

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K05549
研究課題名(和文) 近赤外光に応答する光遺伝学ツールの開発

研究課題名(英文) Near-infrared optogenetic tools

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・講師

研究者番号：60549947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近赤外光に応答する光遺伝学ツールの開発を試みた。新規光遺伝学ツールの作製は光感受性タンパク質と操作したいタンパク質を融合させることで行う。DNA組換え酵素や細胞内シグナル分子に、バクテリア由来の近赤外光応答ドメインを融合し新規の分子を作製した。培養細胞に導入し機能解析を行ったところ、近赤外光により分子が機能を発揮できることを確認した。しかしまだ応答効率が低い点は今後の課題として残る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光を使ってタンパク質の機能を操作するシステムが構築されれば、分子や細胞の機能を調べる研究が飛躍的に進展する。さらに複数の光を使って複数のタンパク質の機能を同時に操作できれば、より複雑な生命現象の理解が進む。本研究で示した近赤外光に応答する光遺伝学ツールの作製の可能性は、今後の生命科学研究への応用に向けた第一歩となる。

研究成果の概要(英文)：The goal of this research is to develop novel optogenetic tools which respond to near-infrared light. Light-sensing domains of a bacterial protein and enzymes or cell signaling molecules are fused to obtain novel light-activatable functional proteins. Near-infrared-light-activatable tools can be combined with other optogenetic tools to control multiple proteins independently with multiple lights. Near-infrared light-sensing enzymes and signaling molecules were generated and cells expressing these molecules are analyzed. These molecules function by the illumination of light, although the efficiency was low. They still need improvements if they are used as a general research tool.

研究分野：細胞生物学

キーワード：光遺伝学 オプトジェネティクス 細胞内シグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経科学の分野ではチャネルロドプシンなどの光遺伝学ツールを使った研究が盛んに行われている。光遺伝学ツールを使えば非侵襲的に、そして時間的・空間的に自由に細胞機能を操作することができる。近年、タンパク質工学・細胞生物学の分野では自然界に存在する光感受性タンパク質をそのまま利用するだけでなく、それらの光感受性ドメインのみを光スイッチとして利用し、新たな機能を持つ光スイッチタンパク質を開発する研究が発展してきた。光受容によって作動する低分子量 G タンパク質、リン脂質修飾酵素、DNA 組換え酵素 Cre、遺伝子発現システム、カルシウムシグナル調節タンパク質などが作成された。カルシウムシグナルに関しては我々を含む 5 つのグループが光スイッチタンパク質を開発している。私が開発した BACCS は、植物由来の光感受性ドメイン LOV2 に Stim タンパク質断片を融合し、Stim により活性化されるカルシウム特異的イオンチャネル Orai の機能を青色光により制御するシステムである。

これまで開発された多くの光スイッチタンパク質は青色光に反応するものである。そのため異なる波長の光を用いて 2 種類の光スイッチタンパク質を同時に操作するといった複雑な制御は困難である。また青色光のような短波長の光は組織の透過性が悪いので、動物個体で利用する場合にはより長い波長の光に反応するスイッチタンパク質を作製することが望まれる。近年、ようやく近赤外光に反応するバクテリア由来のフィトクロムタンパク質が詳細に解析され哺乳類の細胞でも機能することが示された。これにより近赤外光を利用した光スイッチタンパク質作製への道が開けてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) カルシウムシグナル光スイッチ BACCS の改良および近赤外光に反応するカルシウムシグナル光スイッチの作製、(2) 近赤外光に反応する様々な光スイッチタンパク質 (Cre, Ras/ERK, PI3 キナーゼ) の作製、である。Cre は 2 つの DNA 配列 loxP を認識してその間で組換えを起こす酵素で、コンディショナル遺伝子ノックアウトなどに使われる重要な遺伝学ツールである。Ras/ERK は MAP キナーゼカスケードであり、その活性化は細胞の増殖や分化を引き起こす。PI3 キナーゼはホスファチジルイノシトール三リン酸 (PIP3) を生成する酵素である。PIP3 は細胞膜上の内側に存在するシグナル伝達脂質で、細胞の成長・生存、細胞運動、小胞輸送などさまざまな生理作用に重要な働きをする。

3. 研究の方法

(1) カルシウムシグナル光スイッチ BACCS の改良

BACCS の一つ dmBACCS2 について次のような改良を行う。第一に光をオフにしたときのタンパク質機能のオフのスピードの改良である。精密なシグナル制御においてスイッチのオフの速さはオンの速さと同等に重要な要素である。LOV2 の光サイクルや反応のダイナミックレンジを変化させる変異は多く知られており、組み合わせも含めて網羅的に解析する。二つ目はタンパク質を高発現したときにバックグラウンドが上がる点の改良である。ここでは dmBACCS2 のコンポーネントの光スイッチとイオンチャネル dOrai の比に注目する。反応の大きさは変わらず、バックグラウンドの低い dmBACCS2 システムを作製する。作製されたコンストラクトの特性は我々が通常行っているカルシウム指示薬を利用したカルシウムイメージングで検討する。また dmBACCS2 システムに、バクテリアフィトクロム由来の近赤外光反応タンパク質 BphP1 とその結合相手の Q-PAS1 を適用する。BphP1 と Q-PAS1 は近赤外光 (740-780 nm) の光に反応してヘテロダイマーを形成する。

(2) 近赤外光に反応する様々な光スイッチタンパク質の作製

BphP1 と Q-PAS1 のシステムを利用する。Cre 光スイッチに関しては、2 つに分断したスプリット Cre を利用する。2 つのスプリット断片それぞれに BphP1 と Q-PAS1 を融合し、近赤外光依存的に会合させ機能的な Cre タンパク質を復活させる。活性の検証は、Cre-loxP 依存的に発現が赤色蛍光タンパク質 tdTomato から緑色蛍光タンパク質 GFP に切り替わる T/G 細胞を用いる。Ras/ERK 系のシグナル操作の方法として Ras の制御因子 SOS2 を利用する。SOS2 の活性化ドメインを光依存的に細胞膜へと移動させることで、Ras-ERK 系のシグナルが活性化される。Q-PAS1 を細胞膜に局在させるために C 末端に CAAX シグナル配列を付加する。BphP1-SOS2 と Q-PAS1-CAAX を培養細胞に発現させて近赤外光を照射し、SOS2 を活性化させる。PI3 キナーゼの光スイッチに関しては、PI3 キナーゼの制御サブユニットである p85b の iSH ドメインを BphP1 と融合し、Q-PAS1-CAAX と組み合わせることで作製する。

4. 研究成果

(1) BACCS の改良では、LOV2 の光サイクルや反応のダイナミックレンジを変化させる変異を導入し、培養細胞でカルシウム反応を測定したが、改良されることはなかった。他のグループが作製したカルシウムシグナルの光スイッチを参考に dmBACCS2 を改変した変異体の作製も行ったが、光を照射しない状態でのバックグラウンドの細胞内カルシウム濃度が高まっていたり、

応答が小さくなったりと改善されることはなかった。一方、dmBACCS2 と dOrai の発現比をバイシストロニック配列 IRES に様々な変異を導入することで変化させた実験を行ったところ、最終的に以前のものに比べ応答の大きさは同等で、バックグラウンドが低いスイッチを作製することができた。近赤外光でカルシウムシグナルを操作する光スイッチに関して、BphP1 と Q-PAS1 を用いることを検討したが、次に述べるようにスイッチの応答効率が低いことから実現しなかった。カルシウムシグナルの光スイッチに関しては青色光スイッチの改良だけが進展したがこれも重要な成果である。細胞内カルシウムシグナルはあらゆる細胞機能に関わっている重要な情報伝達物質であるので、改良スイッチは様々な生命科学の研究に貢献すると期待できる。

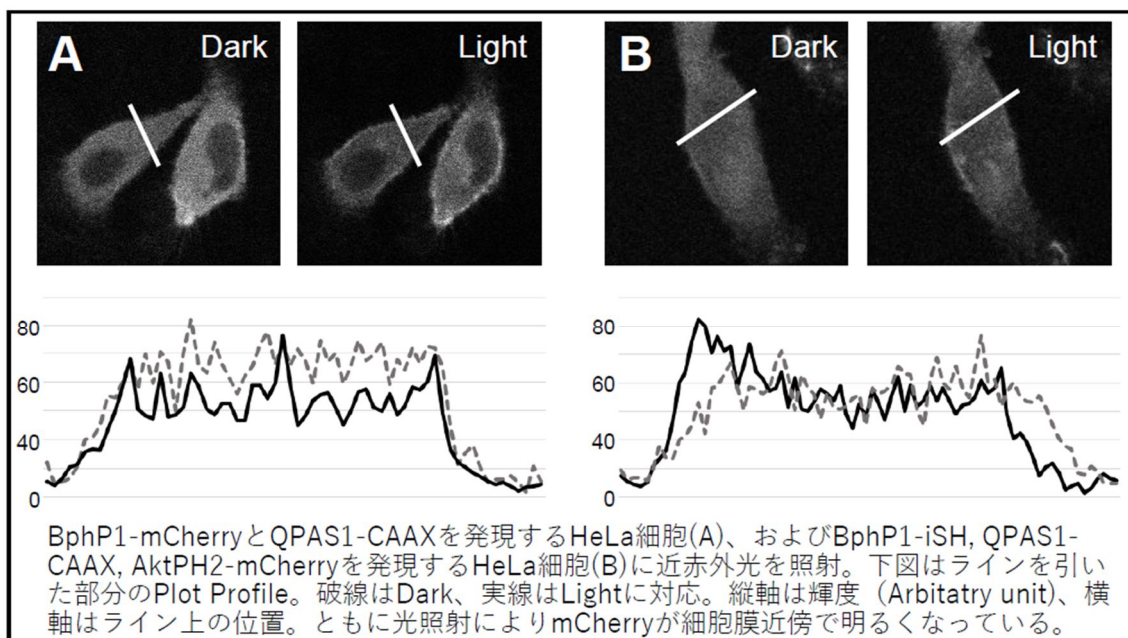
(2) 近赤外光に応答する光スイッチタンパク質の作製では、最初に BphP1 と Q-PAS1 の相互作用を解析した。BphP1 と Q-PAS1-CAAX を HeLa 細胞に発現させて近赤外光依存的に BphP1 が細胞膜へ移行することを確認した (図 A)。ただし細胞膜への移動が確認できる細胞の割合は 20%以下であった。同様の実験を青色光スイッチの CRY2/CIBN で行うと 90%以上の細胞が応答することからすると BphP1/Q-PAS1 の近赤外光による結合効率は高くないと言える。

BphP1/Q-PAS1 とスプリット Cre (Cre の N 末端側 CreN と C 末端側 CreC) の組み合わせで Cre の光スイッチを作製した。融合タンパク質の組み合わせ、順番、核移行シグナルの有無など様々な構造の融合遺伝子を作製し T/G 細胞を使って検討した。24 時間の光照射なしと有りでも最も差が出たのは核移行シグナルのない BphP1-CreC と Q-PAS1-CreN の組み合わせで、組換え率は光照射なしで 16%、光照射ありで 31%であった。光照射により Cre の活性が上昇したことになる。しかしこの組み合わせも含めて全てのコンストラクトで光照射なしでの組換え活性(バックグラウンド活性)が高く見られた。T/G 細胞の応答は不可逆的なので、わずかな BphP1/Q-PAS1 の相互作用があっても Cre-loxP 組換えをおこすと考えられる。バックグラウンド活性は Cre の実用的な応用にとって問題となるので、今後の改良が必要である。

BphP1-SOS2 と Q-PAS1-CAAX の組み合わせによる SOS2 光スイッチを作製した。このスイッチを PC-12 細胞に導入した。PC-12 細胞は神経成長因子添加によって交感神経様に分化することが知られている。この細胞に近赤外光を照射したところ細胞分化の特徴となる突起の伸長が観察された。対照実験として行った青色光スイッチ CRY2/CIBN を用いた同様の実験と比べると分化の効率は低かった。

BphP1-iSH と Q-PAS1-CAAX の組み合わせによる PI3 キナーゼの光スイッチを作製した。活性は、PIP3 と結合する AktPH2-mCherry プロープの局在変化で検定する。HeLa 細胞に導入し光による光スイッチタンパク質の活性化を行ったところ頻度が低いながらも AktPH2-mCherry が細胞膜に移行する様子を観察することができた (図 B)。

全般的に今回行った BphP1/Q-PAS1 を用いた実験では近赤外光に対する応答が悪かった。光応答に必要な発色団のビリベルディン(BV)は哺乳動物細胞に広く存在するが、多くの場合培地に BV を添加する必要がある。BV が不足すると BphP1 と Q-PAS1 は相互作用をしてしまい、バックグラウンド活性が問題となる。BV 添加を行っても BphP1/Q-PAS1 は青色光スイッチ CRY2/CIBN に比べて応答効率はかなり低いことは課題として残る。このような課題があるものの近赤外光によるタンパク質機能操作に関しては試行錯誤の末、進展があったのは大きな成果である。近赤外光を用いたオプトジェネティクスは多波長光による複数分子の光操作を可能にする点、組織透過性が高いため動物個体での応用が期待できる点で利用価値が高く、今後更なる改良を行いたい。



BphP1-mCherryとQPAS1-CAAXを発現するHeLa細胞(A)、およびBphP1-iSH, QPAS1-CAAX, AktPH2-mCherryを発現するHeLa細胞(B)に近赤外光を照射。下図はラインを引いた部分のPlot Profile。破線はDark、実線はLightに対応。縦軸は輝度 (Arbitraty unit)、横軸はライン上の位置。ともに光照射によりmCherryが細胞膜近傍で明るくなっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bufe Bernd, Teuchert Yannick, Schmid Andreas, Pyrski Martina, Perez-Gomez Anabel, Eisenbeis Janina, Timm Thomas, Ishii Tomohiro, Lochner Ginter, Bischoff Markus, Mombaerts Peter, Leinders-Zufall Trese, Zufall Frank	4. 巻 10
2. 論文標題 Bacterial MgrB peptide activates chemoreceptor Fpr3 in mouse accessory olfactory system and drives avoidance behaviour	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-12842-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Akiyoshi Sachiko, Ishii Tomohiro, Bai Zhaodai, Mombaerts Peter	4. 巻 47
2. 論文標題 Subpopulations of vomeronasal sensory neurons with coordinated coexpression of type 2 vomeronasal receptor genes are differentially dependent on Vmn2r1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 887 ~ 900
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ejn.13875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井智浩, Xiyin Deng, 中田隆夫
2. 発表標題 光遺伝学ツールの開発と細胞の分化誘導
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中田 隆夫 (NAKATA Takao) (50218004)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関