

## 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：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500456

研究課題名(和文) マウス嗅神経細胞におけるカルシウムシグナルの光操作

研究課題名(英文) Optical control of mouse olfactory sensory neurons

研究代表者

石井 智浩 (ISHII, TOMOHIRO)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60549947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：カルシウムシグナルは生体内で様々な細胞機能を制御している。今回、私はカルシウムチャネルを光により制御する光遺伝学ツールBACCSを開発した。BACCSは様々な細胞において光依存的にカルシウムシグナルを誘導した。BACCSをマウス海馬初代培養細胞で発現させたところ、神経突起の局所で光によりカルシウムシグナルを誘導することができた。トランスジェニックマウスにおいてBACCSを嗅神経細胞で発現させたところ、光により電気生理学的応答を得ることができた。BACCSは培養細胞や動物個体における細胞内カルシウムシグナル誘導のための有用な光遺伝学ツールとして広く応用されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Ca<sup>2+</sup> signals are highly regulated in a spatiotemporal manner in numerous cellular physiological events. Here, I engineered blue light-activated Ca<sup>2+</sup> channel switch (BACCS), as an optogenetic tool for manipulating Ca<sup>2+</sup> signals. Ca<sup>2+</sup> influx was induced in various cell types expressing BACCS. Local Ca<sup>2+</sup> signals were generated in neurites of mouse hippocampal neurons by local exposure to light. In the mouse olfactory system, neurons expressing BACCS showed electrophysiological responses in response to light, suggesting that it is applicable to in vivo studies. Thus, BACCSs will be a useful optogenetic tool for controlling intracellular Ca<sup>2+</sup> both in vitro and in vivo.

研究分野：嗅覚

キーワード：光遺伝学 カルシウムシグナル

## 1. 研究開始当初の背景

カルシウムイオンはあらゆる真核生物においてセカンドメッセンジャーとして使われている。カルシウムシグナルは極めて多様な細胞応答を引き起こす。例えば、神経伝達物質の放出、筋肉の収縮、遺伝子発現、細胞分化や増殖、細胞死などそれは重要な生命現象に深く関わっている。カルシウムイオンという共通のセカンドメッセンジャーがどのようにして様々な細胞応答を引き起こすのか、という疑問に対して、シグナルのタイミング、場所、強弱、頻度、そしてカルシウムセンサータンパク質の特性などが重要なパラメータとなっていると考えられている。

動物個体において細胞内カルシウムシグナルの役割を解析する方法として、大きくわけて(1)カルシウムシグナルを観察する、(2)カルシウムシグナルを操作する、という2つが挙げられる。(1)に関しては、非常に優れたカルシウム指示薬や FRET センサーが開発されており、*in vivo* においても応用されている。(2)に関しては、これまで遺伝子ノックアウトや薬理的な手法を用いた方法などが多く行なわれてきた。しかしながらこのような手法では時空間的な解析精度はかなり低い。これを克服するには、光を用いてカルシウムシグナルを制御するというのが一つの優れた方法であると考えられる。

光を用いたカルシウムシグナルの制御方法としてケージド化合物が頻繁に使われるが、個体への応用は困難である。遺伝子導入による方法として、カルシウム透過性を上げたチャネルロドプシンやメラノプシンが使われる例があるが、前者はカルシウムイオン以外のカチオンを通すこと、後者は他のシグナルカスケード分子の発現の必要性やカルシウム以外のシグナルも伴うという問題点がある。これまでカルシウムイオン特異性の高い光依存性カルシウムチャネル制御タンパク質が一つ報告されているが、活性は高くない。新規に細胞内カルシウムシグナルを光で操作できる光遺伝学ツールの作製が待望されていた。

マウスは約 1,000 種類の嗅覚受容体遺伝子を用いて多様な匂い分子の受容・識別を行っている。個々の嗅神経細胞は特定の一つの嗅覚受容体を発現し、同じ受容体を発現する細胞の軸索は嗅球上において特定の領域で収束して二次ニューロンとシナプス結合し糸球と呼ばれる構造体を形成する。私はトランスジェニックマウス、ノックインマウスの解析を通して嗅覚受容体遺伝子等の相互排他的発現と軸索投射を研究してきた。この 1,000 種類の軸索がソーティングされ、同じ種類の軸索が集まって嗅球上で収束するという過程で、活動電位 (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>) が重要な役割を果たす。活動電位により特定の組み合わせの軸索接着/反発分子が発現誘導さ

れている。カルシウムイオンは様々なシステムの遺伝子発現を誘導しているため、軸索ソーティングにおいてもカルシウムイオン自身が重要な働きをしている可能性が高い。また嗅神経細胞のシナプス成熟にカルシウムイオン/カルモジュリン/カルシニューリン/NFAT の経路が重要な役割を果たしていることが報告されている。このようにカルシウムシグナルが神経回路網形成の様々な局面に重要な役割を果たしていることが示唆されるが、カルシウムイオンという同じシグナルをいかに使い分けているのかという問題の解決はこれまでの既存の手法では困難である。カルシウムシグナルの光遺伝学ツールが開発できれば、このような問題への解決の突破口となりうると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では以下の 3 つの点を目的として実験を進める。

- (1) カルシウムシグナルを光制御できる光遺伝学ツールの作製および改良
- (2) 培養細胞におけるカルシウムシグナル光遺伝学ツールを用いた応用
- (3) マウス嗅覚系に注目した動物個体への応用

## 3. 研究の方法

- (1) 青色光により構造が変化する光スイッチドドメインとして植物由来タンパク質の LOV2 ドメインを用いる。カルシウム選択的イオンチャネル Orai を制御するタンパク質 Stim に LOV2 ドメインを融合させることで、光依存的にカルシウムチャネルを開くスイッチ BACCS を作製する。光が当たらない状況では LOV2 ドメインの立体障害により活性が阻害されるが、光を当てることで LOV2 ドメインの構造が変化し、融合タンパク質の機能が活性化される、という設計である。さらに作製された光スイッチの LOV2 ドメインに光サイクルが変化する変異を導入することでスイッチオフの早い BACCS とスイッチオフの遅い BACCS を作製する。融合遺伝子の作製および、遺伝子への変異導入は PCR を用いた分子生物学的手法を用いる。
- (2) BACCS をトランスフェクションにより培養細胞に導入し、細胞機能を光により操作する。光刺激および観察は共焦点レーザー顕微鏡を用いて行う。まず第一にカルシウムシグナル依存的に転写を行う NFAT タンパク質に注目する。光により細胞内カルシウムシグナルを誘導することで NFAT タンパク質が細胞質から核へ移行することをライブイメージで観察する。さらに NFAT 応答配列プロモーターの下

流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトを用いて、実際に遺伝子の転写を誘導し、定量する。第二の実験として人工タンパク質であるカルシウム依存的細胞骨格制御因子を用いて、光により細胞の形態を操作する。

- (3) BACCS を動物個体へと応用する。マウスで BACCS を発現させる手法として、アデノウイルスを用いる方法とトランスジェニックマウスを用いる方法を試みる。光によりカルシウムシグナル応答が観察されるかどうかを、電気生理の手法で観察する。

#### 4. 研究成果

- (1) 植物由来 LOV2 ドメインとヒト由来カルシウムイオンチャンネル制御タンパク質 STIM1 とを様々な長さの組合せで融合タンパク質を作製し、その中から光により細胞内カルシウムを誘導できるタンパク質 hBACCS1 を得ることができた。HEK293T 細胞に hBACCS1 発現ベクターをトランスフェクションしてカルシウムイメージングを行ったところ、青色光の照射により細胞内カルシウム濃度が上昇することを確認した。応答効率を上げるために、hBACCS1 をベースに様々なコンストラクトを作製した。その中で hBACCS1 のタンデム二量体 hBACCS2 や ORAI1 と hBACCS2 の融合タンパク質 ORAI1::hBACCS2 を詳細に解析した。特に hBACCS2 は hBACCS1 に比べ効率よく細胞内にカルシウムシグナルを誘導することができた (図 1)。また、ショウジョウバエ由来 dStim を用いて同様に BACCS2 を作製した (dmBACCS2)。dmBACCS2 とショウジョウバエ dOrai を同時に HEK293T 細胞に発現させて (dmBACCS2-IRES-dOrai)、カルシウムイメージングを行った。dmBACCS2-IRES-dOrai 発現細胞は hBACCS2 発現細胞に比べ光に対して早く大きなカルシウム応答を示し

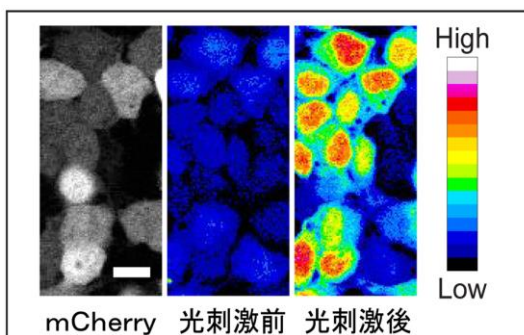


図 1  
BACCS-IRES-mCherry を発現する HEK293T 細胞をカルシウム指示薬で染色し、光刺激を行った。光を照射することでカルシウムシグナルが上昇した。スケールバー 20  $\mu\text{m}$ 。

た。hBACCS2 と dmBACCS2-IRES-dOrai 発現細胞のカルシウムシグナルは光を OFF にすると減少するので BACCS 応答は可逆的である。また一定の間隔で BACCS 発現細胞を繰り返し光刺激すると、刺激の度に細胞内カルシウムシグナルを誘導することができた。

次に BACCS の光応答性 (光サイクル) の変異体の作製を試みた。光サイクルは BACCS 中の LOV2 ドメインが決定する。いくつかの点変異が LOV2 の光サイクルを変えることが報告されていたので、それを参考に変異体を多数作製した。その中から、光をオフにした時のカルシウムシグナルのベースラインへの収束が早い変異体 dmBACCS2NS と収束が遅い変異体 dmBACCS2VL を得ることができた。

BACCS がどのような細胞種で応用可能かどうかを調べるために、アフリカミドリザルの腎由来の COS-7 細胞、ハムスターの膵臓 beta 細胞由来の HIT-T15 細胞、そしてマウス海馬初代培養細胞に hBACCS2 あるいは dmBACCS2-IRES-dOrai をトランスフェクションして、光によるカルシウム応答を観察した。全ての細胞種において効率的にカルシウムシグナルを誘導することができた。このことから BACCS は広く哺乳類の細胞において機能することが確かめられた。

光を用いることの利点は、特定のタイミングで特定の場所を狙って照射することができることである。この利点を生かすと、光により特定の時期に、特定の細胞あるいは特定の細胞局所でカルシウムシグナルを誘導することができるはずである。HEK293T 細胞に BACCS をトランスフェクションし、特定の細胞群を順次光照射したところ、光を照射した順番にそれらの細胞でカルシウムシグナルの上昇が見られた。即ち、細胞集団の中の特定の細胞のカルシウムシグナルを操作することが可能である。またマウス海馬細胞において BACCS を発現させ、軸索末端や樹状突起の先端を光刺激したところ、局所的にカルシウムシグナルを誘導することができた。これにより一つの細胞の中でも一部の限られた領域にのみカルシウムシグナルを生じさせ、それによりどのような細胞現象が引き起こされるかを観察することが可能になったと言える。

- (2) BACCS を用いてカルシウム依存的な細胞現象を操作することを試みた。HEK293T 細胞に BACCS と NFAT::GFP を発現させて、光により NFAT::GFP の局在の変化を観察した。細胞内カルシウムが上昇すると、カルシニューリンが NFAT を脱リン酸化し、脱リン酸化 NFAT は細胞質から核へと

移動することが知られている。青色光を10秒毎に照射すると、細胞質にあったNFAT::GFPは徐々に核へと移行していく様子が観察された。さらにNFATは転写因子であり、核へ移行したNFATは特定の遺伝子の転写を促進する。HEK293T細胞にBACCSおよびNFAT応答配列プロモーター下流にYFPをつなげたコンストラクトを共トランスフェクションし、光を照射した。光依存的にYFPの発現が誘導される様子を観察することができた。より定量的に計測するためにNFAT応答配列プロモーターの下流にルシフェラーゼをつなげたコンストラクトをHEK293T細胞に導入した。光照射を6時間行いルシフェラーゼ活性を測定すると、暗条件下のコントロールに比べ活性は約20倍に上昇した。

また、カルモジュリン結合モチーフとRhoAタンパク質より作製された人工タンパク質を用いて、光により細胞の形態を操作することを試みた。その人工タンパク質はカルシウムシグナル依存的に細胞からブレブと呼ばれる球状の突起を誘導することができる。ブレブは細胞死や細胞質分裂、細胞移動に関与することが知られている。HEK293にhBACCS2と共にトランスフェクションし、青色光を照射した。すると細胞は光を照射したときのみ突起を誘導することができた。即ち光により誘導されたCa<sup>2+</sup>を使って細胞の形態を操作することができた。

以上のことから、BACCSを使うことで光依存的に遺伝子発現や細胞形態の変化を誘導することができるなど、様々な細胞機能を操作することができることが分かった。

- (3) BACCSがマウス個体で機能するかどうかを調べるために、hBACCS2を発現する組換えアデノウイルスを作製し、マウス嗅上皮に感染させた。hBACCS2発現細胞では赤色蛍光タンパク質が発現するようにデザインされている。嗅上皮を観察すると、赤色蛍光タンパク質を発現する嗅神経細胞が観察された。嗅電図応答(EOG)を測定すると、光依存的に応答が測定された。また特定の嗅神経細胞群でBACCSを発現するトランスジェニックマウスを作製した(図2)。トランスジェニックマウスでは嗅覚受容体M71を発現する細胞で、BACCSと赤色蛍光タンパク質を発現する。マウスを観察すると予想通り、嗅上皮の中の少数の嗅細胞群でトランスジェンを発現し、それらは嗅球の後方の特定の糸球へと軸索を収束させていた。アデノウイルスの実験と同様に嗅電図応答を測定すると、アデノウイルスの実験に比べ小さいながらも、安定した応答を測定することができた。これらの実験から

BACCSをマウス個体に応用することが可能であることが分かった。将来的に嗅神経細胞の軸索投射に関して局所的なカルシウムシグナルがどのような意味を持つのかを解析する技術的基盤ができたと言える。

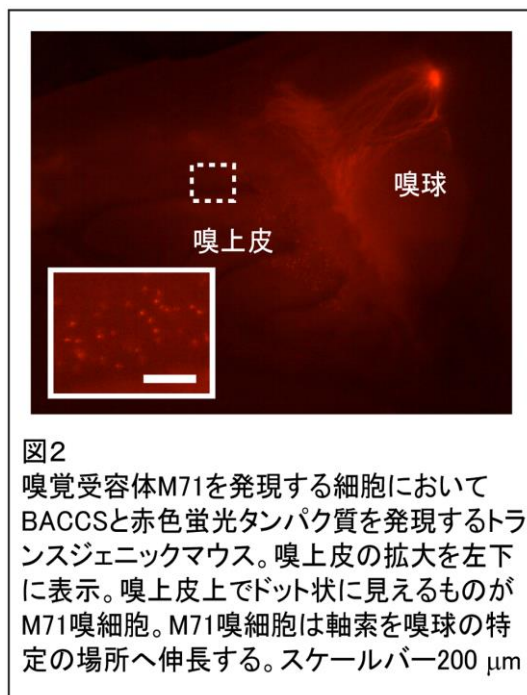


図2  
嗅覚受容体M71を発現する細胞においてBACCSと赤色蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウス。嗅上皮の拡大を左下に表示。嗅上皮上でドット状に見えるものがM71嗅細胞。M71嗅細胞は軸索を嗅球の特定の場所へ伸長する。スケールバー200 μm

以上の実験結果からBACCSは様々な細胞でカルシウムシグナルを効率良く誘導できる光遺伝学ツールで、細胞レベルの研究のみならず動物個体における研究にも広く応用できると考えられる。これまで不可能であった動物個体における局所的なカルシウムシグナルの役割を解析する上で非常に重要なツールとなることが期待できる。

## 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 2 件)

- ① Leinders-Zufall T\*, Ishii T\*, Chamero P, Hendrix P, Oboti L, Schmid A, Kircher S, Pyrski M, Akiyoshi S, Khan M, Vaes E, Zufall F, Mombaerts P. A family of nonclassical class I MHC genes contributes to ultrasensitive chemodetection by mouse vomeronasal sensory neurons. *J Neurosci.* (2014) 34:5121-5133. \*Equally contributed authors 査読有
- ② Ishii T, Sato K, Kakumoto T, Miura S, Touhara K, Takeuchi S, Nakata T. Light generation of intracellular Ca<sup>2+</sup> signals by a genetically encoded protein BACCS. *Nat Commun.* (2015)

6:8021.

査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Ishii T, Leinders-Zufall T, Zufall F, Mombaerts P.  
マウス鋤鼻器官における非古典的 MHC class I 分子群の機能  
第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25-27 日 パシフィコ横浜
- ② Ishii T, Leinders-Zufall T, Zufall F, Mombaerts P.  
Function of nonclassical class I MHC genes in the mouse vomeronasal organ.  
第 37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 11-13 日 パシフィコ横浜

[図書] (計 1 件)

- ① Genetic manipulation to analyze pheromone responses: knockouts of multiple receptor genes.  
Ishii T.  
Methods Mol Biol. (2013) 1068:133-154.  
査読無

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/cbio/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 智浩 (ISHII, Tomohiro)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・細胞生物学分野・助教  
研究者番号：60549947