

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620128

研究課題名(和文) インスリンシグナルに關与するリン酸化酵素の光制御技術とその実践法

研究課題名(英文) Development of optogenetic tools for controlling kinase activities in insulin signaling pathways and their practical applications

研究代表者

小澤 岳昌(Ozawa, Takeaki)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40302806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：インスリンシグナリングの重要なタンパク質であるAktおよびc-Rafのキナーゼ活性を、外部光により制御する技術を開発した。光受容タンパク質CRY2をAktと融合することにより、光感受性のある人工Aktを作製した。青色光照射に伴いFoxO1が核から細胞質に局在変化すること、さらにFoxO1によって制御される遺伝子Atrogin-1の発現量が定量的に制御できることを実証した。同様の原理を用いて、c-Rafの光制御技術を開発した。赤色光照射により、c-Rafの活性を定量的に制御できることを実証した。開発した技術は、インスリン刺激時の細胞内シグナルを定量解析する革新的なツールとなることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We developed an optogenetic tools for controlling kinase activities of Akt and c-Raf, which are crucial proteins for insulin signaling. Akt was connected with a photo-receptor (CRY2). Upon irradiation with blue light, we observed movement of Foxo1 from nucleus to the cytosol. Moreover, we demonstrated quantitative control of Atrogin-1 gene expression by blue light. Using the same approach, an optogenetic technique to control c-Raf activity in living cells. We demonstrated that red light irradiation enabled to quantitative regulate c-Raf activity. The developed techniques will be useful tools for quantitative analysis of intracellular insulin signaling in living cells.

研究分野：分析化学

キーワード：光制御 インスリン キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

蛍光、発光タンパク質を利用した生体分子イメージングは、ある特定のタンパク質や RNA の機能を低侵襲的に可視化する技術として、基礎生命科学研究のみならず創薬や医療に大きく貢献してきた。しかし、特定の分子を可視化するだけでは、複雑な生体をシステムとして理解することは困難である。そこで近年、光によって生命を時空間的に制御する手法が台頭し、急速に注目が集まっている。生体の機能を人為的に光で操作し制御することができれば、任意の時間に特定の場所で摂動を生体に与えることが可能となる。生体を光で制御する技術は、チャンネルロドプシンを用いた神経におけるイオン流入制御が勢力的に行われてはいるものの、生体機能全体を鑑みるとその対象は限られ、生命を可視化する技術の蓄積に比較してまだまだ発展途上にある。

2. 研究の目的

インスリンシグナリングによる代謝制御に焦点を絞り、時間情報をコードするシグナル分子の活性を、光により自在にコントロールする新たな技術を開発する。具体的には、インスリンシグナリングの2つの重要な情報伝達経路「Akt シグナル伝達経路」と「MAPキナーゼシグナル伝達経路」にフォーカスし、その鍵分子となる Akt および c-Raf のキナーゼ活性を、外部光により制御する技術を開発する。そしてその技術応用を実践するため、それぞれの情報伝達経路を独立して、一過性、持続性、周期性の時間パターンで活性化した時、どのような遺伝子発現が起こるかを網羅的に解析する。時間情報に対して特徴的な発現変動を示す遺伝子を同定し、そのメカニズムを数理モデルにより解明する。

3. 研究の方法

研究目的を実現するために、2つの研究課題、研究1)光制御可能な Akt/PKB の開発、2)光制御可能な c-Raf、を開発した(図1)。植物由来の光受容タンパク質を利用して、Akt

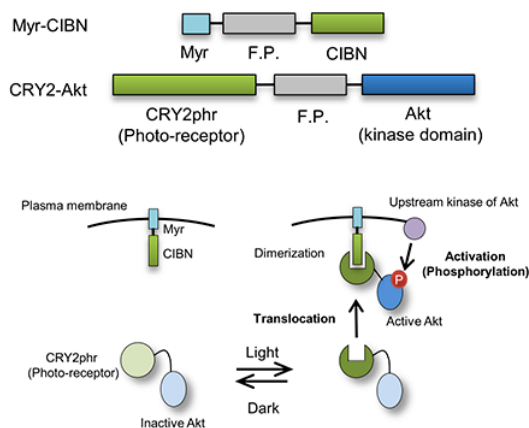


図1. Akt 光制御法の原理図。

および c-Raf の活性を光制御する融合タンパク質を遺伝子工学的に作成した。この光応答型 Akt と c-Raf を用いて、Akt/PKB と c-Raf 活性の時間変動解析を行った。具体的には、(a) 強い一過性(パルス状)の活性化状態、(b) および 15~30 分周期のパルス状活性化状態、(c) 弱い持続的な活性化状態、の 3 パターンの Akt 及び c-Raf の活性化状態を創り出し、それぞれについてどのような遺伝子発現が起こるかを探査した。

4. 研究成果

Akt の局在変化を光制御する目的で、光感受によってヘテロ二量体を形成することが報告されているタンパク質 CRY2 と CIBN を利用した。光照射にともなう CRY2-Akt の細胞膜上への移行を、蛍光顕微鏡により確認した(図2)。光強度、照射時間を変え、膜へ

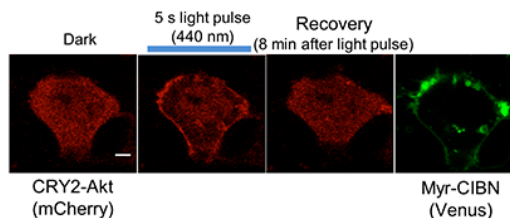


図2. Akt の青色光照射にともなう細胞膜上への移行。

の移行速度、および膜からの解離速度を定量的に解析した。また照射時間と光パルス照射回数を様々変えて、リン酸かの程度を western blotting により定量解析した。そのデータに基づき、光の照射回数と Akt の活性化とを相関づける数理モデルを構築した。構築した数理モデルが、Akt のリン酸化と脱リン酸化過程の実験データを、忠実に再現することを立証した(図3)。次に異なる Akt

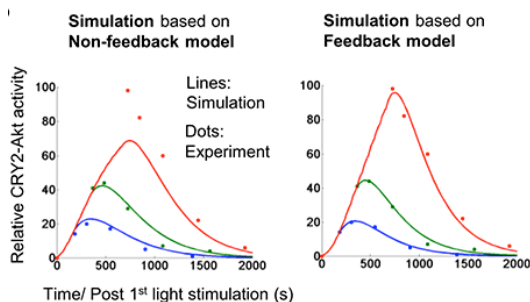


図3. 実験データを忠実に再現する数理モデルの構築。

活性化パターンを創り出し、Akt 下流の FoxO1 の核から細胞質に局在変化を制御した(図4)。さらに FoxO1 によってその発現が制御される遺伝子 Atrogin-1 の発現量を、異なる Akt 活性化時間変動によりどのように制御されるかを調べた。その結果、弱い活性で持続的な Akt の活性化が、Atrogin-1 の遺伝子発現を強く抑制することを見出した(図5)。

同様の原理を用いて、ERK を赤色光で活性化する光活性型 Raf (PA-Raf) 系を構築した。赤色光照射により膜上の PhyB に PIF-Raf 融合タンパク質が移行する系を構築した。Western blot により各融合タンパク質を導入した細胞において赤色光照射後の ERK のリン酸化量を定量した。結果、光照射とともに、ERK が選択的にリン酸化されることを実証した。

開発した技術は、インスリン刺激時の細胞内シグナルを定量解析する革新的なツールとなることが期待できる。

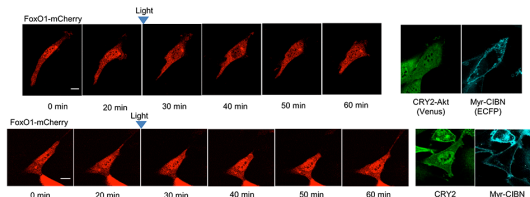


図 4. FoxO1 の細胞内と核との時空間局在変化。

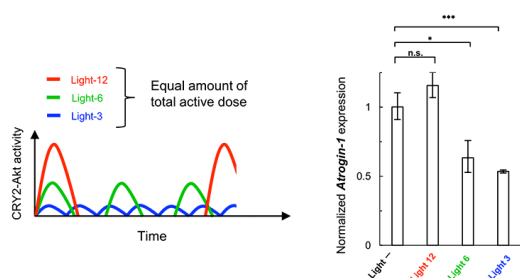


図 5. 定量的な Akt 活性化の時間変動に伴う Atrogen-1 の遺伝子発現変動。

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 1 件)

1. An optogenetic system for interrogating the temporal dynamics of Akt. Y. Katsura, H. Kubota, K. Kunida, A. Kanno, S. Kuroda, T. Ozawa, *Sci. Rep.*, **5**, 14589 (2015). (doi: 10.1038/srep14589, 査読有り)

[学会発表] (計 20 件)

1. Luminescent sensors and optical switches for single cell analysis, T. Ozawa, PACIFICHEM2015, Hawaii, December 19 (2015).
2. Luminescent sensors and optical switches for single cell analysis. T. Ozawa, Asian-CHIP2015, Seoul (Korea), November 19 (2015) (基調講演)

3. 「生きたまま分子機能を捉え・操るーオプトバイオアナリシス」小澤岳昌, 第 246 回生理学東京談話会, 東邦大学医学部 (東京都大田区), 9 月 26 日 (2015).
4. 「生きた細胞内の分子を観る・操作する新たな光技術」小澤岳昌, 高分子学会バイオ・高分子研究会, 秋保温泉ホテルニュー水戸屋 (秋田県仙台市), 9 月 18 日 (2015).
5. Luminescent sensors and optical switches for single cell analysis. T. Ozawa, 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢大学 (石川県金沢市), 9 月 13 日 (2015).
6. Luminescent sensors and optical switches for single cell analysis, T. Ozawa, OIIB Summer School 2015, 岡崎コンファレンスホール (愛知県岡崎市), August 13 (2015).
7. 「生体分子の時空間制御とライブイメージング」小澤岳昌, イメージングブートキャンプ 54, 北海道大学医学部 (北海道札幌市), 6 月 17 日 (2015).
8. Protein-based luminescent sensors for single cell analysis. T. Ozawa, The 3rd international symposium on molecular imaging and nanomedicine, Suzhou (China), April 25-29 (2015).
9. Imaging and analysis of biomolecules in living cells, T. Ozawa, PITTCON 2015, New Orleans (USA), March 10 (2015).
10. Luminescent sensors for single cell analysis, T. Ozawa, International Symposium on Multi-dimensional Fluorescence Live Imaging of Cellular Functions and Molecular Activities, Kyoto, January 28 (2015).
11. Luminescent sensors for single cell analysis, T. Ozawa, Biomedical Molecular Imaging 2014, Taipei (Taiwan), November 8 (2014).
12. 「二分割ルシフェラーゼ再構成法を用いた生理機能解析法」小澤岳昌, 第 87 回日本生化学会大会, 京都国際会館 (京都府京都市), 10 月 15 日 (2014).
13. Luminescent sensors and optical switches for single cell analysis, T. Ozawa, Shino-Japan Workshop on Chemical Biology, Beijing (China), October 11 (2014).
14. Luminescent sensors and optical switches for single cell analyses, T. Ozawa, Swiss-Japan Chemical Biology Symposium 2014, Bern (Swiss), October 3 (2014).
15. 「生きた細胞内で機能する内在性 RNA イメージング法」小澤岳昌, 吉村英哲, 山田俊理, 分子研研究会 (細胞核内反応の分子科学), 分子科学研究所 (愛知県岡崎市), 9 月 27 日 (2014).
16. Visualising and Manipulating Cell Stimulation, T. Ozawa, 8th Pituitary

Meeting, Edinburgh (UK), September 22 (2014).

17. Imaging and Analysis of GPCRs using Protein Complementation Analysis, T. Ozawa, 7th Summer School Medicinal Chemistry in Regensburg, Regensburg (Germany), September 18 (2014).

18. 「生体分子の時空間制御とライブイメージング」小澤岳昌, イメージングブートキャンプ 2014, 北海道大学以外部(北海道札幌市), 6月18日(2014).

19. 「生細胞内の生理機能を探る光分析技術」小澤岳昌, 第31回東北大学無機・分析化学コロキウム, 東北大学理学部(秋田県仙台市), 5月30日(2014).

20. 「タンパク質再構成法を利用する生理機能イメージング」小澤岳昌, 日本顕微鏡学会第70回記念学術講演会, 幕張メッセ(千葉県千葉市), 5月12日(2014).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 岳昌 (OZAWA, Takeaki)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号: 40302806

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: