

令和元年6月4日現在

機関番号：82675

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07406

研究課題名(和文) 光作動型シグナル伝達操作システムの線虫*C. elegans*への導入と応用研究課題名(英文) Manipulation of signal transduction by light in *C. elegans*

研究代表者

小田 茂和(Oda, Shigekazu)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・助教)

研究者番号：40802848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：赤色/近赤外光で二量体化をON/OFFに切り替えることができる光誘導性二量体化(Light-Induced Dimerization, LID)システムであるPhyB-PIFシステムを、線虫*Caenorhabditis elegans*へゲノムに完全にエンコードされた形で導入することに成功した。さらに、PhyB-PIFシステムを用いて線虫の単一神経細胞でERK-MAPKシグナル伝達経路(生化学反応)の光操作とリン酸化活性の可視化へ応用することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子に完全にコードされておりかつ生物個体に害が少ない長波長光により作動する光誘導性二量体化システムが、初めて動物個体(線虫*C. elegans*)に導入されたことにより、動物個体で分子活性を操作するための光遺伝学技術が促進されることになることが期待される。これにより、分子と動物個体の関係性の詳細を明らかにすることができる。

また、この技術は、最終的には光で分子活性を操作して治療するための技術へと発展していく可能性が十分ある。

研究成果の概要(英文)：I introduced the fully-genetically encoded PhyB-PIF system, a light-Induced dimerization (LID) system that can be controlled by red/infra-red light, into a nematode *Caenorhabditis elegans*. With this optogenetic tool, I succeeded in controlling ERK-MAPK signal transduction (a biochemical reaction) in a single neuron in the worm.

研究分野：システム神経科学

キーワード：光遺伝学 シグナル伝達 *C. elegans* 光誘導性二量体化システム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は無数の細胞内シグナル伝達系を利用することにより、増殖や走性などの機能を示す。さらに、細胞は集団あるいはネットワークにおいても同様に細胞内シグナル伝達系を介して相互作用し、結果的にそれらが多細胞生物の行動や生理として表現される。その細胞内シグナル伝達系を自在に操作することができれば、分子と表現型の定量的な関係性を明らかにすることができ、それをさらに生物理論的解析に用いればその分子の生命システムとしての理解と相互作用しうる分子の予測が可能になるかもしれない。しかし、それを操作するための技術については発展途上の段階にある。

近年、光受容タンパク質を利用してタンパクの二量体化を ON/OFF に切り替えることができる光誘導性二量体化 (Light-Induced Dimerization, LID) システムが多数開発された。それらは主に、LOV (light-oxygen-voltage) ドメイン、PhyB (Phytochrome B)、CRY2 (Cryptochrome 2) もしくは Dronpa を利用したものであり、PhyB 以外のものは青や紫の波長の光で駆動する (Tischer D & Weiner OD 2014)。既報のシグナル伝達プローブ (FRET プローブなど) や光遺伝学ツールは青や紫の波長で駆動するため、上に挙げた LID システムのほとんどはシグナル伝達を可視化するプローブやチャンネルロドプシンと併用することができない。唯一の例外が、PhyB を使ったシステムであり赤外領域で駆動するため、紫～赤色の波長領域で機能する様々なプローブなどとの併用が可能である。

PhyB システムでは、発色団である Phycocyanobilin (PCB) と共有結合した PhyB と Phytochrome Interacting Factor (PIF) が赤色光の照射によりヘテロ二量体を安定的に形成し、近赤色光の照射によってヘテロ二量体が急速に解離する (Ni M et al. 1999)。このシステムは、特に多細胞生物における分子と表現型の定量的解析に応用できる可能性を秘めている。例えば、多くの動物は紫～青色波長の光に反応し忌避反応を示すため、赤外光で駆動する PhyB-PIF システムを用いればそのような干渉がない自然に近い状態で分子の光操作ができる。さらに、特定の時間だけその分子を活性させることが可能であるため、分子と行動 (表現型) の関係性の定量的解析にも応用できる。一方で、複雑な多細胞生物では分子、細胞、生物個体の表現型の関係性の解析や光操作の必要性も出てくる。この場合にも PhyB-PIF システムは有用で、赤外領域で駆動する PhyB-PIF システムと他の紫～赤色の光で駆動する光遺伝学ツール (チャンネルロドプシンなど) や蛍光プローブを同時に用いることで、細胞内シグナル伝達系と神経活動の同時操作や、同時に観察と操作を行うことも可能になる。このようにこのシステムは高いポテンシャルを有しているにも拘らず、多細胞生物では有効に活用されていない。

2. 研究の目的

PhyB-PIF システムを線虫 *Caenorhabditis elegans* へ導入し、それを分子と動物の表現型の定量的解析へ応用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PhyB-PIF システムの線虫への導入および機能確認

PhyB-PIF システムを機能させるには、発色団である Phycocyanobilin (PCB) を外部から導入する必要がある。そこで、まずは精製 PCB を外部から添加した時に線虫の体全体へ浸透するかそれを餌に混ぜて検証した。検証には、PhyB の変異体でかつ PCB を結合すると赤色光で励起するとそれより比較的赤色光を発する PhyB Y276H を線虫の腸管、神経系および筋肉に発現させて用いた。

PCB の細胞内合成には 4 つの遺伝子 (PcyA, HO1, Fd, Fnr) を線虫に導入した。

PhyB-PIF システムの機能確認には、多量体タンパク質 (multimeric proteins, MP) を用いた。PIF は MP に融合させておくことによりクラスターを形成させておき、GFP で標識された PhyB は細胞質に発現させる。赤色光照射後 PhyB-PIF はクラスターを形成し、近赤外光照射後そのクラスターは解消されることが期待される。

(2) PhyB-PIF システムを用いた線虫における ERK-MAPK シグナル伝達の光操作

ERK の上流にある C-Ras に PhyB を融合させる一方で、PIF は MP に融合させておくことによりクラスターを形成させておく。赤色光照射後、PhyB-C-Ras と PIF-MP が凝集することにより下流の ERK-MAPK が活性化する。ERK-MAPK のリン酸化活性を同時に捉えるために、以前に開発した FRET プローブである ERKy を用いた (Tomida T*, Oda S* et al. 2012)。

4. 研究成果

最初に、線虫への PhyB-PIF システムの導入を行うことを計画しており、実際に導入することに成功した。外部添加した PCB は腸にのみしか十分浸透しなかった。そこで、4 つの遺伝子 (PcyA, HO1, Fd, Fnr) 導入による PCB 細胞内合成システムを用いたところ (Uda Y et al. PNAS 2017)、神経系、筋肉と腸管で合成された PCB が見られた。実際に、PCB が合成されている腸管内において、630 nm の赤色光で PhyB と PIF が二量体を形成し、750 nm の近赤外光でそれらが解離することを蛍光イメージングにより確認した。以上のことから、PCB を外部添加しても線虫の体内に浸透しづらいことが判明した。従って、線虫で PhyB-PIF システムを腸管以外で利用するには PCB 細胞内合成システムが必須であることが分かった。これは、他の動物でも同様かも

しれない。

次に、PhyB-PIF システムを応用して線虫の ERK-MAPK シグナル伝達経路を光操作した。ERK-MAPK は塩を受容する ASER 感覚ニューロンで機能し、塩走性行動に関わっているとされているが、塩走性行動のどの段階で機能しているかわかっていない。そこで、PhyB-PIF システムを用いて ERK-MAPK のリン酸化活性を光制御することを目指した。結果、赤色光照射後に ASER において ERK-MAPK のリン酸化活性が、対照群(補因子である PCB が導入されていない)と比較して有意に上昇することを確認した。ただし、ERK-MAPK のリン酸化活性の応答は著しく低かったため、今後は EKAREV などより感度の高いプローブを使用する必要があることがわかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Sayaka Hori, **Shigekazu Oda**, Yuji Suehiro, Yuichi Iino and Shohei Mitani. OFF-responses of interneurons optimize avoidance behaviors depending on stimulus strength via electrical synapses. *PLoS Genetics*, 14 (6), e1007477, 2018.
doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007477> 査読あり
2. **Shigekazu Oda**, Yuichi Uda Yuhei, Goto Haruko Miura and Kazuhiro Aoki. Optogenetic tools for quantitative biology: The genetically-encoded PhyB-PIF light-inducible dimerization system and its application for controlling signal transduction. *Royal Society of Chemistry, Optogenetics*, 137-148, 2018 doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.020> 査読あり
3. Youichi Uda, Yuhei Goto, **Shigekazu Oda**, Takayuki Kohchi, Michiyuki Matsuda, and Kazuhiro Aoki.
An efficient synthesis of phycocyanobilin in mammalian cells for optogenetic control of cell signalings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114 (45) 11962–11967, 2017 doi: 10.1073/pnas.1707190114 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Yoichi Uda, **Shigekazu Oda**, Yuhei Goto and Kazuhiro Aoki. Optical control of cell signaling by the fully-genetically encoded PhyB-PIF system in human cells, yeast and worms. Winter Q-Bio, 2019
2. **Shigekazu Oda**, Yu Toyoshima and Mario de Bono. Neural information processing in a taxis behavior of *C. elegans*. Winter Q-Bio, 2018 (selected talk)
3. **Shigekazu Oda**, Yu Toyoshima and Mario de Bono. Information processing mechanism underlying a perceptual change by a neuroglobin. 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2017, (invited talk)

〔図書〕(計 2 件)

1. 青木一洋、宇田耀一、**小田茂和**、後藤祐平、
「細胞外からの発色団添加を必要としない赤色光 / 近赤外光によるシグナル伝達系の光操作」
実験医学 (羊土社)「サイズ生物学」クローズアップ実験法, 36, 2018
2. 青木一洋、宇田耀一、**小田茂和**、「光誘導性二量体化による細胞内シグナル伝達経路の操作」
生体の科学 増大特集細胞多様性解明に資する光技術 見て, 動かす, 68 (5): 492-493, 2017

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。