

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15225

研究課題名(和文) シグナル伝達システム解明に向けた新規光応答性分子の開発と応用

研究課題名(英文) Development of a new optogenetic tools and its application toward the understanding of the mechanism of signal transduction

研究代表者

村越 秀治 (Murakoshi, Hideji)

生理学研究所・脳機能計測・支援センター・准教授

研究者番号：90608142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分子機能を直接的に調べるために、シナプス内でシグナル伝達経路を選択的に活性化することができる光遺伝学的ツールの開発と新規蛍光タンパク質をベースとしたイメージング用プローブの開発を目的とした。特に、光応答性分子との併用が可能なイメージング用プローブの開発に注力した。具体的には、2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡法(2pFLIM)を用いたフェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)の計測に最適化されたFRETプローブの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to develop optogenetic tools to selectively activate a specific pathway of biochemical signaling in synapses. These tools enable us to identify the essential pathways and signaling molecules required for the induction of long-term potentiation. We especially focused on developing a new imaging probe that can be used in combination of light sensitive proteins. As a result of our research, we successfully developed a new probe optimized for 2-photon Fluorescence Lifetime Imaging (2pFLIM) based Forster resonance energy transfer (FRET).

研究分野：生物物理、細胞生物、神経科学

キーワード：シグナル伝達 LOV2 蛍光タンパク質

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な遺伝子コード型の光応答性分子が開発されてきており、培養細胞から個体動物まで、様々な階層での応用が進められている。しかしながら、光応答性分子と分子活性化イメージングを組み合わせた研究はプローブや方法論の問題から殆ど行われていない。そこで我々は、光応答性分子と併用が可能な新規 FRET プローブの開発を行い、光応答性分子とイメージングを融合した新規の方法論を確立し、シナプス可塑性や個体動物の記憶システムの研究に応用することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、シナプス可塑性に必須なシグナル経路を選択的に光応答性分子で動作させ、それによる分子活性化と細胞機能を観察する方法を確立する(単一経路時空間活性イメージング)。これまでのシグナル伝達研究は、グルタミン酸等のリガンドで細胞を刺激し、細胞内の分子動態や活性を見るというものであった。しかしながらこの方法では、グルタミン酸結合により NMDA 受容体を通して細胞内への Ca²⁺流入が起こり、様々なシグナル経路を活性化してしまうため、本質的に重要なシグナル経路の時空間分布を明らかにすることは困難であった。そこで本研究では光応答性分子を用いて、シナプス可塑性に必要な経路のみを選択的に光活性化させ、各種分子の分子活性を2光子蛍光寿命イメージング法により可視化する。シグナル伝達をシンプルに動作させ、その出力を可視化することが可能になるため、複雑なネットワーク内でのクロストークによってかき消されていた時空間情報が次々と明らかになると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、生細胞および個体動物内において、分子活性化や分子間相互作用を高い感度で検出することが可能な蛍光プローブを作製するため、蛍光タンパク質である Clover (FRET のドナー) と sREACH (FRET のアクセプター) をベースとして、2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡に最適化された FRET ペアをランダム変異導入法により開発した。

4. 研究成果

既出の sREACH よりも高い吸光係数をもつ FRET アクセプターを開発するため、sREACH の発色団周辺のアミノ酸 (N144, N146, S147,

K166, R168, Q204, S205) をターゲットにして部位飽和変異導入 (Saturation mutagenesis) を行い、大腸菌でライブラリーを作製した。大腸菌ライブラリーより、蛍光灯下でオレンジ色のコロニーを採取し、His タグカラムによりタンパク質を精製した。精製したタンパク質の吸光係数を測定したところ、 $136,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ となり、sREACH の吸光係数 ($115,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) の 1.2 倍であった。また、量子収率を測ったところ、0.01 で sREACH の 7 分の 1 となった。これは、Clover と sREACH のスペクトルの重なりによるアーティファクトを減少させることができることを示している。シークエンスを行ったところ、N144A, N146P, S147V, K166S, R168Y, Q204S, S205A の変異が導入されていた。このタンパク質を新規の FRET アクセプターとして、ShadowY と名付けた。ShadowY のスペクトルを計測したところ sREACH とほぼ同じであった (図 1)。

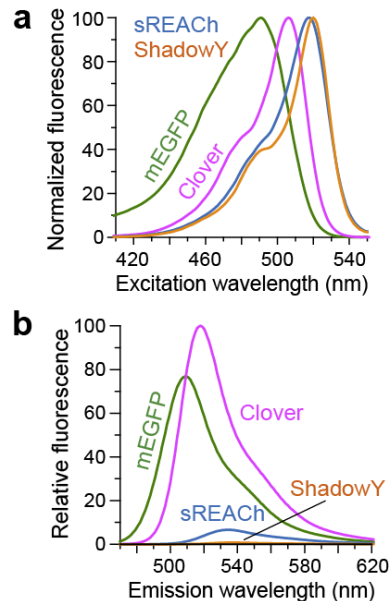


図 1

FRET のドナーである Clover については T153M と F223R の変異を導入することで大きなダイナミックレンジをもつことが分かった。Clover の発光スペクトルと ShadowY の吸収スペクトルには大きな重なりがあるため、FRET は効率よく起こると期待される。次に Clover_{T153M, F223R} と ShadowY の性能を細胞内で調べるため、光応答性タンパク質である Phototorpin1 の LOV2 ドメインの N 末端と C 末端に Clover_{T153M, F223R} と ShadowY をそれぞれ融合させて LOV2 FRET センサーを作製した (図 2 a)。これを HeLa 細胞に発現させて、青色光照射後の LOV2 FRET センサーの構造変化を 2 光子蛍光寿命イメージング顕微鏡下で観察した (図 2 b)。1 秒間の青色光照射後 20 秒で蛍光寿命が大

大きく増加するのが観察され、数分後には元の状態に戻った。これはLOV2ドメインの光照射による応答と一致する。また、光照射後の構造変化による蛍光寿命の変化量を定量したところ、sREACHよりもShadowYをアクセプターとした方が、CloverとClover_{T153M/F223R}のいずれの場合においても、より大きな変化を示すことが分かった。

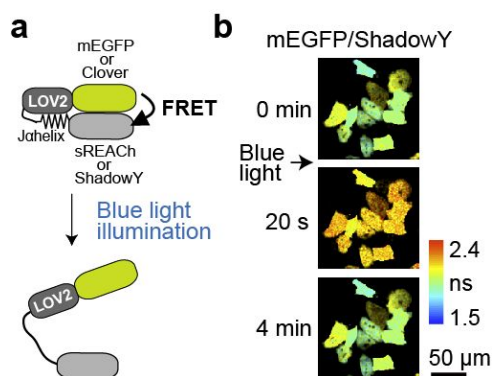


図 2

次にClover_{T153M, F223R}とShadowYの性能を調べるため、低分子量Gタンパク質であるH-RasのFRETセンサーを既存のものと同様な方法で作製した。すなわち、H-RasにClover_{T153M/F223R}を融合したものをFRETのドナーとし、H-Rasの下流のシグナル分子であるRaf-1の活性化H-Ras結合ドメイン(RBD: Ras Binding Domain)にShadowYを融合させたものをアクセプターとした。H-Rasが活性化するとRBDが結合するため、Clover_{T153M/F223R}とShadowYの分子間距離が小さくなりFRETが起こる。テストのため、Clover_{T153M/F223R}-H-RasとShadowY-RBDをリポフェクションによりHeLa細胞に発現させた。これを2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡下で観察し、EGF (Epidermal Growth Factor) で刺激後にFRETシグナルが変化(蛍光寿命が減少)するかどうかを確認した。EGF刺激後、FRETシグナルの大きな変化が観察された。また、個々の細胞のシグナル変化のタイムコースを計測したところ、刺激後すぐにH-Rasが活性化(Clover_{T153M/F223R}-H-RasがShadowY-RBDと結合)し始めて5分程度で飽和していた。結合成分の変化量は20%であり、先に報告のあるmGFPとShadowGのペア(結合成分の変化量16%程度)よりも大きく改善していた(Murakoshi et al.)。また、ShadowYをアクセプターとし、CloverとClover_{T153M/F223R}で比較を行ったところ、数パーセントではあるがダイナミックレンジの改善が確認できた。

光応答性分子であるLOV2ドメインは400~500nm(2光子励起では750~980nm)の励

起波長で構造変化するが、これは、現在私が分子活性化イメージングに用いている蛍光タンパク質(GFP)の吸収スペクトルと重なっている。すなわち、分子活性化イメージング(GFP観察)を行っている際に、常にLOV2を活性化してしまうことになる。これでは、様々な時空間パターンでpaCaMKIIを活性化した時の下流分子の活性化を観察することはできない。そこで本研究では、GFPの長波長変異体であるCloverをFRETのアクセプターとし、新規開発の蛍光タンパク質(ShadowY)をFRETのアクセプターとする。これによって、900nmでLOV2を活性化し、1000nmの2光子励起(paCaMKIIを活性化しない)で分子活性化イメージングを行うことができるようになった。

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13件)

1. 村越秀治

「光応答性CaMKII阻害ペプチドの開発とシナプス可塑性研究への応用」
CLINICAL CALCIUM 医薬ジャーナル社 2018年3月28(3): p414-419
doi: CliCa1803414419. (査読有)

2. 村越秀治

「クローズアップ実験法 光応答性阻害ペプチドの生化学的機能アッセイ」
実験医学 羊土社 2017年10月 p2765-2770
(査読有)

3. Murakoshi H*, Shibata AC

ShadowY: a dark yellow fluorescent protein for FLIM-based FRET measurement.
Scientific Reports 7, 6791 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-07002-4. (査読有)

4. 村越秀治

「分子間相互作用を検出する2光子蛍光寿命イメージング」
生体の科学 医学書院 2017年10月 68(5): p400-401 DOI: https://doi.org/10.11477/mf.2425200664 (査読有)

5. Murakoshi H*, Shin M, Parra-Bueno P, Szatmari EM, Shibata AC, and Yasuda R.

Kinetics of endogenous CaMKII required for synaptic plasticity revealed by optogenetic kinase inhibitor.
Neuron 94, 37-47 (2017). Doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.036. (査読有)

6. Nakahata Y, Eto K, Murakoshi H, Watanabe M, Kuriu T, Hirata H, Moorhouse AJ, Ishibashi H, Nabekura J. Activation-dependent rapid postsynaptic clustering of glycine receptors in mature spinal cord neurons. *eNeuro* 4, ENEURO.0194-16 (2017). Doi: 10.1523/ENEURO.0194-16.2017. (査読有)

7. Nakahata Y, Nabekura J, and Murakoshi H.^{*} Dual observation of the ATP-evoked small GTPase activation and Ca²⁺ transient in astrocytes using a dark red fluorescent protein. *Scientific Reports* 6, 39564 (2016). DOI: 10.1038/srep39564. (査読有)

8. Phengchat R, Takata H, Morii K, Inada N, Murakoshi H, Uchiyama S, and Fukui K. Calcium ions function as a booster of chromosome condensation. *Scientific Reports* 6, 38281 (2016). DOI: 10.1038/srep38281. (査読有)

9. Hedrick NG, Harward SC, Hall CE, Murakoshi H, McNamara JO, and Yasuda R. Rho GTPase complementation underlies BDNF-dependent homo- and heterosynaptic plasticity. *Nature* 538, 104-108 (2016). DOI: 10.1038/nature19784. (査読有)

10. Miyamoto A, Wake H, Ishikawa AW, Eto K, Shibata K, Murakoshi H, Koizumi S, Moorhouse AJ, Yoshimura Y, and Nabekura J. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nature Communications* 7, 12540 (2016). DOI: 10.1038/ncomms12540 (査読有)

11. 柴田明裕、村越秀治
「細胞内発現パターンを劇的に改善した高精度 FRET センサーの開発」
生物物理 2016年6月 56-3 p181-184
DOI: <https://doi.org/10.2142/biophys.56.181> (査読有)

12. Murakoshi H, Yasuda R. Imaging signal transduction in dendrites using genetically-encoded fluorescent proteins. *Dendrites: development and disease*. Springer-Verlag, Germany. 139-154 (2016) DOI:10.1007/978-4-431-56050-0_7 (査読有)

13. Fujiwara TK, Iwasawa K, Kalay Z, Tsunoyama TA, Watanabe Y, Umemura YM, Murakoshi H, Suzuki KG, Nemoto YL, Morone

N, and Kusumi A. Confined diffusion of transmembrane proteins and lipids induced by the same actin meshwork lining the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 27, 1101-1119 (2016). DOI: 10.1091/mbc.E15-04-0186. (査読有)

〔学会発表〕(計9件)

1. 村越秀治
2光子蛍光寿命イメージングによる細胞内シグナル伝達解析
第39回神経組織培養研究会 サンプラザシリーズ
ズンズ(愛知県名古屋市) 2017年10月7日

2. 村越秀治
光らない蛍光タンパク質で細胞内分子活性を見る
第2回ルミノジェネティクス研究会 静雲荘
(神奈川県足柄下郡) 2017年6月26日

3. Hideji Murakoshi
Optogenetic manipulation and imaging of CaMKII-Rho signaling pathway during synaptic plasticity.
(Symposium) 2017 Yonsei Univ-Korea Univ-NIPS symposium. Seoul, Korea, Apr 21-22, 2017

4. 村越秀治
2光子蛍光寿命イメージングによる光操作分子の開発と今後の展開
分子研研究会「分子観察による生命の階層横断的な理解」分子科学研究所(愛知県岡崎市)
2017年3月21日

5. 村越秀治
Imaging protein activity by 2-photon fluorescence lifetime imaging microscopy
The 1st AiBSシンポジウム 岡崎カンファレンスセンター(愛知県岡崎市) 2017年2月19日

6. Hideji Murakoshi
Spatiotemporal manipulation and imaging of signaling molecules in dendritic spines
(Symposium) The 47th NIPS International Symposium "Decoding Synapses". Aichi, Japan, October 26-28, 2016.

7. 村越秀治、柴田明裕、安田涼平、鍋倉淳一
神経細胞内シグナル伝達の光操作と分子活性イメージング
生理研研究会「生体多元シグナルダイナミクスの計測と操作」生理学研究所(愛知県岡崎市) 2016年9月15日

8. 村越秀治
光操作とイメージングによる細胞内単一経路シグナル伝達解析に向けて

第1回ルミノジェネティクス研究会 熱海共
済会館（静岡県熱海市）2016年7月23日

(4)研究協力者
()

9. 村越秀治

2光子蛍光寿命イメージングによるシナプス
内生化学反応の可視化と操作
第 25 回日本バイオイメージング学会 名古
屋市立大学（愛知県名古屋市） 2016 年 9 月
5 日

〔図書〕(計1件)

1. 村越秀治

「第2章 少数で伝える～神経シナプスのシ
グナル伝達～」
少数性生物学 永井健治・富樫祐一〔編〕日
本評論社 2017年3月 p9-16

〔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
<http://www.nips.ac.jp/multiphoton>

6. 研究組織

(1)研究代表者

村越 秀治 (Murakoshi, Hideji)
生理学研究所・脳機能計測・支援センター
准教授
研究者番号：90608142

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：