助成番号　210255	５－２

研 究 成 果 報 告 書

研究テーマ（和文）	非天然アミノ酸を利用した光遺伝学ツール作成法		
研究テーマ（英文）	Development of the method to generate optogenetic tools with unnatural amino acids		
研究期間	2021年 ～ 2024年	研究機関名　生理学研究所	
研究代表者	氏名（漢字）	下村 拓史	
	氏名（カタカナ）	シモムラ タクシ	
	氏名（英文）	Takushi Shimomura	
	所属機関・職名	生理学研究所・助教	
共同研究者 ＊２名をこえる場合は、【別紙追加用紙】(P3)に３人目以降を追記してください。	氏名（漢字）		
	氏名（カタカナ）		
	氏名（英文）		
	所属機関・職名		
	氏名（漢字）		
	氏名（カタカナ）		
	氏名（英文）		
	所属機関・職名		

概要 （600 字～800 字程度にまとめてください。）

光遺伝学は、神経活動の光による制御を可能にし、基礎医学や神経科学の研究に革命をもたらした技術である。この分野の発展は、天然の光応答性イオンチャネルやポンプの発見に依存してきた。今後は、狙った標的を光感受化する「分子指向型」の光遺伝学を実現するため、より簡便で汎用性の高い手法が必要とされる。

本研究では、光反応性非天然アミノ酸を用いることで、タンパク質の特定部位に人工アミノ酸を組み込み、その活性を光で直接制御する戦略をとり、その汎用性・妥当性を検討した。この手法では、特定の波長の光に応答する側鎖を持つ人工アミノ酸をタンパク質の機能に重要な位置に導入することで、リガンドの結合や活性化時の構造変化を光依存的に制御することを狙った。

当初計画では、原核生物カルシウムチャネルを対象とすることを狙ったが、発現させる卵母細胞での発現が困難であったため、電位依存性 K^+チャネルである Kv1.2 に標的を変更した。光異性化非天然アミノ酸を Kv1.2 に導入し、２種類の異なる波長の光照射を行うことでチャネル活性が制御可能であることを確認した。また、ホスホイノシチド(PI)脱リン酸化酵素である INPP4B を対象とし、同酵素の活性部位近傍に光ケージドセリンを導入して、その活性を光制御することを狙った。INPP4B により活性が制御される two-pore channel 3(TPC3)の電流測定を通じ、INPP4B の活性を光制御できていることを確認した。このような結果は、光感受性非天然アミノ酸を利用して多様なタンパク質の活性を制御できることが実証するものであり、「分子指向型」光遺伝学に有用であることを実証している。また、研究の本筋とは異なるが、TPC3 の分子メカニズムを詳細に調べ、PI による活性化と電位依存的な活性化の切り替えメカニズムを解明し、論文として報告した。

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）

雑誌	論文課題	Conformational rearrangements in the second voltage sensor domain switch PIP_2– and voltage–gating modes in two–pore channels				
	著者名	Shimomura et al.	雑誌名	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America		
	ページ	e2209569120; 1～11	発行年	2 0 2 3	巻号	120 (6)
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	

英文抄録（100 語～200 語程度にまとめてください。）

Optogenetics has revolutionized neuroscience and basic medical research by enabling the control of neural activity with light. The field has grown with the discovery of natural light–sensitive ion channels and pumps. There's a need for a general method to achieve ″molecule–targeted″ optogenetics, where specific targets are made light–sensitive.

In our research, we introduced photoreactive unnatural amino acids (PAAs) into the active region of target proteins to control their activity with light. We first targeted the voltage–gated K^+ channel Kv1.2, although our initial target had been a prokaryotic calcium channel, which proved difficult due to low expression in oocytes. By introducing a photo–isomerizing amino acid into Kv1.2, we demonstrated light–mediated controllable channel activity. Second, we targeted the phosphoinositide (PI) phosphatase INPP4B by introducing a light–caged serine near its active site. By measuring currents from the cell expressing INPP4B with two–pore channel 3 (TPC3), whose activity is regulated by INPP4B, we confirmed light–based control of INPP4B activity. These results demonstrate the versatility of using PAAs to control various protein activities and contribute to ″molecule–targeted″ optogenetics. Separate from the main study, we investigated the molecular mechanism of TPC3 in detail and revealed a switch mechanism between PI–induced and voltage–dependent activation.