

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23650172

研究課題名（和文） 光による遺伝子発現制御の試み

研究課題名（英文） Optogenetic approach of gene regulation

研究代表者

林 康紀 (HAYASHI YASUNORI)

独立行政法人理化学研究所・記憶メカニズム研究チーム・チームリーダー

研究者番号：90466037

研究成果の概要（和文）：

光活性化 Cre を作成する為、様々な LOV ドメインと Cre 融合タンパク質を作成し、lox-stop-lox-GFP カセットを持つベクターと HEK 細胞に共導入した。lox-stop-lox-GFP は Cre 活性により lox-stop-lox が除かれると GFP を発現する。しかし光の有無に関わらず LOV ドメインによる Cre 活性の抑制が見られなかった。ごく少数の Cre 分子が活性化されただけでも lox-stop-lox を除いてしまい、GFP の転写が起こってしまうと考えられた。しかし、一部のタンパク質で GFP が暗いものが認められたので、今後さらに変異を入れて活性化 Cre が得られないか検討していく。

研究成果の概要（英文）：

In order to generate photoactivatable Cre, we made a series of fusion proteins between LOV domain and Cre and introduce into HEK cells along with lox-stop-lox-GFP, which allows detection of Cre activity by GFP. However, irrespective illumination, we saw GFP signal, indicating that LOV domain did not effectively suppress the activity of Cre. However, in some of constructs, GFP was dimmer than others. We will further pursue these constructs to see if we can improve them by adding additional mutations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：遺伝子発現、Cre、LOV ドメイン、光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

光は幅広く生物学的な実験に広く使われている。その理由として、組織への侵襲がほぼ無視できるため生きている組織に使える事、時空間分解能が高い事、生組織に適度な吸光が有る事、また何よりも、空間的な情報が得やすい点などが上げられよう。実際に生体の観察には肉眼から顕微鏡まで光が幅広く用いられている。一方、観察にとどまらず、光を使って生体を操作する方法はまだ限られている。純粋に光のみを用いる方法として、レーザーによる単一細胞の ablation、光ピン

セットによる小物体のハンドリング、光と化学物質を組み合わせた方法として特定の物質の脱籠化、例えば caged-glutamate や caged-Ca²⁺が実用化されている。また、光による細胞の脱分極や過分極を引き起こす channelrhodopsin や halorhodopsin は急速に用いられるようになりつつある。光の特性を考えるに、光による細胞の制御の応用は広い。ところが光を使って蛋白質の活性を制御する技術は未だ不十分である。しかしもし光依存的に蛋白質活性の制御が可能となれば、様々な応用が可能であるが、GFP に匹敵するような汎用性のある方法は未だ見当たらない

い。これまでは、光感受性非天然アミノ酸を用いた試みはされてきたが、*in vitro* の応用は可能であっても生体実験に応用するのは非常に難しかった。

2. 研究の目的

このような状況のもと、本研究では光による遺伝子発現の制御を試みる。Edwardsらは光活性化 Cre を報告した(ACS Chemical Biology, 2009)が、上記の光感受性非天然アミノ酸を用いているため、利用可能な局面に限られる。そこで本研究では植物由来の **light oxygen voltage(LOV)**ドメインを応用する事で、この課題にチャレンジする。LOVドメインとは、屈光性に関与するフラビン結合蛋白質であり、光吸収により蛋白質の一部のコンフォメーションが変化する。この性質を利用し、Hahnらは光活性化 **rac** を作成する事に成功した(Nature, 2009)。非天然アミノ酸を用いないので、完全に遺伝子によりコードされる。我々は既にこの蛋白質を用い、光活性化 **CaMKII** を作成する事に成功し、その過程で光活性化タンパク質の開発に必要な **know-how** を蓄積してきた。そこで本研究では、LOVドメインを用いて光による遺伝子発現の制御を試みると同時に LOVドメインによる光による蛋白質活性の制御技術の限界に挑戦し、より汎用性のある手法に繋げる方法を模索していく。

光による蛋白質活性化技術は開発の端緒についたばかりで、**GFP**のような、どの蛋白質にも当てはまるような汎用性のあるストラテジーが無い。これまでは光感受性が有る非天然アミノ酸を導入した蛋白質が使われてきたが、精製して化学修飾した蛋白質をマイクロインジェクションにより導入したり、細胞に非天然アミノ酸とそれに対応する特殊な **tRNA** を導入したりなど、非常に煩雑であり、かつ生体での応用は難しかった。LOVドメインはその点、非天然アミノ酸を使わずに遺伝子によりコードされる点で生体での応用に非常に有利である(フラビンが必要であるが、それは生体にあるレベルで充分である)。しかし LOVドメインによる蛋白質活性制御の原理は光による立体構造の変化として考えられているが、どのような蛋白質に応用出来るか、また任意の蛋白質に応用するにはどうしたら良いかまだ試行錯誤の面が大きい。現段階では様々な蛋白質の光制御の試みを通して、経験を積んでいく必要が有る。我々は後述するように既に LOVドメインを用いた光活性化 **CaMKII** の開発の経験が有るため、その経験と今回の研究課題を併せ、LOVドメインを用いた蛋白質活性の光制御に関してある程度統一した開発方針を提

示する事が出来ると期待している。もしそれが可能であれば LOVドメインにより蛋白質活性の制御を行なう事が、**GFP**のように一般的になる可能性がある。

3. 研究の方法

Photoactivatable Cre タンパク質を作成する為、LOVドメインと Cre タンパク質を作成し、CMV-lox-stop-lox-GFP カセットを持つベクターと HEK 細胞に共導入した。CMV-lox-stop-lox-GFP は Cre 活性により lox-stop-lox が除かれると上流にある CMV promoter の働きにより GFP を発現する様になる。また、光をいちいち当てずにも光活性化を検出する為、光を当てた状態の LOV を模倣する I539E 変異体、並びに光を当てていない状態を模倣する C450A 変異体を融合した Cre を作成し、両者での活性の際を観察した。LOVドメインは、Cre の C 末端、並びに N 末端に融合し、またその長さを Cre の結晶構造を参考に、ぎりぎりまで削ったものから、1アミノ酸ずつ、15アミノ酸までの異なった長さにものを作成した。

4. 研究成果

殆どの構築で GFP の蛍光が見られた、つまり LOVドメインによる Cre 活性の抑制が見られなかった。恐らく、ごく少数の Cre 分子が、活性化されただけでも lox-stop-lox を除いてしまい、GFP の転写が起こってしまうと考えられた。これを解決する為、Cre-LOVドメイン融合蛋白質の発現プラスミド量をごく少量にするなどの工夫を行なったが、残念ながら I539E 変異体で GFP の発現が見られ、C450A 変異体で見えないような融合蛋白質は無かった。しかし、一部のタンパク質で GFP がその他よりも暗いものが認められ、Cre 活性の抑制が掛かっている可能性がある。そこで、今後はその構築を中心に、結合部位に変異を入れて、両者で差があるものが得られないか検討していく。

またもう一つのアプローチとして記述した、光活性化エクジソン受容体は光活性化 Cre の構築と解析に時間がかかった為、まだ手つかずである。エクジソンプロモーターと比較して Creの方が **flox** 動物等で現在汎用されており、応用性が高い為であるが、今後、光活性化 Cre の作成と並行して進めていく。

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. Wang, D.O., Matsuno, H., Ikeda, S., Nakamura, A., Yanagisawa, H., Hayashi,

- Y., Okamoto, A. (2012) A rapid and effective FISH protocol with hybridization-sensitive fluorescent linear oligo probes. RNA 18:166-175
査読あり
- Mower, A. F., Kwok, S. M., Yu, H., Majewska, A. K., Okamoto, K.-I., Hayashi, Y.*, Sur, M.* (*: co-corresponding authors) (2011) Experience-dependent regulation of CaMKII activity within single visual cortex synapses in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. 108:21241-21246
査読あり
 - Bosch, M., Hayashi, Y. (2011) Structural plasticity of dendritic spines. Curr. Opin. Neurobiol. doi:10.1016/j.conb.2011.09.002
査読あり
 - Saneyoshi, T., Hayashi, Y. (in the press) The Ca²⁺ and Rho GTPase signaling pathways underlying activity-dependent actin remodeling at dendritic spines. Cytoskeleton doi: 10.1002/cm.21037.
査読あり
- [学会発表] (計 8 件)
- Lakhanpal, G., Kim, K., Kato-Hayashi, M., Hayashi, Y., Okamoto, K.: The role of CaMKII beta in modulating dendritic spine structural plasticity. 2011.11.16, SfN 2011, Washington DC
 - Kim, K., Hayashi, M., Narayanan, R., Suzuki, A., Matsuura, K., Okamoto, K., Hayashi, Y.: CaMKII gates rapid structural plasticity in hippocampal dendritic spines. 2011.11.16, SfN 2011, Washington DC
 - Hosokawa, T., Hayashi, Y.: A

- quantitative analysis of AMPA receptor GluR1 phospho-isotypes. 2011.11.15, SfN 2011, Washington DC
- Hayashi, Y.: Structural roles of CaMKII. 日本神経化学会 2011.09.26, 金沢
 - Sato, M., Kawano, M., Islam, T., Yamaguchi, Y., Ohkura, M., Nakai, J., Hayashi, Y.: In vivo two-photon imaging of neuronal circuit activity using transgenic mice that express fluorescent calcium sensor proteins in the brain. 第34回日本神経科学大会 2011.09.16, 横浜
 - Hosokawa, T., Hayashi, Y.: A quantitative analysis of AMPA receptor GluR1 phospho-isotypes. 第34回日本神経科学大会 2011.09.15, 横浜
 - Lakhanpal, G.K., Kim, K., Kato-Hayashi, M., Hayashi, Y., & Okamoto, K.: The regulation of dendritic spine structural plasticity by CaMKII beta. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, 2011.07.15, Florence, Italy
 - Hayashi, Y.: Phosphoisotype analysis of AMPA receptor GluR1. Gordon Research Conference Excitatory Synapses & Brain Function 2011.06.29, Easton, MA, USA

[図書] (計 1 件)

- Hayashi, Y., Okamoto, M., Bosch, M., Futai, Y. (2012) Roles of neuronal activity-induced gene products in Hebbian and homeostatic synaptic plasticity, tagging and capture. In **Adv. Exp. Med. Biol.** (Kreutz ed. Springer-Verlag)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 康紀 (HAYASHI YASUNORI)

独立行政法人理化学研究所・記憶メカニズム

研究チーム・チームリーダー

研究者番号：90466037

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし