

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19250

研究課題名（和文）ホログラフィック光刺激・イメージングによる低分子ホルモンの全身移動制御と機能解明

研究課題名（英文）Holographic stimulation and imaging of systemic movement and function of the small-molecule hormone

研究代表者

玉田 洋介（Tamada, Yosuke）

宇都宮大学・工学部・准教授

研究者番号：50579290

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）：コケ植物ヒメツリガネゴケに赤外レーザー誘起遺伝子発現操作法（IR-LEGO）を適用する研究を進めた結果、遺伝子発現を誘導しつつ細胞へのダメージがほとんど観察されない赤外レーザー照射条件を明らかにした。さらに、単一の細胞への加温に対する遺伝子発現誘導を数理的にモデル化することに成功した。これらの結果は、ホログラフィックIR-LEGOによって複数の細胞に遺伝子発現を誘導する際のレーザー照射条件の決定に必要な知見を提供すると思われる。また、自作のIR-LEGOを研究室に構築し、このIR-LEGOをベースにホログラフィックIR-LEGOを構築する研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命科学において遺伝子の機能喪失・獲得実験は必要不可欠であるが、多くの実験系では個体の全細胞や多数の細胞で機能喪失・獲得が行われてしまうため、しばしば遺伝子の機能を正確に解明することが難しい。本研究によってヒメツリガネゴケの任意の細胞において遺伝子発現を誘導することが可能になれば、遺伝子の機能をより正確に解明できることが本研究の学術的意義である。また、計算機合成ホログラムを介して赤外レーザーを入射し、3次元に存在する複数細胞を同時に操作できるようになれば、顕微鏡の2次元性から解放された細胞操作系を確立できることが学術的意義である。

研究成果の概要（英文）：We applied Infrared laser-evoked gene operator (IR-LEGO) to the moss *Physcomitrium patens*. Using the transgenic *P. patens* in which the yellow fluorescent protein gene is driven under a heat shock promoter, we optimized the infrared laser irradiation conditions. We have clarified the conditions that induce gene expression effectively without observable damage to living cells. In addition, using the expression of fluorescent proteins as an indicator, we performed mathematical modeling of the induction of gene expression driven by the heat shock promoter in response to heating of a single cell. These results will provide essential knowledge for determining the laser irradiation conditions to induce gene expression in multiple cells by holographic IR-LEGO. In addition, we have constructed IR-LEGO in our laboratory, and are now conducting research to construct a holographic IR-LEGO.

研究分野：植物発生生物学

キーワード：ホログラフィー 光細胞刺激 IR-LEGO 生細胞イメージング オーキシン 3D 近赤外フェムト秒レーザー

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

ホログラフィーとは、光の振幅と位相の両方の情報を2次元媒体(ホログラム)に記録し、そのホログラムから記録した光波を再生する技術である。そのため、光の強度のみを記録する通常のイメージングと異なり、物体の3次元情報を2次元のホログラムに記録し、さらにそのホログラムから物体の3次元情報を再生することができる。現在、1枚のホログラムをデジタル撮像素子で記録し、計算機内で3次元情報を再構成するデジタルホログラフィーと、ホログラムを計算機内で設計して空間光変調器に表示し、そこにレーザー光を入射することで3次元の光パターンを自在に照射する計算機合成ホログラムの研究が活発に行われている。こうした原理から、計算機合成ホログラムを赤外レーザー誘起遺伝子発現操作法(IR-LEGO)に適用することで、3次元組織に存在する特定の細胞のみを赤外レーザーで加温刺激し、遺伝子発現を操作することが可能となる。

IR-LEGO (Kamei et al. 2009) とは、赤外レーザーを照射して任意の細胞を加温し、遺伝子発現を操作する手法である。熱応答性プロモーター下流に発現誘導する遺伝子を挿入して生物に遺伝子組換えによって導入しておくことで、細胞の加温による遺伝子発現誘導が可能になる。細胞の加温による遺伝子発現誘導の効率は生物種や組織ごとに異なるため、遺伝子発現を効率的に誘導しつつ細胞へのダメージが小さい赤外レーザー照射条件の条件検討を行う必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究は、ホログラフィー光学系をIR-LEGOに設置したホログラフィックIR-LEGOを構築し、3D光細胞刺激と経時的3Dイメージングを行うことで、生命現象を自在に制御し観察することを目的とした。本研究では特に、移動性低分子植物ホルモンであるオーキシンに着目し、3D光細胞刺激によってオーキシンの生合成や移動を植物体内で制御するとともに、経時的な3Dイメージングによってオーキシンの応答を解明することを目標とした。

### 3. 研究の方法

研究材料として、主にコケ植物ヒメツリガネゴケを用いた。ヒメツリガネゴケは、ゲノム配列の解読が完了していることに加え、高い相同組換え効率を有するモデル植物である。さらに、栄養組織である原糸体や茎葉体の葉の細胞のサイズが大きいためレーザーを照射しやすく、陸上植物の中では細胞運命が明瞭であるため、IR-LEGOによって遺伝子発現を誘導した後の細胞運命の変化を観察しやすいという特長を有する。本研究では、熱応答性プロモーターの下流に蛍光タンパク質遺伝子をつないで導入したヒメツリガネゴケ形質転換株(HSPpro:NLS-mYFP-GUS株)の原糸体細胞および葉細胞に赤外レーザー(1,456 nm; BL1456-PAG500, Thorlabs)を照射し、蛍光顕微鏡を用いて経時的に蛍光・明視野イメージングを行うことで蛍光タンパク質の発現誘導と細胞へのダメージの有無を観察した。

### 4. 研究成果

(1) 研究協力者の友井 拓実 博士、坂本 丞 博士、研究分担者の亀井らと共同で、ヒメツリガネゴケにIR-LEGOを適用する研究を進めた。ヒメツリガネゴケ HSPpro:NLS-mYFP-GUS 株の細胞に対して、レーザーパワーや照射時間について複数の条件で赤外レーザーを照射し、蛍光タンパク質の発現と細胞の状態や成長について経時的イメージングを行った。その結果、遺伝子発現を誘導しつつ細胞へのダメージがほとんど観察されないIR-LEGOの赤外レーザー照射条件を明らかにした。さらに、蛍光タンパク質の発現を指標として、単一の細胞への加温に対する熱応答性プロモーターによる遺伝子発現誘導を数理的にモデル化することに成功した。これらの結果は、ホログラフィックIR-LEGOによって複数のヒメツリガネゴケ細胞に遺伝子発現を誘導する際のレーザー照射条件の決定に必要な不可欠な知見を提供すると考えられる。

(2) 坂本博士との共同研究のもと、自作のIR-LEGOを研究室に構築した。光学系を図1に示す。吉田 優佳 大学院生(宇都宮大学)、友井博士との共同研究のもと、このIR-LEGOを用いて、まずレーザー発振器に流す電流と対物レンズ付近の出力との関係を明らかにした。そのうえで、(1)で明らかにした遺伝子発現誘導に最

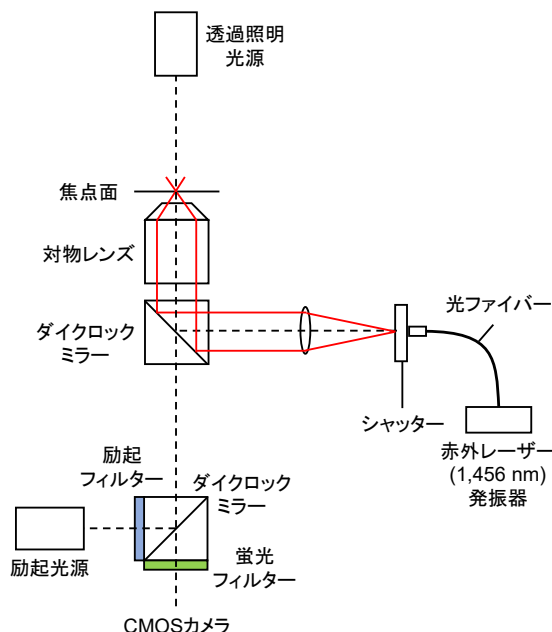


図1 自作IR-LEGOの光学系

適なレーザーパワーに対応する電流を流して HSPpro:NLS-mYFP-GUS 株の原系体細胞・葉細胞に対して赤外レーザーを照射した。その結果、蛍光タンパク質遺伝子の発現を誘導することに成功した(図2)。この IR-LEGO をベースにホログラフィック IR-LEGO を構築する研究を長谷川 智士博士、早崎 芳夫 博士と進めている。

(3) オーキシン生合成遺伝子、オーキシン輸送遺伝子をそれぞれ蛍光タンパク質遺伝子と結合させ、熱応答性プロモーターの下流につないでヒメツリガネゴケオーキシン応答レポーター株に導入した株について、熱ショックによる遺伝子発現誘導の解析を行った。また、IR-LEGO による細胞操作のモデルケースとして、任意の分化細胞に幹細胞化遺伝子の発現を誘導し、幹細胞化を引き起こすことを試みた。植物体全体を繰り返し加温することで分化細胞の幹細胞化を誘導できた一方で、一度の赤外レーザー照射では幹細胞化を誘導できなかったことから、幹細胞化の誘導には同じ細胞に対して複数回の赤外レーザー照射が必要であると考えられた。本研究の目標達成のためにも、効率的、継続的かつ低侵襲に遺伝子発現を誘導できる複数回の赤外レーザー照射条件の検討が必要である可能性が示唆された。

(4) 友井博士、亀井らを中心とした研究グループによって、被子植物シロイヌナズナに IR-LEGO を適用する研究を行った。IR-LEGO と薬剤制御系を組み合わせ、特定の細胞でのみ Cre 遺伝子の発現を誘導して Cre-loxP システムによる組換えを効率的に引き起こす赤外レーザー照射条件を数理解析によって解明した。この条件では、細胞死を伴うことなく、根や葉の様々な細胞にて Cre-loxP システムによる組換えを誘導することが可能であった。本結果は、IR-LEGO を用いてシロイヌナズナの局所的な細胞に遺伝子組換えを効率的に誘導する基盤となると考えられる。

(5) 3D 光細胞刺激の新展開として、長谷川博士、早崎博士との共同研究のもと、近赤外フェムト秒レーザーを自然に生育した状態のままのヒメツリガネゴケ葉に入射して細胞レベルで葉を切断し、幹細胞化を誘導する研究を行った。その結果、ヒメツリガネゴケ葉細胞を効率的に切断できるレーザーパワーを解明した。

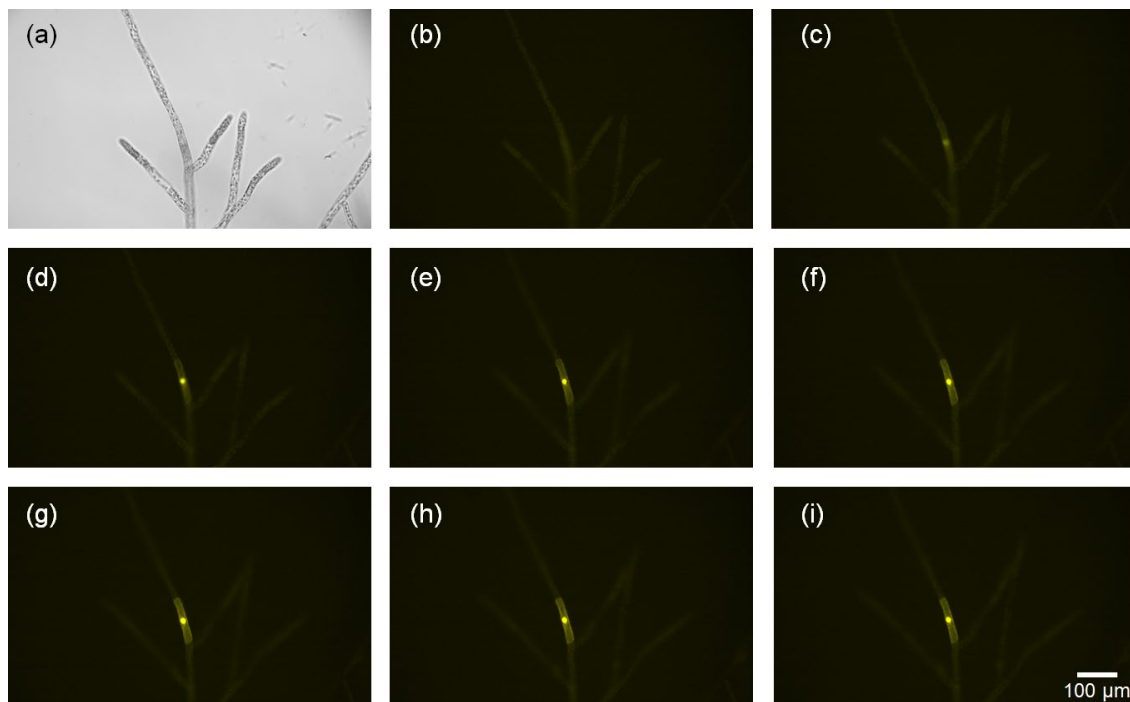


図2 IR-LEGO を用いた赤外レーザー照射後の HSPpro:NLS-mYFP-GUS 株原系体の像 (吉田 優佳 2023, 修士論文)

照射後3時間の明視野像 (a)、照射後3時間から1時間毎に撮影した蛍光像 (b-i) をそれぞれ示す。

#### <引用文献>

- ① Kamei Y, Suzuki M, Watanabe K, Fujimori K, Kawasaki T, Deguchi T, Yoneda Y, Todo T, Takagi S, Funatsu T, Yuba S (2009) Infrared laser-mediated gene induction in targeted single cells *in vivo*. Nat Methods 6: 79-81. doi: 10.1038/nmeth.1278.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomoi T, Tameshige T, Betsuyaku E, Hamada S, Sakamoto J, Uchida N, Torii KU, Shimizu KK, Tamada Y, Urawa H, Okada K, Fukuda H, Tatematsu K, Kamei Y, Betsuyaku S	4. 巻 14
2. 論文標題 Targeted single-cell gene induction by optimizing the dually regulated CRE/loxP system by a newly defined heat-shock promoter and the steroid hormone in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	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） 10.3389/fpls.2023.1171531	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15件（うち招待講演 4件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yuka Yoshida, Takumi Tomoi, Chizuru Numata, Suguru Ohe, Joe Sakamoto, Yasuhiro Kamei, Yosuke Tamada
2. 発表標題 Local gene induction by IR-LEGO to trigger stem cell formation in a moss plant
3. 学会等名 Biomedical Imaging and Sensing Conference 2022 (BISC2022)（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沼田千鶴, 中村真菜, 友井拓実, 吉田優佳, 梶川育見, 坂本丞, 亀井保博, 玉田洋介
2. 発表標題 カロテノイド生合成経路遺伝子の破壊によるヒメツリガネゴケの赤外光誘導遺伝子操作法構築に向けた研究
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飛田拓海, 椎名謙介, 友井拓実, 壁谷幸子, 長谷部光泰, 豊田正嗣, 早崎芳夫, 長谷川智士, 玉田洋介
2. 発表標題 近赤外フェムト秒レーザーを用いたCa <sup>2+</sup> シグナル伝搬の観察
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 友井拓実, 爲重才覚, 吉田優佳, 坂本丞, 立松圭, 別役重之, 玉田洋介, 亀井保博
2. 発表標題 赤外レーザー照射による局所加熱を利用した植物細胞における遺伝子発現誘導法
3. 学会等名 日本光学会年次学術講演会Optics & Photonics Japan 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 椎名謙介, 長谷川智士, 飛田拓海, 初見洲人, Nan Gu, 早崎芳夫, 玉田洋介
2. 発表標題 近赤外フェムト秒レーザーを用いた植物の切断による幹細胞化の誘導
3. 学会等名 日本光学会年次学術講演会Optics & Photonics Japan 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 友井拓実, 吉田優佳, 爲重才覚, 坂本丞, 立松圭, 別役重之, 亀井保博, 玉田洋介
2. 発表標題 赤外光による加温を利用した植物の遺伝子操作とその農学的応用
3. 学会等名 宇都宮大学第3回コラボレーションフェア
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沼田千鶴, 中村真菜, 友井拓実, 吉田優佳, 坂本丞, 亀井保博, 玉田洋介
2. 発表標題 光を用いたヒメツリガネゴケのゲノム操作法の確立に向けたカロテノイド生合成経路遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takumi Tomoi, Joe Sakamoto, Suguru Ohe, Yosuke Tamada, Yasuhiro Kamei
2. 発表標題 Application of infrared laser to living cells for manipulation of gene expression and in vivo temperature measurement method
3. 学会等名 Biomedical Imaging and Sensing Conference 2021 (BISC2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manoj Kumar, Osamu Matoba, Xiangyu Quan, Yasuhiro Awatsuji, Yosuke Tamada
2. 発表標題 Decoupling the refractive index and thickness by dual-wavelength digital holographic microscopy
3. 学会等名 SPIE Optics + Optoelectronics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 友井拓実, 吉田優佳, 大江駿, 坂本丞, 玉田洋介, 亀井保博
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケにおける熱ショック応答を介した局所的遺伝子発現誘導に関する定量的解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉田洋介
2. 発表標題 植物科学を切り拓く次世代バイオイメージング法創出への挑戦
3. 学会等名 宇都宮大学 理化学研究所 ジョイントシンポジウム “植物を「観る」から農作物を「みる」へ” (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉田洋介
2. 発表標題 DNA損傷によって誘導される幹細胞化とその分子基盤解明のための新規イメージング法
3. 学会等名 第7回幹細胞研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉田洋介
2. 発表標題 天体観測に用いる補償光学を応用した深部生細胞イメージングと光細胞操作
3. 学会等名 ユークレナ研究会 第36回研究集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飛田拓海，長谷川智士，椎名謙介，初見洲人，Nan Gu，早崎芳夫，玉田洋介
2. 発表標題 近赤外フェムト秒レーザーによる自然に生育した植物の切断
3. 学会等名 日本光学会年次学術講演会Optics & Photonics Japan 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田優佳，友井拓実，大江駿，坂本丞，亀井保博，玉田洋介
2. 発表標題 コケ植物における赤外光を用いた局所的遺伝子誘導法の確立および幹細胞化誘導の試み
3. 学会等名 日本光学会年次学術講演会Optics & Photonics Japan 2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

宇都宮大学 地域創生科学研究科 光工学プログラム <a href="https://www.utsunomiya-u.ac.jp/grdc/agricultural/light_engineering.html">https://www.utsunomiya-u.ac.jp/grdc/agricultural/light_engineering.html</a> 宇都宮大学 工学部 物質環境化学コース <a href="http://www.eng.utsunomiya-u.ac.jp/course/material-and-environmental-chemistry-course/">http://www.eng.utsunomiya-u.ac.jp/course/material-and-environmental-chemistry-course/</a> 宇都宮大学 オプティクス教育研究センター (CORE) <a href="https://uu-core.com/">https://uu-core.com/</a> 宇都宮大学 ロボティクス・工農技術研究所 (REAL) <a href="https://ja-jp.facebook.com/REAL.Utsunomiya/">https://ja-jp.facebook.com/REAL.Utsunomiya/</a> 日本光学会 研究グループ <a href="http://myosj.or.jp/group/">http://myosj.or.jp/group/</a>
--

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
研究分担者	亀井 保博  (Kamei Yasuhiro)  (70372563)	基礎生物学研究所・超階層生物学センター・RMC教授   (63904)	

	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
研究協力者	友井 拓実  (Tomoi Takumi)  (70880996)	宇都宮大学・地域創生推進機構・研究員   (12201)	
研究協力者	坂本 丞  (Sakamoto Joe)  (80804145)	自然科学研究機構・生命創成探究センター・特任研究員   (82675)	
研究協力者	長谷川 智士  (Hasegawa Satoshi)  (50600558)	宇都宮大学・オプティクス教育研究センター・准教授   (12201)	



6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	早崎 芳夫  (Hayasaki Yoshio)  (10271537)	宇都宮大学・オプティクス教育研究センター・教授    (12201)	

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