

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19341

研究課題名(和文)脂質光遺伝学の確立

研究課題名(英文)Establishment of lipid-optogenetics

研究代表者

上田 善文(Ueda, Yoshibumi)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任研究員

研究者番号：60391877

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、光によって高時間分解能で脂質分子を産生するための技術、即ち「脂質光遺伝学」の確立を目指した。スフィンゴシン1リン酸やホスファチジルイノシトールリン脂質(PIP3)を始めとした機能性脂質分子のための光遺伝学ツールを作製し、細胞、組織、動物個体に応用することで、脂質の理解を深め、将来の薬剤の開発などにつなげる。PIP3に関して、光遺伝学ツールPPAP1を開発し、培養細胞レベルでのPIP3の機能解析を行った。光によって、PIP3を産生し、ラメリポディアや細胞膜の伸展を誘導することができた(Anal Sci. 2019 Jan 10;35(1):57-63.)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、がん、認知症などに関与する機能性脂質分子PIP3を、光で制御する光遺伝学ツールを開発し、これを用いてPIP3が、がんの転移や創傷治癒に関与するラメリポディアを誘導することができた。現在までに、培養細胞レベルで評価を行ったが、より高次の組織、マウスなどの個体への応用も進行中である。近年では、がん療法などが優れた効果を示しているように、光を用いた治療は進歩していくと考えられる。本研究で開発したPPAP1も基礎研究のみならず将来の治療応用の可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文): This study aimed to establish a technique for producing lipid molecules with high time resolution by light, that is, "lipid optogenetics". By creating optogenetic tools for functional lipid molecules such as sphingosine 1-phosphate and phosphatidylinositol phospholipids (PIP3) and applying them to cells, tissues and individual animals, we will deepen understanding of lipids and could develop drugs in future. Regarding PIP3, we developed an optogenetics tool PPAP1 and analyzed the function of PIP3 at the culture cell level. By light, it was possible to produce PIP3 and induce lamellipodia and cell membrane extension (Anal Sci. 2019 Jan 10; 35 (1): 57-63.)

研究分野：分析化学

キーワード：光遺伝学 脂質 細胞生物学 シグナル伝達 がん 細胞運動 光

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜を構成する脂質分子は、細胞内外の隔離機能のみならず、一過性に細胞膜の局所で産生され、細胞内シグナル伝達を誘導する。さらには、細胞外にも放出されパラクライン作用を示すため、極めて多岐に渡る細胞応答を制御する。従来までの脂質の量をコントロールするための手法として、脂質産生および分解酵素の阻害剤や RNA 干渉法が用いられてきたが、空間的および時間的な制御の精度の甘さが、脂質の機能を正確に理解するうえで克服すべき問題であった。

近年、神経分野でチャンネルロドプシンに端を発する光遺伝学が発展し、神経回路ネットワークの解明に多大なる貢献をした。さらに、非チャンネルロドプシン型の光遺伝学ツール、即ち光依存的に相互作用を誘導する CRY2-CIB, iLID(自己集合)システムなどが開発されており、今後進展する分野である。申請者が当時所属していた研究室では、光遺伝学研究に取り組んでいたこともあり、精力的に脂質光遺伝学研究を推進できる背景があった。(Nat Commun. 2015 Feb 24;6:6256, Nat Biotechnol. 2015 Jul;33(7):755-60)。

### 2. 研究の目的

細胞の機能に重要な役割を果たす機能性脂質に、この技術を応用し、光で制御する「脂質光遺伝学」を確立し、高時間分解能で脂質の量を制御する技術の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

非チャンネルロドプシン型の光遺伝学ツールにおいては、2つのタンパク質から構成され(例えば、CRY2 システムでは、CRY2 および CIBN)、青色光依存的に結合解離する。これらの特徴は、CRY2 と CIBN の結合解離を数十秒で誘導することができ、かつ、可逆的である点である。そこで、機能性脂質分子、ホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸(PIP3)を光で、素早く産生させるツールを、CRY2 システムを基に作製した。即ち、CRY2 に PIP3 産生酵素である PI3K と結合することが知られている iSH ドメインを連結し(CRY2-iSH)、一方、CIBN は膜に結合させた。遺伝子工学的に、この2つのプラスミドを作製し、培養細胞に発現させた。青色光依存的に、CRY2-iSH が膜に移行するかを観察し、PIP3 が産生するかを、PIP3 によって活性化される Akt のリン酸化を指標に評価する方法、さらには、PIP3 に選択的に結合する PH ドメイン(PIP3 プローブ)を同時に細胞に発現し、その膜への局在変化によって判断する方法によって、PIP3 光遺伝学ツールが機能するかを評価した。この PIP3 光遺伝学ツールを PPAP1.0(PIP3 production by photo-activated PI3K)と命名し、PIP3 依存的な細胞機能を検証した。

### 4. 研究成果

本研究は光によって高時間分解能で細胞内に脂質分子を産生するための技術、即ち「脂質光遺伝学」の確立を目指している。そのターゲットとして、細胞増殖を制御するスフィンゴシン 1 リン酸や細胞分化、細胞運動を制御するホスファチジルイノシトールリン脂質(PIP)を始めとした機能性脂質分子を行った。PIP3 に関しては、CRY2 を基にした光遺伝学ツール(PPAP1.0)が、青色光依存的に PIP3 を産生することを、PIP3 シグナルの下流に存在する Akt タンパク質のリン酸化の増加を指標に明らかにした。また、PIP3 に選択的に結合する PH ドメイン(PIP3 プローブ)を PPAP 発現細胞に導入し、PIP3 の産生を確認したところ、青色光依存的に PIP3 プローブが膜に移行することがわかった。PPAP1.0 が適切に機能することが明らかになったため、PIP3 産生に伴い、どのような細胞機能が誘導されるのかを検証した。細胞の局所に青色光を照射するとその領域のみで PIP3 を産生させ、ラメリポディアや細胞膜の伸展を誘導することができた(Ueda Y. et. al. Anal Sci. 2019 Jan 10;35(1):57-63.)。現在、さらに機能向上を目指して PPAP2 を開発し、マウスを始めとした個体への応用を目指している。スフィンゴシン 1 リン酸の光遺伝学ツール(S1Popto)に関しては、この3年間で、プロトタイプは作製した。現在、機能の向上を目指すために様々なツールのカスタマイズを遂行中である。今後は、より良いツールを作製し S1P opto を発現したメラノーマ細胞などをマウスの皮下などに移植して、青色光有無によって、形成される腫瘍が如何に変化するのかを明らかにしていく予定である。さらに、腫瘍の周辺の微小な転移巣を 2 光子顕微鏡で観察することも行う。その準備として、既に 2 光子顕微鏡を用いた研究成果も出始めている(Ueda Y. et. al. Sci Rep. 2018 Mar 5;8(1):3978., FASEB J. 2020 Mar;34(3):3838-3854.)。

また、研究費をいただいている期間(2018-2020年)に、光遺伝学に関する論文を5報報告した。

(1)ACS Synth Biol. 2017 Jun 16;6(6):1086-1095. (2) Biochem Biophys Res Commun. 2018 ChemBiochem. 2018 Jun 18;19(12):1217-1231. (3) Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Apr 23;116(17):8301-8309. (4) Int J Mol Sci. 2019 Jun 15;20(12):2935. (5) Nat Chem Biol. 2019 Sep;15(9):882-888.

また、共同研究でもかなり共著で6方論文を報告した。

(1) Oncotarget. 2017 Dec 20;9(2):2553-2564. (2) BMC Gastroenterol. 2018 Jul 17;18(1):117.

(3) J Biochem Mol Toxicol. 2019 May;33(5):e22288. (4) Acta Biomater. 2019 Apr 1;88:383-391.  
(5) Oncol Lett. 2019 Aug;18(2):1557-1563. (6) Cancer Sci. 2019 Dec;110(12):3708-3717.  
上記のことより、本研究成果として、優れた結果を示せたと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fushimi Keiji, Miyazaki Takatsugu, Kuwasaki Yuto, Nakajima Takahiro, Yamamoto Tatsuro, Suzuki Kazushi, Ueda Yoshibumi, Miyake Keita, Takeda Yuka, Choi Jae-Hoon, Kawagishi Hirokazu, Park Enoch Y., Ikeuchi Masahiko, Sato Moritoshi, Narikawa Rei	4. 巻 23
2. 論文標題 Rational conversion of chromophore selectivity of cyanobacteriochromes to accept mammalian intrinsic biliverdin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1818836116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Shota, Iwamaru Yoshifumi, Shimizu Yoshihisa, Ueda Yoshibumi, Sato Moritoshi, Yamaguchi Kazuo, Nakanishi Jun	4. 巻 88
2. 論文標題 Epidermal growth factor-nanoparticle conjugates change the activity from anti-apoptotic to pro-apoptotic at membrane rafts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 383 ~ 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2019.02.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugimoto Naotoshi, Matsuzaki Kentaro, Katakura Masanori, Nakamura Hiroyuki, Ueda Yoshibumi, Yachie Akihiro, Shido Osamu	4. 巻 -
2. 論文標題 Heat attenuates sensitivity of mammalian cells to capsaicin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biochemical and Molecular Toxicology	6. 最初と最後の頁 e22288 ~ e22288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbt.22288	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 UEDA Yoshibumi, II Tatsuhiro, AONO Yuki, SUGIMOTO Naotoshi, SHINJI Seiichi, YOSHIDA Hiroshi, SATO Moritoshi	4. 巻 35
2. 論文標題 Membrane Dynamics Induced by a Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Optogenetic Tool	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 57 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.18SDP06	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinji Seiichi, Ueda Yoshibumi, Yamada Takeshi, Koizumi Michihiro, Yokoyama Yasuyuki, Takahashi Goro, Hotta Masahiro, Iwai Takuma, Hara Keisuke, Takeda Kohki, Okusa Mikihiro, Kan Hayato, Uchida Eiji, Yoshida Hiroshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Male sex and history of ischemic heart disease are major risk factors for anastomotic leakage after laparoscopic anterior resection in patients with rectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12876-018-0846-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Yoshibumi, Sato Moritoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Induction of Signal Transduction by Using Non-Channelrhodopsin-Type Optogenetic Tools	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1217 ~ 1231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201700635	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Yoshibumi, Ishiwata Toshiyuki, Shinji Seiichi, Arai Tomio, Matsuda Yoko, Aida Junko, Sugimoto Naotoshi, Okazaki Toshiro, Kikuta Junichi, Ishii Masaru, Sato Moritoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 In vivo imaging of T cell lymphoma infiltration process at the colon	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-22399-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Yoshibumi, Ishiwata Toshiyuki, Shinji Seiichi, Arai Tomio, Matsuda Yoko, Aida Junko, Sugimoto Naotoshi, Okazaki Toshiro, Kikuta Junichi, Ishii Masaru, Sato Moritoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 In vivo imaging of T cell lymphoma infiltration process at the colon	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-22399-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shinji Seiichi, Ueda Yoshibumi, Yamada Takeshi, Koizumi Michihiro, Yokoyama Yasuyuki, Takahashi Goro, Hotta Masahiro, Iwai Takuma, Hara Keisuke, Takeda Kohki, Okusa Mikihiro, Kan Hayato, Uchida Eiji	4. 巻 9
2. 論文標題 Combined use of preoperative lymphocyte counts and the post/preoperative lymphocyte count ratio as a prognostic marker of recurrence after curative resection of stage II colon cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 2553-2564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.23510	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Yoshibumi, Sato Moritoshi	4. 巻 unknown
2. 論文標題 Cell membrane dynamics induction using optogenetic tools	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.11.091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Y, Sato M.	4. 巻 unknown
2. 論文標題 Induction of signal transduction using non-channelrhodopsin-type optogenetic tools	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chembiochem.	6. 最初と最後の頁 unknown
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201700635	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yoshibumi Ueda
2. 発表標題 Lipid control by optogenetics
3. 学会等名 3rd International symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田善文
2. 発表標題 シンポジウム2 「脂質テクノロジー」 脂質光遺伝学の確立
3. 学会等名 JCBL: 第60回 日本脂質生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田善文
2. 発表標題 マウスin vivoイメージングを用いた動的病理学
3. 学会等名 第2回 東京理科大学薬学部・獨協医科大学埼玉医療センター学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ueda Y., Shinji S., Matsuda Y., Arai T., Aida J., Ishiwata T.
2. 発表標題 免疫を有するマウスにおける悪性リンパ腫の大腸の粘膜層への浸潤、転移巣形成の動態可視化法の確立
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ueda Y., Shibusawa M., Shinji S., Matsuda Y., Sugimoto N., Sato M., Ishiwata T.
2. 発表標題 2光子顕微鏡生体内イメージングによる免疫を込みにしたがん浸潤転移の動態解明 - 大腸上皮下がん浸潤の観察
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----