

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19192

研究課題名(和文)三量体Gタンパク質の光操作技術の開発

研究課題名(英文)Development of a method to optically control heterotrimeric G-proteins

研究代表者

佐藤 守俊(Sato, Moritoshi)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：00323501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：G_qはGタンパク質連結型受容体の活性化に伴って細胞膜で活性化され、Ca²⁺の濃度上昇を誘起する三量体Gタンパク質である。本研究では、細胞膜近傍におけるG_qの動態を光でコントロールすることにより、当該タンパク質の活性と細胞内Ca²⁺濃度の光操作を実現するというものである。上述のように作製したPA-G_qは青色光に応答して可逆的に活性化し、細胞内のCa²⁺濃度を青色光照射のON/OFFにより自由自在にコントロールできる。さらに、cAMPの濃度をコントロールできるPA-G_sや、赤色光スイッチタンパク質(PhyB-PIFシステム)を用いて赤色光で三量体Gタンパク質を光操作できる技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子の機能を光で活性化する技術は、1970年代に創案されたcaged compoundが最初のものである。しかし、この合成化学に基づくアプローチでは光操作可能な対象が限定されたり、光操作の可逆性が無いという点が大きな課題であった。本研究で開発した光操作技術は、光照射に忠実に応答して可逆的にセカンドメッセンジャー(Ca²⁺およびcAMP)の濃度をコントロールできるという特長を持っている。本研究により、様々な生命現象の理解において鍵となるセカンドメッセンジャーの光操作が実現し、基礎生命科学の広範な分野に大きなインパクトを与えている。

研究成果の概要(英文)：Alpha subunits of heterotrimeric G proteins (G_α) are involved in a variety of cellular functions. Here we report an optogenetic strategy to spatially and temporally manipulate G_α in living cells. More specifically, we applied the blue light-induced dimerization system, known as the Magnet system, and an alternative red light-induced dimerization system consisting of Arabidopsis thaliana phytochrome B (phyB) and phytochrome-interacting factor 6 (PIF6) to optically control the activation of two different classes of G_α (G_q and G_s). By utilizing this strategy, we demonstrate successful regulation of Ca²⁺ and cAMP using light in mammalian cells. The present strategy is generally applicable to different kinds of G_α and could contribute to expanding possibilities of spatiotemporal regulation of G_α in mammalian cells.

研究分野：生体関連化学

キーワード：光操作 三量体Gタンパク質 光スイッチタンパク質 光遺伝学 セカンドメッセンジャー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

2005年、米国スタンフォード大学の Karl Deisseroth 博士らによって、光駆動型イオンチャネル（チャンネルロドプシン；ChR2）が神経科学に応用され、光操作に立脚した学問分野（光遺伝学）が始まった。しかし、チャンネルロドプシンはイオンチャネルであるため、その応用範囲は神経細胞等の興奮性細胞に限定されてしまう。もし光遺伝学の応用範囲を大幅に拡張し様々な生命現象を自由自在に光で操ることができるようになればライフサイエンスは大きく変わると確信し、研究代表者の佐藤は新しい光操作技術の開発を行ってきた。具体的には、様々なタンパク質の活性を光で操作するために、アカパンカビの小さな青色光受容体に様々なプロテインエンジニアリングを施し、独自の光スイッチタンパク質“Magnet システム”を開発した。さらに、ゲノムを光操作する技術の創出が重要と考え、ゲノム編集ツール（CRISPR-Cas9 システム）と Magnet を組み合わせて、ゲノムの塩基配列を光刺激で編集できる光操作ツール（PA-CRISPR）を開発した。さらについで最近、CRISPR-Cas9 システムとは異なる特長を有するゲノム改変ツールの Cre-loxP システムと Magnet を組み合わせ、DNA 組換え反応を生体内で自由自在に光操作できるツール（PA-Cre）を開発した。このような背景・経緯のもと、本研究では、上述のゲノムの光操作技術とは全く異なる新しい光操作技術として、細胞内シグナル伝達において鍵となるセカンドメッセンジャー（Ca²⁺および cAMP）を自由自在に光照射でコントロールするための分子プローブ（PA-Gaq および PA-Gas）を開発し、今までにない新しい光遺伝学の開拓に挑戦したいと考えている。

2. 研究の目的

本研究では、この Magnet システムを応用して、細胞内シグナル伝達において鍵となるセカンドメッセンジャー（カルシウムイオン（Ca²⁺）および環状アデノシンリン酸（cAMP））の動態制御を担う三量体 G タンパク質を自由自在に光照射の ON/OFF でコントロールするための分子プローブを設計・開発する。Ca²⁺と cAMP は細胞の分化・増殖や神経機能、免疫機能等の様々な生命現象の制御に関わる極めて一般性の高いセカンドメッセンジャーである。分子の機能を光で活性化する技術は、1970年代に創案された caged compound が最初のものである。ニトロベンジル基に代表される光感受性官能基を用いて不活性化（caged）した小分子（グルタミン酸等の神経伝達物質や環状核酸など）の当該官能基を光照射で解離させ、小分子の本来の機能を出現（uncaging）させるという優れたアイデアである。しかし、この合成化学に基づくアプローチでは光操作可能な対象が限定されたり、光操作の可逆性が無いという点が大きな課題であった。一方、研究代表者が天然の光受容体の改変に基づいて開発した光スイッチタンパク質“Magnet システム”は、光照射に忠実に応答してタンパク質相互作用の ON/OFF を自由自在にスイッチングできるという特長を持っている。従って、本研究の分子プローブ（PA-Gaq および PA-Gas）は高い応答性と可逆性、時空間制御能を兼ね備えたツールとして開発できていると考えている。本研究により、様々な生命現象の理解において鍵となるセカンドメッセンジャー（Ca²⁺および cAMP）の光操作が実現すれば、基礎生命科学の広範な分野に大きなインパクトを与えていると考えている。

上述のように、2005年以降、チャンネルロドプシン（ChR2）が世界中の研究室で爆発的な勢いで利用されるようになり、脳神経系に関するわれわれの理解はこれまでの技術では到達しえなかった領域に及びつつある。一方で、ChR2の技術的限界も指摘されている。ChR2は脳の神経細胞に形成された“記憶”の読み出しを光操作することは得意だが、神経細胞内のシグナル伝達を制御できないため、神経細胞に記憶そのもの（特定の遺伝子の発現や神経伝達効率の長期増強（long-term potentiation ; LTP）など）を形成させることはできない。本研究では、記憶の

形成に関わる神経細胞のセカンドメッセンジャー (Ca^{2+} および cAMP) の細胞内シグナル伝達を光操作することにより、神経細胞に直接、光刺激で記憶を形成させる技術 (PA-Gaq および PA-Gas) の創出に挑戦する。

3. 研究の方法

三量体 G タンパク質は α , β , γ という 3 つのサブユニットからなる。このうち α サブユニット ($\text{G}\alpha$) がセカンドメッセンジャーの動態制御に重要な役割を果たす。 $\text{G}\alpha$ は本来、G タンパク質連結型受容体 (GPCR) の活性化に伴って細胞膜で活性化され、それに続いて、エフェクターと総称されるタンパク質 (Ca^{2+} 濃度の上昇に寄与するホスホリパーゼ $\text{C}\beta$ ($\text{PLC}\beta$) や cAMP の生成に寄与するアデニル酸シクラーゼ (AC) など) と相互作用してこれらを活性化し、最終的に当該セカンドメッセンジャーの生成が誘起される。本研究では、光刺激によって $\text{G}\alpha$ サブユニットを活性化するアプローチを創案するとともに、このアプローチを、 $\text{PLC}\beta$ を活性化して細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇に寄与する $\text{G}\alpha\text{q}$ アイソフォーム、および AC を活性化して cAMP の生成に寄与する $\text{G}\alpha\text{s}$ アイソフォームに応用する。さらに、光スイッチタンパク質として、研究代表者が開発した青色光スイッチタンパク質の Magnet システムに加えて、赤色光スイッチタンパク質の PhyB-PIF システムも採用し、青色光と赤色光によるセカンドメッセンジャー (Ca^{2+} および cAMP) の光操作を実現する。

4. 研究成果

研究代表者は、次に説明するように、細胞質と細胞膜の間で $\text{G}\alpha\text{q}$ の動態をコントロールすることにより、その活性を光操作できることを見出した。具体的には、青色光スイッチタンパク質である Magnet システムに CAAX モチーフを連結して細胞膜に局在化させた。さらに $\text{G}\alpha\text{q}$ にも Magnet システムを連結した。暗所では $\text{G}\alpha\text{q}$ は不活性型として細胞質中に存在するが、光を照射すると Magnet システムは二量体を形成し、 $\text{G}\alpha\text{q}$ は細胞膜に移行する。この細胞膜への移行によって $\text{G}\alpha\text{q}$ は活性化し、エフェクターの $\text{PLC}\beta$ の活性化を引き起こして最終的に Ca^{2+} の濃度上昇を誘起できることが分かった。このように作製したツール“PA- $\text{G}\alpha\text{q}$ (photoactivatable $\text{G}\alpha\text{q}$)”は、光照射をやめれば、Magnet システムが単量体に戻るので、 $\text{G}\alpha\text{q}$ は細胞膜から離れて再び不活性型に戻り細胞内の Ca^{2+} の濃度は減少する。PA- $\text{G}\alpha\text{q}$ のこの反応は可逆的なので、光照射の ON/OFF により自由自在に Ca^{2+} 濃度を増減させることができる。

PA- $\text{G}\alpha\text{q}$ は青色光に応答する Magnet システムを用いて開発しているため、青色光で $\text{G}\alpha\text{q}$ の酵素活性と細胞内 Ca^{2+} 濃度の光操作を実現できるツールである。本研究ではさらに、Magnet システムを赤色光スイッチタンパク質で置き換えることにより、赤色光でコントロールできる PA- $\text{G}\alpha\text{q}$ を開発した。赤色光スイッチタンパク質として、シロイヌナズナが有する光受容システム (PhyB-PIF システム) を用いた。開発した PA- $\text{G}\alpha\text{q}$ は赤色光照射に応答して細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させることがわかった。さらに、赤色光の ON/OFF によって、可逆的に Ca^{2+} 濃度を増減できることも示した。

さらに本研究では、PA- $\text{G}\alpha\text{q}$ を改変して、 Ca^{2+} とは全く異なるセカンドメッセンジャーの cAMP を生成する三量体 G タンパク質の $\text{G}\alpha\text{s}$ サブユニットの光操作を試みた。具体的には、上述の赤色光に応答する PA- $\text{G}\alpha\text{q}$ の $\text{G}\alpha\text{q}$ ドメインを $\text{G}\alpha\text{s}$ で置き換えることにより PA- $\text{G}\alpha\text{s}$ を設計・開発した。cAMP 応答エレメント (CRE) を導入したルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを利用して評価を行ったところ、PA- $\text{G}\alpha\text{s}$ は赤色光照射の ON/OFF に応答して活性化/不活性化し、cAMP の細胞内濃度をコントロールできることがわかった。さらに細胞内で生成する cAMP の濃度は CRE を介した遺伝子発現に十分であり、PA- $\text{G}\alpha\text{s}$ を用いることにより生理的な

現象を光操作できることも明らかになった。

以上のように、本研究では Ca^{2+} の動態に関与する三量体 G タンパク質の α サブユニット (G α q) の光操作技術を開発すると共に、その赤色化を実現した。さらに、cAMP の動態に関する三量体 G タンパク質の α サブユニット (G α s) の光操作にも当該技術を拡張できることを示した。Ca $^{2+}$ と cAMP はいずれも細胞内での主要なセカンドメッセンジャーである。本研究で開発した三量体 G タンパク質の光操作技術は様々な生命現象を明らかにするための強力なツールを提供すると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

佐藤守俊, 「生命現象の光操作技術の創出」, 日本薬学会シンポジウム「薬学に革新をもたらす最先端技術の世界 ～基礎研究から臨床まで～」, 2019 年.

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。