCl 1, MgCl<sub>2</sub> 2 (mM) を用いた。

**<解析方法>** 多くの細胞では、光刺激を与えた直後に電流は最も大きい値を示し、その後徐々に減少し光が消失する直前にかけて安定的な値を示す(図1)。この異なる時間経過で測定されるの電流量をそれぞれ極大値および定常値として各成分に関して解析をおこなった。定常値解析では一光子数あたりの電流量を各波長における感度とし、極大値解析では一光子数あたりの定常値との差分を感度として算出した。

## 3. 結果

**<チャネルロドプシンの光電流>** まず、Venus 陰性の HEK293T に対して光刺激を与えたところいずれの細胞でも光電流は観察されなかったのに対し、Venus 陽性の細胞においては、ほぼ全ての細胞で光電流が観察されたことから、光電流は導入したチャネルロドプシン由来であることを確認した。また、チャネルロドプシンが機能するにはレチナルが不可欠であるが、光電流は、レチナル添加しない条件でも観察された。これは、培養細胞の内在性のレチナルが存在しているためと考えられる。その光電流の最大感度は、C1C2 と ReaChR でそれぞれ 460 nm と 520 nm であり、オールトランスレチナル1 (ATR1) による吸収スペクトルと類似していたことから HEK293 細胞の内在性は ATR1 レチナルと考えられる。これ以降はより長波長シフトが期待できる ReaChR に着目してレチナル類似体を添加し実験を行った。

**<レチナル類似体による定常値解析>** 次に、培地にレチナル類似体を添加し光電流の測定を行った。異なる3種類のレチナル類似体 ATR2-6ex-ReaChR, ATR2-10ex-ReaChR, ATR2-14ex-ReaChR のすべてに関して、光電流は 520 nm の光に対して最大感度を示し、レチナル添加による最大感度の波長シフトは見られなかった。その一方で、560 nm から 640 nm の波長帯の光に対する感度が上昇し、中でも 560 nm で最も顕著であった。

**<レチナル類似体による極大値解析>** 極大値に関しても、3種類のレチナル類似体に関して同様の解析を行ったところ、ATR2-14ex-ReaChR でのみスペクトル感度が 560 nm で最も高くなったが、他のレチナル類似体ではいずれの波長の光に対しても顕著な感度の上昇は観察されなかった。

## 4. 結論

この実験では、まずレチナル類似体が分光学的な吸収を示すだけでなく、生きた細胞内の C1C2 および ReaChR で光電流に寄与することを確認した。特に ATR2-14ex-ReaChR は長波長帯での感度の上昇が顕著であり、さらに極大値のスペクトルピークも長波長へとシフトした。ゆえに ATR2 の C14=C15 への二重結合の導入は、ReaChR において長波長帯の光に対して最も効果的に電流を発生させるといえる。考察の詳細は発表会にて報告する。

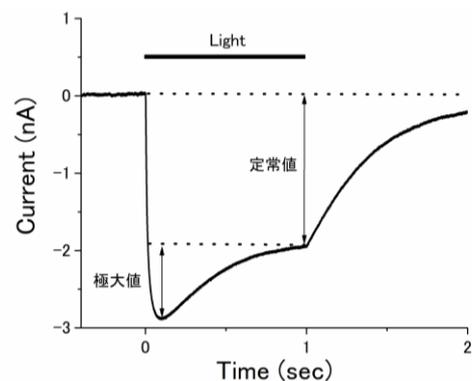


図1: 光パルス照射後から遮断までの光電流例