

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26702036

研究課題名(和文) 組織レベルのイメージングと光遺伝学に向けた遠赤色光プローブ/スイッチ開発

研究課題名(英文) Development of far-red absorbing fluorescent probes and photoconvertible switches for organ-level bio-imaging and optogenetics

研究代表者

成川 礼 (Narikawa, Rei)

静岡大学・理学部・講師

研究者番号：30456181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類内在色素であるビリベルジン(BV)を結合し、個体の奥深くまで浸透する遠赤色光を吸収できる小分子光スイッチ・蛍光プローブを開発するため、シアノバクテリア由来の光受容体群シアノバクテリオクロム(CBCR)の解析を進めた。その結果、BVを高効率で結合し、遠赤色光と橙色光の間で光変換するCBCRを発見し、BV非結合CBCRに変異を導入することでBV結合能を付与することに成功した。さらに、単色光照射後、速やかに暗反転するCBCRや光変換のシフト幅の大きいCBCRも発見した。これらの分子を利用し、cAMP合成の光制御や、哺乳類培養細胞からの遠赤色蛍光の検出にも成功した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we focused on cyanobacterial photoreceptors, cyanobacteriochromes (CBCRs), to develop small photo-switches and fluorescent probes that bind biliverdin (BV) and absorb far-red light. Because BV is an intrinsic chromophore in mammalian cells and far-red light can penetrate into deep animal tissues, BV-binding ones are beneficial for optogenetics and bio-imaging tools. We succeeded in discovering novel BV-binding CBCRs showing far-red/orange reversible photoconversion and in developing BV-binding CBCRs based on non-BV-binding ones to introduce several mutations. Further, we also identified dark-reversion type CBCRs and a CBCR with large spectral shift. Based on these molecules, we succeeded in light regulation of cAMP synthesis in vitro and far-red fluorescence detection from mammalian cells.

研究分野：光生物学

キーワード：オプトジェネティクス 遠赤色光 cAMP シアノバクテリオクロム

1. 研究開始当初の背景

光は時間・空間分解能が非常に高いツールであり、光質と強度という二つのパラメータで厳密に制御できるため、光を用いて細胞を制御するオプトジェネティクスや分子の局在を細胞レベルで可視化する分子イメージング技術が、フラビン結合タンパク質、ロドプシン、GFP系蛍光タンパク質等を活用することで、急速な発展を遂げている。最終的な応用利用として、個体レベルで組織の奥深くの細胞に光を照射し蛍光を検出するには、650から900 nmの光を吸収する色素タンパク質を活用することが重要である。しかし、上記のタンパク質群には、650 nmより長波長の光を吸収するタンパク質の開発は進んでいない。

その意味で、長波長の光を吸収する色素・ビリベルジン (BV) を結合するバクテリオフィトクロムに注目が集まっている。また、BVは、哺乳類細胞の内在性色素であるため、色素合成系の導入や色素の添加をする必要がない点も大きな長所となる。しかしながら、バクテリオフィトクロムは、その色素結合領域が大きく利用しづらいという欠点がある。一方、近年、シアノバクテリオクロムという光受容体がシアノバクテリアから発見された。シアノバクテリオクロムの色素結合領域は、フィトクロムと比べて極めて小さく、GFPと同程度であり、多様な光質を感知する光受容体が同定されている。先行研究では、シアノバクテリオクロムは、比較的短波長の光質を吸収するフィコシアノピリンという藻類特異的な色素を結合するものしか同定されていなかった。このような状況の中で、我々はごく最近、BVを結合し得るシアノバクテリオクロムを見いだすことに成功した。

2. 研究の目的

天然に存在するシアノバクテリオクロム群からのスクリーニングや構造情報に基づいた網羅的な変異導入により、BVを高効率で結合し、遠赤色光に応答する光スイッチや遠赤色光を吸収し近赤外光を発する蛍光プローブを開発し、それらを哺乳類培養細胞において作動させることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) BV合成酵素とシアノバクテリオクロムを共に発現する大腸菌を用い、天然からBVを高効率に結合するシアノバクテリオクロムを探索するとともに、既存のシアノバクテリオクロムに変異を導入することでBV結合能を付与する。

(2) cAMP合成を担うアデニル酸シクラーゼドメインとシアノバクテリオクロムとのキメラタンパク質を作出し、cAMP合成が光によって制御されるかどうか、精製タンパク質を用いて確認する。

(3) シアノバクテリオクロムを哺乳類培養細胞に発現し、遠赤色～近赤外光の蛍光を発するかどうか蛍光顕微鏡により観察する。

4. 研究成果

(1) 通常のシアノバクテリアは、クロロフィル *a* を光合成の反応中心に用いているが、*Acaryochloris marina* というユニークなシアノバクテリアは例外的に、クロロフィル *a* よりも長波長の遠赤色光を吸収するクロロフィル *d* という色素を用いている。そのため、*A. marina* は他のシアノバクテリアに比べて、より長波長の光質を感知するシステムを有している可能性を着想した。そこで、*A. marina* のシアノバクテリオクロムの解析を進めたところ、BVを高効率に結合し、遠赤色光と橙色光の間で光変換を示す二つのシアノバクテリオクロム (AM1_1557g2、AM1_C0023g2) を発見することに成功した (雑誌論文④、⑥)。さらに、一つの変異導入により、そのBV結合効率を向上させることにも成功している (雑誌論文④)。さらに、BV結合型 (AM1_1557g、AM1_C0023g2) とBV非結合型 (AnPixJg2・結晶構造決定済み) とを構造情報を基に配列比較することで、色素近傍のBV結合特異性を決定すると予想される8つアミノ酸残基を抽出し、これらのアミノ酸残基をBV非結合型に導入する実験を進めた。その結果、最終的にたった2つのアミノ酸残基の導入により、BV結合能を付与することに成功している。これについては、現在、投稿論文を準備中である。

また、新規に暗反転型光受容体を発見することにも成功した (雑誌論文②、③)。こちらの暗反転型に関しても、同様に非暗反転型との配列比較により、暗反転に重要な6つのアミノ酸残基の同定に成功している (雑誌論文②)。これらの暗反転型は、応用利用する上で、単色光照射のみで制御可能であり、オプトジェネティックツールとして優れた性質を持つと期待される。

さらに、上述のような構造を基にした比較ではなく、偶々得られた変異体シアノバクテリオクロムにおいて、効率良くBVを結合し、遠赤色光と青色光で変換するものを発見することにも成功した (投稿論文準備中)。こちらも更なる変異導入を施すことで、BV結合効率を向上することができている。

(2) 赤色光と緑色光の間で光変換するAnPixJg2というシアノバクテリオクロムをアデニル酸シクラーゼと融合したキメラタンパク質を作製し、赤色光下で、緑色光下よりも3倍程度、cAMP合成を誘導することに成功した (雑誌論文②)。さらに、暗反転型についても同様にcAMP合成の光制御系構築に成功した (雑誌論文②)。遠赤色光と橙色光の間で変換するシアノバクテリオクロムとのキメラタンパク質も多数作製し、その活性を測定したが、光制御可能なキメラタンパ

ク質は、本研究課題期間内には得ることはできなかった。課題終了後も引き続き開発を試みる予定である。また、この光スイッチを哺乳類培養細胞に導入し、光制御系が作動するかどうかを検証する実験も進行中である。

(3) 赤色光を吸収し、遠赤色光の蛍光を発するシアノバクテリアクロム群を哺乳類培養細胞に導入することで、細胞内から遠赤色蛍光を検出することに成功した(雑誌論文④)。こちらも同様に、本研究課題期間内には、近赤外蛍光プローブの開発には至らなかったが、引き続き開発を進めていく。

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7件)

- ① Fushimi K, Ikeuchi M, Narikawa R. The expanded red/green cyanobacteriochrome lineage: An evolutionary hot spot. *Photochem. Photobiol.*, 2017, 93 (3): 903-906. 査読有り
- ② Fushimi K, Enomoto G, Ikeuchi M, Narikawa R. Distinctive properties of dark reversion kinetics between two red/green-type cyanobacteriochromes and their application in the photoregulation of cAMP synthesis. *Photochem. Photobiol.*, 2017, 93 (3): 681-691. 査読有り
- ③ Fushimi K, Rockwell NC, Enomoto G, Ni-Ni-Win, Martin SS, Gan F, Bryant DA, Ikeuchi M, Lagarias JC, Narikawa R. Cyanobacteriochrome Photoreceptors Lacking the Canonical Cys Residue. *Biochemistry*, 2016, 55 (50): 6981-6995. 査読有り
- ④ Fushimi K, Nakajima T, Aono Y, Yamamoto T, Ni-Ni-Win, Ikeuchi M, Sato M, Narikawa R. Photoconversion and Fluorescence Properties of a Red/Green-Type Cyanobacteriochrome AM1_C0023g2 That Binds Not Only Phycocyanobilin But Also Biliverdin. *Front. Microbiol.*, 2016, 7: 588. 査読有り
- ⑤ Narikawa R, Fushimi K, Ni-Ni-Win, Ikeuchi M. Red-shifted red/green-type cyanobacteriochrome AM1_1870g3 from the chlorophyll *d*-bearing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015, 461 (2): 390-5. 査読有り
- ⑥ Narikawa R, Nakajima T, Aono Y, Fushimi K, Enomoto G, Ni-Ni-Win, Itoh S, Sato M, Ikeuchi M. A biliverdin-binding cyanobacteriochrome from the chlorophyll *d*-bearing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Sci. Rep.*, 2015, 5: 7950. 査読有り

- ⑦ Narikawa R, Enomoto G, Ni-Ni-Win, Fushimi K, Ikeuchi M. A new type of dual-Cys cyanobacteriochrome GAF domain found in cyanobacterium *Acaryochloris marina*, which has an unusual red/blue reversible photoconversion cycle. *Biochemistry*, 2014, 53 (31): 5051-9. 査読有り

[学会発表] (計6件)

- ① 成川礼 : シアノバクテリア由来の光受容体を利用したオプトジェネティクスツールの開発. 第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2016年12月2日
- ② 成川礼 : 光合成微生物からの新規光センサーの発見とその応用利用. 2015年度第2回バイオ単分子研究会、いわき湯本温泉 新つた(福島県いわき市)、2016年3月30日
- ③ 成川礼 : クロロフィル *d* により長波長の光で光合成を行うシアノバクテリア *Acaryochloris marina* は、感知する光も長波長の光なのか? 藍藻の分子生物学2015、かずさアカデミアホール(千葉県木更津市)、2015年11月16日
- ④ Narikawa R, Fushimi K, Enomoto G, Ni-Ni-Win, Ikeuchi M : Cyanobacteriochromes with unique spectral properties from the chlorophyll *d*-bearing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. 15th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, University of Tuebingen (Tuebingen, Germany), 2015年8月5日
- ⑤ Narikawa R : Trial to develop light switches that work in photosynthetic organisms. The German-Japanese Binational Seminar 2015, "Harvesting Light: From light to biotechnological products", Kampo no Yado (Atami, Japan), 2015年3月25日
- ⑥ 成川礼 : 光合成生物の光応答戦略解明とその応用利用. 第4回光科学異分野横断萌芽研究会、小川屋(岐阜県下呂市)、2014年8月3日

[図書] (計0件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称 : 蛍光特性を有する複合体
発明者 : 成川礼、佐藤守俊、池内昌彦
権利者 : 静岡大学
種類 : 特許
番号 : P2014-202984
出願年月日 : 2014年10月1日
国内外の別 : 国内

○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

成川 礼 (NARIKAWA, Rei)
静岡大学・理学部・講師
研究者番号：30456181

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()