

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14030

研究課題名(和文)長波長光による生体深部タンパク質光制御法の開発

研究課題名(英文)Development of optogenetics tools regulated by light with longer wavelength

研究代表者

服部 満 (Hattori, Mitsuru)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：20589858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、長波長の光を利用して生きた細胞中の標的タンパク質を操作する方法を確立する。そのために、長波長光照射により蛍光分子から発生する近接場光の利用、もしくは長波長光応答タンパク質を利用する。
長波長光応答タンパク質を利用した方法では、タンパク質機能を光制御する方法を検討した。イオンポンプのうち580 nm前後の照射光によりイオン流入の程度が変化することが知られているタンパク質を選択し、照射光の波長と実際の細胞活動の変化の関係を、化学発光タンパク質センサーを利用することで確認した。結果、光照射に対して鋭敏に反応する細胞活動が確認され、光応答タンパク質による長波長光での光制御の応用性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We tried to establish a new optogenetics tool to regulate a protein in living cells by light with longer wavelength. For the purpose, near-field light from fluorescent molecules or photo-reactive proteins regulated by longer wavelength light were used. In the method with photo-reactive proteins, we considered with a regulation of protein function by light. Ion-pump protein on cell membrane was selected, which was regulated by 580 nm light. The relationship between photo-reaction and variation of cell function were investigated with chemiluminescent protein sensor. In the result, cell phenomenon reacted with photo-irradiation were confirmed. Finally, we identified the possibility of photo-reactive proteins with the optical function with longer wavelength light.

研究分野：分子生物学

キーワード：光遺伝学 蛍光観察 蛍光タンパク質 光応答タンパク質

1. 研究開始当初の背景

生きた細胞中の特定の生体分子を人為的に操作する方法として、近年、光刺激による時空間的な操作が注目されている。同開発分野では、植物や光合成生物由来の光応答タンパク質をツールとし、細胞外からの光照射によって解析対象とするタンパク質や核酸の挙動を、任意の場所、時間で制御することを目的としている。

光操作は時空間的な制御を可能にするため、その利点が最大限発揮されるのは、生きた個体内での反応である。申請者は植物由来の CRY2 タンパク質を用いて、顕微鏡下でマウス神経細胞の軸索伸長を青色光刺激により誘導することに成功している。CRY2 も含め光操作に用いられる光応答タンパク質は、青色光によって制御されるタイプが大半である。そもそも植物等から単離・確立された光応答タンパク質では、青色光に反応するものがその多くを占めているという背景がある。青色光による刺激は長波長の光よりもエネルギーが高い反面、生体組織の透過性に劣ることから、生きた個体での光操作には不向きである。

このように青色光の生体透過性は、生きた個体への応用において大きな問題となっている。したが、「光制御法」では、生体組織透過性の高い長波長の光による制御手法が求められている。しかしながら、赤色光によって制御される光応答タンパク質は限られており、使用には発色団(クロモフォア)を別に添加する必要があるなど、煩雑な作業を要する。また、タンパク質サイズが巨大なことなど、自在な利用には至っていない。

本申請研究は、透過性に優れた長波長光をいかに刺激光として用いるか、その原理の創案が起となる。新規な光刺激操作法、具体的には青色光制御タイプの光応答タンパク質を赤色光刺激で制御するという斬新な発想に基づく原理を考案し、開発計画に至った。

2. 研究の目的

本研究では、光制御原理の中心である光応答タンパク質の多くが青色光(短波長)制御であるという問題を克服するため、次の2つの原理、A. 長波長の光照射による蛍光分子からの青色近接場光の発生及び光応答タンパク質の活性化、B. 長波長光応答タンパク質の利用による光制御、のいずれかを達成することで、長波長光でも制御できる新規の光操作方法の確立を目的とする。

青色光制御タイプの光応答タンパク質を長波長光刺激で反応させるために、原理 A

では、2段階の原理を組み合わせた手法を構築する。

段階1; 赤色、近赤外光によって、蛍光色素/蛍光タンパク質の「近接場光」を発生させる方法の確立

段階2; 近接場光によって青色光制御タイプの光応答タンパク質を反応させる方法の確立

蛍光観察法はイメージングツールの発展とともに、その用途の拡大を見せている。また、近年の光応答タンパク質を利用した光制御法の発展は、新たな光応答タンパク質の開発とともに、光刺激方法のバリエーションも求められている。その光源として近接場光を利用し、励起光さらには光応答タンパク質の「動力源」として用いる原理は、FRET 法など既存のテクニックにも応用が可能な汎用性の高い、世界初の方法である。

近接場光は数 nm~数十 nm の範囲に発生するため、近傍に光応答タンパク質を配置した場合には十分反応を起こさせることが可能である。励起光波長と蛍光波長との関係性、近接場光発生の効率など、本減少では基本的なデータが大いに不足している。この現象を徹底的に分析することで実証がなされた場合には、新たな光操作方法の発見としてのインパクトとともに、長波長の光を刺激光として利用したいというニーズを満たす非常に将来性の高い技術となる。生きた組織深部への光刺激を可能とすることで、光制御法を利用した現象解析、生体制御の実現に対して大いに貢献する。

3. 研究の方法

本申請研究では、生体透過性の高い長波長の光を利用して生きた動物固体中の標的タンパク質を操作する方法を最終的に確立する。開発の段階目標として、A-1) 長波長光によって蛍光色素や蛍光タンパク質から近接場光を発生させること、さらに A-2) 発生した近接場光で光応答タンパク質の活性を誘導すること、の2つを設定する。加えて、B) 既存の長波長光応答タンパク質を利用した方法を再度確認しその応用方法を模索することで、あらゆる可能性を検討する。

A-1a) 蛍光色素を用いた近接場光発生の確認

既存の短波長蛍光色素各種(蛍光 400-500 nm)を高濃度に含む溶液をそれぞれ準備する。赤色光もしくは近赤外光をレーザー光として溶液に局所的に照射する。近接場光が発生した場合には、近隣の蛍光色素に伝播され照射領域の周囲が

可視蛍光を有することから判断する。照射する光の波長によって近接場光の発生程度がどの程度変化するかを調査する。また、蛍光色素濃度や溶液の組成がどの程度影響するかについても条件検討する。

A-1b) 蛍光タンパク質を用いた近接場光発生の確認
蛍光タンパク質（蛍光 400-500 nm）を大腸菌に発現させる。大量培養の後タンパク質を生成して、高濃度蛍光タンパク質溶液を準備する。赤色光を溶液に高密度で照射した際に、近接場光が発生して周囲の蛍光タンパク質が可視光の蛍光を発生することを確認する。蛍光タンパク質の種類、ダイマーなど多量体化による近接場光の変化などを検討する。

A-2a) 蛍光色素もしくは蛍光タンパク質と、光応答タンパク質との連結分子を作製する。蛍光色素との細胞中での連結はSNAPタグを用いることで可能にする。蛍光タンパク質との連結は発現プラスミド上で遺伝的に融合タンパク質が発現するように設計する。光応答タンパク質には、光刺激によってホモダイマーを形成するタイプのCRY2等を用いる。

A-2b) 作製した連結タンパク質を、ヒト培養細胞内に発現させる。長波長の刺激光により近接場光を発生させる。近接場光が光応答タンパク質の活性を誘導した結果、ホモダイマー化が進行することを、細胞イメージングや*in vitro*検出などで確認する。光応答タンパク質に連結する蛍光分子の波長や、刺激光の強度、パターンを色々と組み合わせることで、最適な光制御の条件を模索する。

B) 既存の長波長光応答タンパク質は550-650 nm 付近が検討される。その中で分子量が比較的小さく細胞への影響が少ないタンパク質を選択し、タンパク質機能を制御する手法、プローブを開発する。さらに光刺激により生じる細胞活動の変化を別の科学発光センサーなどでモニタリングすることで、長波長光刺激による人為的な誘導ができていないか評価する。

A, B の目標達成を経て、具体的な制御対象として、GPCR や神経軸索誘導因子などの膜タンパク質に着目する。長波長の光刺激によりそれぞれのタンパク質の活性、さらには下流シグナルの活性を誘導することで、最終的には細胞形態的な変化を人為的に制御できる技術として確立する。

4. 研究成果

研究方法 A および B それぞれの原理の実現性を検証するとともに、いずれの原理が目的達成に適しているか選択し今後の開発展開の方向性を具体化した。

A-1a では、数種類の蛍光色素を準備して、その高濃度溶液を作成し 600 nm 以上の長波長光を照射して調査を行った。結果、明確に蛍光が発生している条件を見出すことはできなかった。A-1b では、緑色蛍光タンパク質を溶液中で高濃度に存在させた状態で 600 nm 以上の長波長光を照射して、蛍光性を有するか検証した。結果、微弱ではあるものの励起光よりも短い波長の放出蛍光が検出された。さらに励起光の照射条件、検出光の波長特性などを詳細に分析することで、より効果的な蛍光発生を実現出来ることが期待された。A-2 以降は、光照射による蛍光タンパク質の近接場光発生条件の検討が完了しておらず、実施には至らなかった。光応答タンパク質の候補として、CRY2 のみならず B で使用している光応答細胞膜イオンポンプタンパク質も選択肢に加え、今後開発を進める。

B では、長波長光応答タンパク質を利用した方法を再検討して、タンパク質機能を光制御する方法を検討した。細胞膜イオンポンプのうち 580 nm 前後の照射光によりイオン流入の程度が変化することが知られているタンパク質を選択し、照射光の波長と実際の細胞活動の変化の関係性を、化学発光タンパク質センサーを利用することで確認した。結果、光照射に対して鋭敏に反応する細胞活動が確認され、光応答タンパク質による長波長光での光制御の応用性を見出した。

検証実験、および光応答システムの構築を経て至った結論としては、近接場光による蛍光色素もしくは蛍光タンパク質の励起は、条件が整えば可能性があるものの、その条件の最適化にはさらなる検討実験が必要であること、また長波長光応答タンパク質を用いた制御法は、比較的 low molecular weight のタンパク質を用いることで、600 nm 前後の光照射により細胞活動を人為的に制御することを可能にした。さらなる応用として、動物個体に導入してその光応答を確認するとともに、生体透過性の高い波長光での制御を実現する。長波長光のさらなる可能性を追求する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① M. Endo, M. Hattori, H. Toriyabe, H. Ohno, H. Kamiguchi, Y. Iino, and T. Ozawa
Optogenetic Activation of Axon Guidance Receptors Controls Direction of Neurite Outgrowth
Sci. Rep. (査読あり) 6 (2016) 23976.
doi: 10.1038/srep23976.

② M. Hattori, G. Kawamura, R. Kojima, M. Kamiya, Y. Urano, and T. Ozawa
Confocal Bioluminescence Imaging for Living Tissues with a Caged Substrate of Luciferin
Anal. Chem. (査読あり) 88 (12) (2016) 6231-6238.
doi: 10.1021/acs.analchem.5b04142.

③ O. Takenouchi, A. Kanno, H. Takakura, M. Hattori, and T. Ozawa
A Bioluminescent Indicator for Highly Sensitive Analysis of Estrogenic Activity in a Cell-based Format
Bioconju. Chem. (査読あり) 7 (2016) 2689-2694.

④ T. Yamada, H. Yoshimura, R. Shimada, M. Hattori, T. Eguchi, K. Fujiwara, A. Kusumi, and T. Ozawa
Spatiotemporal Analysis with a Genetically Encoded Fluorescent RNA Probe Reveals TERRA Function around Telomeres
Sci. Rep. (査読あり) 6 (2016) 38910.
doi: 10.1038/srep38910.

⑤ M. Komiya, A. Ito, M. Endo, D. Hiruma, M. Hattori, H. Saito, M. Yoshida, and T. Ozawa
A Genetic Screen to Discover SUMOylated Proteins in Living mammalian Cells
Sci. Rep. (査読あり) 7 (2017) 17443.
doi: 10.1038/s41598-017-17450-7.

[学会発表] (計 3 件)

① Mitsuru Hattori, Tomoki Matsuda, Takeaki Ozawa, Takeharu Nagai
Development a monitoring system of N-cadherin dependent neuronal adhesion
Scientific research innovative areas, area-meeting
2017 年 3 月 19-23 日
関西セミナーハウス (京都府)

② 服部満

ルシフェラーゼ再構成を基盤とした GPCR シグナルの発光定量検出法.
日本薬学会第 137 年会
2017 年 3 月 25 日
東北大学川内キャンパス (宮城県)

③ 服部満, 河村玄気, 小嶋良輔, 神谷真子, 浦野泰照, 小澤岳昌
共焦点発光イメージングを利用した生細胞観察法の開発.
第 39 回日本分子生物学会年会
2016 年 11 月 30 日
パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書] (計 1 件)

服部満, 小澤岳昌
化学同人
先端計測 “三次元発光イメージング”
(日本化学会編)
2016, 82-87p

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 満 (HATTORI, Mitsuru)
大阪大学産業科学研究所・助教
研究者番号: 20589858

(2) 研究分担者

なし