

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14733

研究課題名(和文) 発生生物学に適した光遺伝学ツールの開発

研究課題名(英文) Optogenetic tool for developmental biology

研究代表者

小笠原 慎治 (Ogasawara, Shinzi)

北海道大学・理学研究院・研究院研究員

研究者番号：50462669

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)：生物の発生では、タンパク質がいつ、どの細胞で、どのぐらいの期間発現するかが重要である。光でタンパク質の発現を操作する光遺伝学的手法が有望であるが、既存的手法では光照射からタンパク質の発現に反映されるまでに数時間のタイムラグが生じてしまい発生生物学への応用には向いていなかった。本課題では、より精密にタンパク質の発現を光操作するため、光応答性capを用いた翻訳の可逆的制御法を開発することに成功した。また、開発した手法を発生生物学へ応用し、ゼブラフィッシュの発生初期においてsquintタンパク質の発現期間を操作することで双頭ゼブラフィッシュを誕生させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Living processes are managed through the precise control of “when, where, and how long” proteins are expressed. The photo-control of protein expression enables the spatiotemporal induction of biological events in living cells or organisms. In transcriptional control, several hours elapse between light illumination and the beginning of protein expression, and protein continues to be synthesized for more than 10 hours after the light is turned off due to residual mRNA. Now, I developed a photoresponsive cap that can control the translation of mRNA in a reversible manner via its cis-trans photoisomerization through illumination with 370 nm and 430 nm light. An application of this approach was demonstrated by photo-inducing the development of double-headed zebrafish by controlling the expression of squint protein

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：mRNA 光遺伝学 転写 発生生物学 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

必要な細胞だけで、必要な期間、必要な量のタンパク質が発現することで発生は進行する。それにもかかわらず、現在の発生生物学ではそういったタンパク質発現の時空間動態を考慮せず、1細胞期の胚へ mRNA を注入し胚の全細胞で常にタンパク質を過剰発現させる方法が常用されている。このような荒っぽい操作では発生の真に迫ることはできない。発生における遺伝子発現プログラムを解き明かすには生物と同じ精度でタンパク質発現の時空間動態を操作する方法が必要である。

その実現には光遺伝学ツールが最有力である。しかし、今の光遺伝学ツールは転写を操作しているため、タンパク質の発現を完全に停止させることができず、事実上、時空間操作能は無い。さらに、転写システムが稼働していない発生初期で使うことはできない。転写ではなくタンパク質への翻訳をダイレクトに光操作できれば、それらの問題は一挙に解決し、発生中の胚のあらゆる時期でタンパク質の発現を時空間操作することが可能になる。

申請者は独自に開発した光応答性 cap を使い *in vitro* で翻訳を光操作することに成功した (S. Ogasawara, *ChemBioChem* **2014**, 15, 2652)。これを基に *in vivo* でも使える新しい光応答性 cap を合成し、発生中の胚でタンパク質の発現期間、場所、量を操作する方法を開発する。

2. 研究の目的

本課題の目的は、発生中の胚でタンパク質発現の時空間動態を光で人工的に操作する方法を確立することである。発生生物学では遺伝子の機能を調べるために1細胞期の胚へ mRNA を注入する方法が使われる。しかしこれでは注入直後から胚の全細胞でタンパク質が過剰発現し、期間、場所、量といった

発現の時空間動態を根底から破壊してしまう。そこで本課題では、mRNA からタンパク質への翻訳を光操作し、発生中の胚でタンパク質の発現期間、場所、量を人工的に操作する方法を開発する。

3. 研究の方法

<平成28年度>

本年度は光応答性 cap の開発をおこなう。レポーターに蛍光タンパク質を使いゼブラフィッシュの胚で翻訳の操作能を調べ、その結果をもとに光応答性 cap を改良する。

● 光応答性 cap の有機合成

翻訳は mRNA の 5' 末端に付加されている 7-メチルグアノシンと翻訳開始因子 (eIF4E) との結合によって始まる。この間の結合なくして翻訳は起こらない。光応答性 cap とは、申請者が考案した可逆的に *cis-trans* 光異性化する cap のことで、その異性化で eIF4E との結合を制御でき、翻訳を光で操作できる。予備実験に用いたプロトタイプの光応答性 cap は異性化に 312 nm の光を必要とし、照射すれば胚に大きなダメージを与えてしまう。そこで、可視光で異性化させられるよう分子設計から一新する。具体的には、cap の 2 位へアゾリンカーを介して芳香族化合物を導入する。アゾ基の n-p*遷移の吸収により異性化波長が可視光になると予想される。

● 翻訳操作能を調べその結果をもとに光応答性 cap を改良する

合成した光応答性 cap が *trans* 体の時と *cis* 体の時とで発現するタンパク質の量にどの程度の差がみられるか蛍光タンパク質をレポーターに調べる。無細胞転写反応系に光応答性 cap を添加し *in vitro* で 5' 末端に光応答性 cap を付加した mRNA を合成する。スピнкаラムとエタノール沈殿で精製した mRNA をマイクロインジェクションで1細胞

期のゼブラフィッシュの胚へ注入する。共焦点レーザー顕微鏡（現有機器）のステージ上でインキュベーションしながら光刺激を与え、その後の蛍光強度の変化を観察する。trans 体と cis 体でのタンパク質発現量の差が5倍以上になることを目標に光応答性 cap を改良する。具其他的には2位に導入する芳香族化合物に官能基を入れ嵩高さを徐々に増やしていく。目標に達する操作能を有する光応答性 cap が完成した後、半減期が数時間の不安定蛍光タンパク質をレポーターとし翻訳の ON/OFF 操作が繰り返し可能かを確認する。同時に、刺激光の照射場所、照射タイミングを様々に変化させ、タンパク質の発現場所、期間および量が操作できることを確認する。

<平成29年度>

胚内で mRNA を安定して存在させる手段を見出した後、デモンストレーションとしてゼブラフィッシュの発生初期に背側の形成を誘導する *squint* タンパク質の発現場所・期間および量を操作し、形態へ及ぼす影響を調べる。

- 胚内で mRNA を安定して存在させる手段を見出す

通常、mRNA は胚内で RNase によって数時間以内に分解されてしまう。ゼブラフィッシュの発生が完了するまでの24時間、インジェクションした mRNA が胚に十分残っている必要がある。そこで、胚内での mRNA の半減期を24時間以上にする手段を見出す。mRNA の分解は3'末端のポリ A の短縮と5'末端の cap の脱落により始まる。まず、ポリ A の短縮を防ぐため、ポリ A 伸長シグナル配列を mRNA の3'非翻訳領域に付加する。加えて、光応答性 cap のトリフオスフェートの一部を酵素耐性のあるメチレンビスフオスフォネートに変更し、cap の

脱落を防ぐ。mRNA の生存率はノーザンブロットティングにより定量評価する。

- ゼブラフィッシュの胚で *squint* タンパク質の発現場所・期間および量を操作し、形態へ及ぼす影響を調べる

最後に、デモンストレーションとしてゼブラフィッシュの発生初期に背側を誘導する *squint* タンパク質の発現動態を操作する。光応答性 cap を付加した *squint*-mRNA を無細胞転写系で合成する。精製した mRNA をマイクロインジェクションで1細胞期のゼブラフィッシュの胚へ注入する。顕微鏡のステージ上でインキュベーションしながら光刺激を加え、*squint* の発現場所・期間および量を操作し、双頭になるのか、尾が2本になるのかなど形態へ及ぼす影響を調べる。

4. 研究成果

翻訳を可逆的に光制御するための可視光応答型光応答性 cap の開発に成功した。翻訳は mRNA の5'末端に付加されている7-メチルグアノシン (cap) と翻訳開始因子 (eIF4E) との結合によって始まる。この結合無くして翻訳は起こらない、この点に着目し、cap と eIF4E の結合を可視光で制御し mRNA からタンパク質への翻訳を光操作するシステムを開発した。具体的には cap の2位へアゾリンカーを介して芳香族化合物を導入した。アゾ基の $n-\pi^*$ 遷移の吸収により異性化波長が可視光になると予想したからである。その結果、370 nm と 430 nm の光で異性化させられるようになった。また、蛍光タンパク質の mRNA をゼブラフィッシュの胚へインジェクションし発現量の差を評価したところ、翻訳が起こる時のタンパク質発現量は、翻訳が起こらない時に比べおよそ7倍であり、当初の目標値(5倍)を達成できた。続いて *squint* 遺伝子の発現操作実験を行った。1細胞期の胚へ *squint*_mRNA をインジェクションし8細胞期に局所的に370 nm の光を照射し

タンパク質を発現させ、その4.5時間後430 nmの光を照射し発現を停止させた。その結果、双頭の稚魚が誕生した。比較実験の結果からsquint遺伝子には体軸を形成させる機能がある一方で頭部の形成を阻害する副作用があることを見出した。

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 1件)

1. Shinzi OGASAWARA, Duration Control of Protein Expression in Vivo by Light-Mediated Reversible Activation of Translation. ACS Chemical Biology (2017) 12, 351-356 (査読有)

[学会発表] (計 2件)

1. 小笠原慎治「生体内での翻訳の可逆的光制御」第98回日本化学会春季年会 (2018)

2. 小笠原慎治「発生生物学のための新規光遺伝学的手法」第88回日本動物学会 (2017)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: プリンヌクレオシド誘導体、ポリヌクレオチド及びRNA

発明者: 小笠原慎治

権利者: 小笠原慎治

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/032310

取得年月日: 2017年9月8日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小笠原 慎治 (Ogasawara Shinzi)

北海道大学・理学研究院・研究院研究員

研究者番号: 50462669

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()