

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657057

研究課題名（和文） 転写因子およびシグナル伝達因子の光による活性制御法の開発とその発生分野での応用

研究課題名（英文） Optogenetical controls of transcription factors and signaling factors used for developmental biology

研究代表者

野地 澄晴 (NOJI SUMIHARE)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号：40156211

研究成果の概要（和文）：

動物や植物の光受容体システムを用いて、転写因子および細胞質 effector 蛋白質の活性化を光で制御する動物植物系を作製することを目的として、研究をおこなった。新規光受容体として、動物の光受容体であるオプシンの一つであるオプシン5をクローニングし、その光特性を調べた。その結果、オプシン5は紫外線に反応するオプシンで、脳と眼に発現していることがわかった。イチゴの光センサーである青色光受容体フォトトロピンをクローニングし、その光特性を調べた。これらの光受容体を用いてトランスジェニック動物、植物の作製を試みた。まだ成功していないが、これら光受容体をまず神経特異的に発現させる方法を確立したい。

研究成果の概要（英文）：

In order to make transgenic animals and plants which are controlled by light, we at first cloned new receptors which respond to light from the chick and strawberry. We identified chicken opsin 5 and strawberry phototropin and attempted to use as tools for optogenetics. Although we have attempted to make transgenic crickets and transgenic strawberries, we have not succeeded yet in making the transgenic animals and plants, because of unexpected technical problems. We now continue making them.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	330,000	3,430,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分科：生物科学、細目：発生生物学

キーワード：1、オプトジェニエティクス 2、コオロギ 3、オプシン 4、ホトトロピン 5、転写因子 6、シグナル伝達因子 7、イチゴ

1. 研究開始当初の背景

動物の発生過程における遺伝子の機能を調べる方法として、遺伝子の転写やタンパク質の機能を光により制御し、その結果現われる生物現象を解析する方法が近年開発され、それらは光遺伝学 (optogenetics) 的方法とよばれている。この方法は主に神経回路機能を調べるため光学と遺伝学を融合した研究分野として発展している。特に、光を用いると哺乳類や昆虫の *in vivo* で、ミリ秒単位の時間的精度をもった制御が可能となる。このような光センサーを利用した分子機能活性化法については、2002年に、単細胞鞭毛藻であるクラミドモナスやミドリムシの光受容物質の実体が明らかにされた。それぞれチャンネルロドプシン、光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC) という全く別個の構造をもつことが知られている (渡辺正勝、鈴木武士. 共立出版「見える光、見えない光」pp96-113 (2009). (総説)). その後、それらの分子を光照射による機能発現スイッチとして利用するという研究が行われ、チャンネルロドプシンを介した光照射による神経細胞の脱分極誘導 (Ishizuka, T et al. *Neurosci Res* 54:85-94 (2006). Zhang, F et al. *Nat Rev* 8:577-581 (2007). (総説)), Gal-UAS システムを用いて PAC をショウジョウバエの脳に発現させ、光照射にともなう cAMP レベルの上昇により多動症を誘発させたという実例がある (Schroder-Lang, S et al. *Nat Methods* 4:39-42 (2007).)。従って、光によるコントロールは可能であることが示唆される。光センサーは、植物のフォトトロピンから動物の視細胞のロドプシン類まで様々なものがある。これらの一部は光コントロールの手段としてすでに利用されている。しかし、本研究が標的とする転写因子や他のシグナル系のコントロールについては報告がなかった。

2. 研究の目的

われわれは、発生過程を光により制御することで、遺伝子やタンパク質の機能を知ることが目的として、光による制御を発生学にも導入することを試みることにした。特に、発生に関与する新たな光センサーを用いることを考え、ニワトリ胚の網膜に発現する感桿型オプシン「メラノプシン」の網膜細胞分化における役割に興味をもって、研究を進めることにした (Tomonari S. et al. *Dev Dyn* 234:783-790 (2005). Tomonari S. et al. *Gene Expr Patterns* 7:746-753 (2007). Tomonari S. et al. *Dev Dyn* 237:1910-1922 (2008).)。その過程で、メラノプシン以外の機能のよくわかっていないオプシン遺伝子も、発生途上の特定の網膜細胞に発現することを見出した。それらのオプシンについて、光感受性があること

がわかってきている (未発表)。そこで、発生途上の網膜に発現する非典型オプシンの GPCR シグナル経路の機能を、異なる波長の光コントロール系で解析することを考えた。一方、植物も光センサーを持っているので、それも利用することも計画した。われわれはトランスポゾン piggyBac を用いて、トランスジェニックコオロギを作製することに成功しているので、マウスよりも維持が簡単で低コストであり、LED 光源を埋め込んで使用可能なコオロギや研究材料のイチゴを用いて応募者らのアイデアを個体レベルで試すことにした。成功すればマウスなどにおいても使用できると予想した。

3. 研究の方法

光制御による分子機能活性化法という最先端の技術をさらに発展させ、コンディショ動物や植物の光受容体システムを用いて、転写因子および細胞質 effector 蛋白質の活性化を光で制御する系を作製することを目的として、研究をおこなった。

(1) 光によるシグナル伝達系 (GPCR 系) の活性化の制御方法

オプシン-GPCR シグナル伝達経路のキーとなる分子 G 蛋白質 alpha subunits と、GPCR 共役酵素に焦点をあて、それらの分子機能を光によりコントロールする系を確立するために、まずニワトリの新規なオプシンについて調べた。まず、動物の光受容体であるオプシンの一つであるオプシン5をクローニングし、その光特性を調べた。

また、ミドリムシの光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC) を改変し、アデニル酸シクラーゼの代わりに、別の酵素、例えば、phospholipase C (PLC) の活性部位と入れ換えることにより、光活性化型 PLC を作製できると予想し、PLC についても調べた。次に網膜発生における GPCR が制御するシグナル経路の役割を明らかにするために、トランスジェニックコオロギを作製することを試みた。まず、神経系に特異的に標的タンパク質を発現させるために、エンハンサー/プロモーターをクローニングし、活性を調べた。

(2) LOV2-J alpha helix システムを用いて、転写因子および細胞質 effector 蛋白質の活性化を光で制御する方法

植物の光受容体である phototropin の発色団結合ドメイン (LOV2) と C 末端との連結部位 (J-alpha) である LOV2-J alpha を新規に得るために、イチゴの phototropin のクローニングを行った。Wu et al., (Wu, Y et al., *Nature* 461: 104-108 (2009)) の方法を参考に、以下の piggyBac コンストラクトを作製した。: UAS-LOV2-J alpha helix-homeobox および UAS-LOV2-J alpha helix-G protein alpha subunit (G 蛋白質 a サブユニットには、ニワ

トリまたはコオロギ Gq/t/o/s の構成的活性化体を用いた)。次に、このコンストラクトを含むベクターをコオロギ卵へ注入してトランスジェニック (TG) コオロギを作製するための準備として、actine-Gal4 driver line または eyeless-Gal4 driver line と交配してラインを得るために、Gal4-UAS 系のコオロギを作製した。

4. 研究成果

(1) オプシンを利用した光制御法について
新規光受容体として、動物の光受容体であるオプシンの一つであるオプシン5をクローニングし、その光特性を調べ、さらにその発現パターンを調べた。その結果、オプシン5は紫外線に反応するオプシンで、脳と眼に発現していることがわかった。これらの成果から、このオプシンを用いると紫外線に応答するシステムを構築できることがわかった。

(2) phototropin を利用した光制御法について

植物の光受容体である phototropin の発色団結合ドメイン (LOV2) とホメオボックス転写因子活性を制御するポリコム因子を用いると、光による活性化が可能となると予想した。植物光受容体システムを用いて、蛋白質の活性化を光で制御する系を作製する目的で、光に反応して赤色化するイチゴのシステムを調べた。イチゴの光センサーは青色光受容体フォトトロピンであることがわかった。このフォトトロピンをクローニングし、その光特性を調べた。イチゴの着色の光の波長依存性を調べたところ、450nm にピークがあることから、イチゴの phototropin は 450nm で応答することが示唆された。

(3) トランスジェニックコオロギの作製について

得られた新規の光受容体を用いた細胞活性化システムを作製するために、まずトランスジェニック動物、植物の作製を試みた。一つの方法として、コオロギにおいて組織/器官特異的に目的遺伝子を発現させるため、Gal4-UAS のシステムをコオロギで使用できるようにラインを開発した。特に、これまで成功している actin 遺伝子のプロモーターや eyeless 遺伝子のプロモーターを利用した actin-Gal4 driver line または eyeless-Gal4 driver line を得ることを試みた。コンストラクトを卵にインジェクションして、トランジェントなアッセイを行うと actin の場合は、予想通りの結果が得られるが、しかし、トランスジェニックラインを作製すると、期待通りの結果が得られなかった。従って、現在のところ期待したトランスジェニック個体は得られていない。他の神経プロモーターなども試したが、トランジェントな発現では期待された効果が得られるのであ

るが、ゲノムに組み込まれると活性がなくなることがわかった。挿入されるゲノムの位置効果の可能性はある。引き続き、さらに検討を重ね、これら光受容体をまず組織/器官特異的に発現させる方法を確立したい。

次に、ヒートショックプロモーターを利用して、やはりコンディショナルに目的遺伝子を発現させる方法を開発した。コオロギのゲノムプロジェクトから同定した、ヒートショックタンパク質のプロモーターを単利し、まずトランジェントなアッセイを行ったところ、問題なくヒートショックにより GFP 遺伝子の発現を観察できたが、トランスジェニックラインを作製すると、常に ON の状態になり、熱ショックがかからないラインしか得られてなかった。これも予期しない結果であるが、さらに検討してヒートショックによる制御を光制御の前に完成させる必要がある。

(4) 結論と今後の予定

結局、新規光受容体を得ることに成功し、これらを用いたトランスジェニックラインを作製予定であったが、重要な組織/器官に特異的にそれらを発現する系が得られないうちに2年間が過ぎてしまった。これらは非常に誤算であったが、新規な動物モデルを作製するためには、必要不可欠な試練であると考えている。

今後の予定であるが、コンディショナルに制御できる系統を得ることができた場合は、458 nm または 473 nm (発色団である flavin の吸収波長) の青色光を照射したとき、アクチンまたは Eyeless 発現細胞で、特定の G 蛋白質が活性化されるラインを作製する。暗やみでは、LOV2-J alpha helix の立体障害のため G alpha が G beta+gamma に結合できないので、蛋白質は活性化されないはずである。さらに蛍光タンパク質遺伝子 (膜結合型 GFP など) を共発現させておくことで、光照射によって G 蛋白質が活性化された細胞が、可視化できる。Eyeless 発現細胞 (眼の網膜や脳) において、光依存的に特定の G 蛋白質を活性化させ、どのように神経細胞の分化や形態に影響が現れるか解析を継続して行いたい。

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4件)

① Ohuchi H, Yamashita T, Tomonari S, Fujita-Yanagibayashi S, Sakai K, Noji S, Shichida Y.

A non-mammalian type opsin 5 functions dually in the photoreceptive and non-photoreceptive organs of birds. 査読有, PLoS One, Vol. 7, No. 2, 2012, e31534.

doi:10.1371/journal.pone.0031534

- ② Takagi A, Kurita K, Terasawa T, Nakamura T, Bando T, Moriyama Y, Mito T, Noji S, Ohuchi H.

Functional analysis of the role of eyes absent and sine oculis in the developing eye of the cricket *Gryllus bimaculatus*. 査読有、Dev Growth Differ, Vol, 54, No. 2, 2012、pp. 227—240.

DOI: 10.1111/j.1440-169X.2011.01325.x

- ③ Gotoh H, Ueda T, Uno A, Ohuchi H, Ikenaka K, Ono K.

Expression of myelin genes in the developing chick retina. 査読有 Gene Expr Patterns, Vol. 11, 2011, No. 8, pp. 471—475

DOI: 10.1016/j.gep.2011.08.002

- ④ Yamashita T, Ohuchi H, Tomonari S, Ikeda K, Sakai K, Shichida Y.

Opn5 is a UV-sensitive bistable pigment that couples with Gi subtype of G protein. 査読有, Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 107, No. 51, 2010、pp. 22084-22089.

DOI: 10.1073/pnas.1012498107

[学会発表] (計4件)

- ① 角村寧子、宮脇克行、三戸太郎、大内淑代、高橋章、野地澄晴、イチゴ花托の着色過程における光受容体遺伝子の機能解析、第53回日本植物生理学会、2012.3.17、京都産業大学(京都市)
- ② 角村寧子、宮脇克行、浜岡宏和、三戸太郎、大内淑代、高橋章、野地澄晴、イチゴの着色過程における光受容体遺伝子の機能解析、第29回日本植物細胞分子生物学会大会、2011.9.7、九州大学箱崎キャンパス(福岡市)
- ③ 浜岡宏和、宮脇克行、角村寧子、三戸太郎、大内淑代、野地澄晴、イチゴ花托からの形質転換体作出の試み、第29回日本植物細胞分子生物学会大会、2011.9.7、九州大学箱崎キャンパス(福岡市)
- ④ 角村寧子、宮脇克行、浜岡宏和、三戸太郎、大内淑代、野地澄晴、イチゴ果実の生長と着色促進法の開発、LED総合フォーラム2011、2011.6.25. 徳島グランヴィリオホテル(徳島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野地 澄晴 (NOJI SUMIHARE)
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス
研究部・教授
研究者番号：40156211

(2) 研究分担者

大内 淑代 (OHUCHI HIDEYO)
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス
研究部・准教授
研究者番号：00253229

(3) 連携研究者

()
研究者番号：