

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23716

研究課題名（和文）シグナル増幅法を組み合わせた赤色光作動性の新規遺伝子発現制御システムの開発

研究課題名（英文）Development of a red-light controllable gene expression system in combination with signal amplification approaches

研究代表者

河野 風雲（Kawano, Fuun）

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：20786090

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 200,000 円

研究成果の概要（和文）：ピリン系補因子ビルベリジンを捕因子として結合する放射線耐性細菌由来の赤色光受容体バクテリアフィトクロムDrBphPとLexA DNA結合ドメイン，そして転写因子VP16を組み合わせたキメラタンパク質を開発することによって，赤色光照射依存的に遺伝子発現を誘導できることを実証した．また一方で，フィコシアノピリンを捕因子とするシアノバクテリア由来の赤色光受容体バクテリアフィトクロムCph1を基盤とすることで，dark-leakiness（光が照射されていない暗所での遺伝子発現の漏れ）が劇的に改善された赤色光遺伝子発現制御技術開発の可能性を見出した．

研究成果の学術的意義や社会的意義

赤色光での光制御技術は，現在の光遺伝学において大部分を占める青色光での光制御技術の問題点である哺乳動物での生体組織透過性の低さを克服できる可能性を秘めている．本研究で開発した遺伝子発現制御技術は，組織透過性の高い赤色光に应答する光受容体を基盤としているため，生きた哺乳動物生体内で実用的な光遺伝学の技術として，臓器再生医療や様々な疾患治療法など，これまでの光遺伝学が応用困難であった未開拓の研究領域に応用する展開が期待される．

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that a developed system, which is a chimeric protein consisting of red-light photoreceptor phytochrome DrBphP derived from *Deinococcus radiodurans*, the LexA DNA binding domain, and the transcription factor VP16, can induce gene expression in a red-light illumination-dependent manner. In addition to that, we found that dark-leakiness associated with red-light photoswitch systems can be overcome by developing another system, which is a chimeric protein based on the red-light photoreceptor phytochrome Cph1 derived from *Cyanobacteria*.

研究分野：合成生物学

キーワード：光遺伝学 遺伝子発現制御 赤色光 シグナル増幅法 タンパク質工学

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、植物や菌類、バクテリアが有する光応答性のタンパク質、いわゆる光受容体を用いて「光」を使って「生体分子の機能や局在、遺伝子発現を操作」する技術、いわゆる光遺伝学が目覚ましい発展を遂げている。この光遺伝学の技術は、生きた細胞内で生体分子の挙動を任意のタイミングと領域で自由自在に操作することを可能にし、その動態を可視化するだけでは理解が困難であった細胞現象・生命現象に対して、新しい解決の糸口を見出す強力な手法として、現在、生命科学研究領域で大きく期待されている。この光遺伝学の技術開発が 2009 年に始まって以来、現在までに多くの光遺伝学の技術が開発されてきており、その中には非常に強力で有能なものも多数報告されている (Ueda et al., ChemBioChem 2018)。しかしながら、それらのほとんど大部分は 470 nm 付近の波長である電磁波に応答する青色光受容体を基盤とした技術であるため、生体組織透過性が低いマウスなどの哺乳動物モデル生物への応用が著しく制限されている。その大きな理由として、青色光は生体内の血液に含まれるヘモグロビンによって吸収され、生体の深部まで光を透過させることが難しいからである (Patterson et al., Lasers Med. Sci. 1991)。そのため現在の光遺伝学の技術は、顕微鏡下などの自由に光を照射可能な培養細胞レベルでは多数の応用例がある一方で、in vivo への応用例は極めて少ないという事実がある。こうした青色光による組織透過性の問題は現在の光遺伝学が抱える非常に大きな課題の一つである。したがって、「生体の窓」と呼ばれる 650~1000 nm 付近の組織透過性の高い波長である電磁波 (赤色光から近赤外光と呼ばれる光) に応答する光受容体を基盤とする光遺伝学の技術開発が現在強く望まれている。

2. 研究の目的

そこで本研究ではまず、ビリリン系補因子ビルベリジンを捕因子として結合する放射線耐性細菌由来の赤色光受容体バクテリアフィトクロム DrBphP を用いて、赤色光で操作可能な赤色光作動性の新規遺伝子発現制御システムの開発を目的とした。当該光受容体と LexA DNA 結合ドメインを融合させることで、光依存的な特定の DNA 配列への結合原理を用いた独創性の高い光遺伝学の基盤技術開発を目指した。そして、この赤色光による動作原理をもとに、DrBphP-LexA キメラタンパク質に転写因子 VP16 を融合させ、赤色光作動性の遺伝子発現制御システムの開発を目指した。DrBphP-LexA を基盤とした遺伝子発現制御技術は、光依存的にホモ二量体を成す双方の光受容体が光活性化状態を維持する必要があるため、高い光誘導効率を得ることが難しいことが潜在的な懸念として予想される。したがって、SunTag 系を応用したシグナル増幅法を組み合わせ (Tanenbaum et al., Cell 2014)、シグナル (遺伝子発現) を劇的に増幅させた遺伝子制御システムを開発することによって、転写因子を多数集積させ遺伝子発現を劇的に増幅させる技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではまず、タンパク質の結晶構造情報を基にした合理的な分子設計を行った。近年、放射線耐性細菌由来の赤色光受容体バクテリアフィトクロム DrBphP の結晶構造 (特に暗状態と明状態の両方において) が報告されている (Takala et al., Nature 2014)。DrBphP は暗所での光不活性状態 (暗状態) ではホモ二量体を形成しており、互いの C 末端領域が 1.17 nm と極めて近い場所に位置するが、赤色光を照射された光活性化状態 (明状態) ではホモ二量体形成を維持しつつも、互いの C 末端領域は 4.71 nm の離れた場所に位置していることを発見した。本研究では、この光依存的な大きな構造変化を利用するために、DrBphP の C 末端を自身の N 末端と融合可能な DNA 結合タンパク質として、LexA に着目した (Zhang et al., Nature 2009)。LexA が、SOS ボックスと呼ばれる特定の DNA 配列と結合するためには、互いの N 末端領域が 4.97 nm 離れた状態のホモ二量体を形成する必要がある。したがって、DrBphP と LexA の融合タンパク質は赤色光を照射された時のみ、DNA に結合することが可能な分子設計であると考えた。

本研究では、DrBphP と LexA の間の融合部分のアミノ酸残基の配列を探索し、光依存的に SOS ボックスに結合することが可能なキメラ変異体の開発を行った。この動作原理を基に、DrBphP-LexA キメラタンパク質に転写因子 VP16 を融合させ、赤色光作動性の遺伝子発現制御システムを開発した。DrBphP-LexA の欠点として、ホモ二量体を形成している双方が光活性化状態を要するため、光応答性が悪いことが予想された。SunTag 系を応用したシグナル増幅法を組み合わせることによって (Tanenbaum et al., Cell 2014)、シグナル (遺伝子発現) を劇的に増幅させた遺伝子制御システムの開発を遂行した。転写因子を多数集積することによってシグナルが増幅され遺伝子発現の光誘導効率が劇的に向上することが期待された。

4. 研究成果

ビリリン系補因子ビルベリジンを捕因子として結合する放射線耐性細菌由来の赤色光受容体バクテリアフィトクロム DrBphP を用いて、赤色光で制御可能な赤色光作動性の新規遺伝子発現制御

システムの開発を進めた。まず、当該光受容体のホモ二量体構造と LexA DNA 結合ドメイン構造の情報を基に、赤色光を照射した時のみ DrBphP と LexA の融合タンパク質が DNA に結合することが可能な分子設計を合理的に行った。この動作原理を基に、DrBphP-LexA 融合タンパク質にさらに転写因子 VP16 を融合させたマルチキメラタンパク質を作製した。当該コンストラクトを哺乳類細胞株に遺伝子導入し、赤色光照射を行ったところ、レポーター遺伝子であるホタルルシフェラーゼ (Fluc) による生物発光の変化が光依存的に確認され、遺伝子発現を赤色光の照射で自在に制御できることを示された(図1)。今後、開発した当該技術を基盤に、シグナル増幅法を組み合わせることによって光誘導効率を改善し、哺乳動物生体内で遺伝子発現の赤色光操作を高い効率で実現する光遺伝学が期待される。

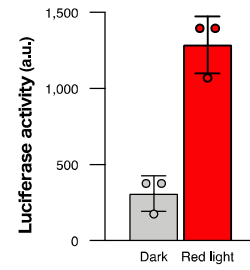


図1. 赤色光照射によるレポーター遺伝子**Fluc**の発現誘導の結果

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------