

論文の内容の要旨

論文題目 **Assembly domain-based optogenetic system for the efficient control of cellular signaling**

(細胞内シグナル伝達の高効率な操作を実現する
自己集合型光遺伝学システム)

氏 名 古 谷 昭 博

【序】 生体の構成単位である細胞は、細胞内外からの複雑なシグナルを、多様なタンパク質や小分子を介することで、正確な情報伝達を実行し、適切な細胞機能へと結びつけている。こうした細胞機能に重要な役割を担うタンパク質や小分子が、細胞内のいつ、どこで、どのように機能しているかを時空間的に明らかにすることは、生命科学・医学における喫緊の様々な課題解決に対して肝要である。そのためには、時空間精度の高い適切な摂動を細胞に加えて、その応答を観測することが1つのアプローチとなる。近年急速に進展しつつある光遺伝学(optogenetics)はこの希求性に対して有望である。光遺伝学とは、遺伝的にエンコードされた光受容体によって、細胞機能を光により自在に操る手法である。続々と発見された光受容体(AsLOV2, Vivid, CRY2, PhyB, Dronpa など)を様々な細胞内機能性ドメインと組み合わせることで、光遺伝学の可能性は花開いた。光遺伝学は種々の細胞機能の、時空間的に精密な制御の可能性を大きく切り開き、生命現象の謎の解明への新しい手がかりを次々と提供し続けている。細胞機能操作において、光を用いる利点としては、1) 生体に対する毒性が低いこと、2) 時間・空間的な精度が高いこと、3) 可逆的であること(on/off できること)、4) 波長ごとに使い分けられること、5) 赤色・近赤外線には生体透過性があることなどが上げられる。このような優位性を持つ光により、忠実に細胞機能を制御するため、用いられる光受容体の性質としては、1) 光を受けた際に相互作用の親和性が十分に高いこと、2) 光の on/off ですぐさま二量体結合・解離すること、3) 素早いコンホメーション変化・回復が起こることなどが要請される。

当研究室で開発された光遺伝学システム”Magnet” system は、アカパンカビ *Neurospora crassa* 由来の光受容体 VVD (Vivid) を改変したもので、二量体化インタフェースに正電荷を持つ pMag と負電荷を持つ nMag が、青色光の照射を受けてヘテロ二量体化を生じる (図 1)。わけても最も重要な性質は、特定の変異体において二量体解離の速度が極めて高い ($t_{1/2} < 10$ s) ことである。この光受容体をもとに、理想的な光遺伝学ツールを作

製することを本研究の目的とした。

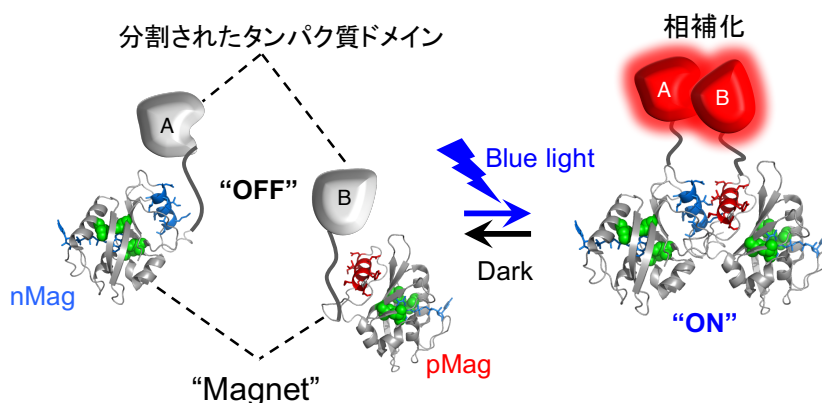


図1 Magnet system.

【Magnet system の改良】 Magnet には VVD と共通した、いくつか性質のよく知られた変異体が存在する。結合が長く続く MagHigh1 や、解離の速い MagFast2 などである。特に MagFast2 はこれまでに報告されている光二量体の解離のキネティクスの中で、半減期として最も速い 6.8 s という値を示しており、理想の光受容体の開発の出発物質として非常に有望である。解離の速さと親和性を両立させるために pMagFast2 と nMagHigh1 を組み合わせて使うと良いことが分かっているが、それでも二量体結合の強さが不十分であった。結合の強さ、即ち親和性を向上させるには、1つのプローブ当たりの pMag の数を増やして、見かけの濃度を高めてやれば良い。その為に、先行研究においては pMagFast2 を直列に複数結合させる手法を採った。これで親和性は改善できたが、その代わりにプローブの発現量が下がってしまう問題が生じた（おそらくコンストラクトの長さのため）。これでは、1つ当たりの親和性が上がっても、全体としての効率が低下してしまうし、さらに効率を上げようとする試み（さらに長くすること）も困難である。今回、私は “集合ドメイン assembly domain (AD)” を用いて pMag をオリゴマー化することを試みた(図 2)。これならそれぞれのモノマーの発現量を下げることなく、それらが自己集合してできるプローブに対してより多くの pMag を導入することができる。集合ドメインは DsRed-Express (4 量体), CaMKII α association domain (CAD) (12 量体), ferritin (24 量体)を試したが、TIRF (全反射照明蛍光) 顕微鏡に基づく評価で、CAD が最も優れていることを確認した。これにより、発現量が高く、親和性も高い光スイッチを実現することができた。

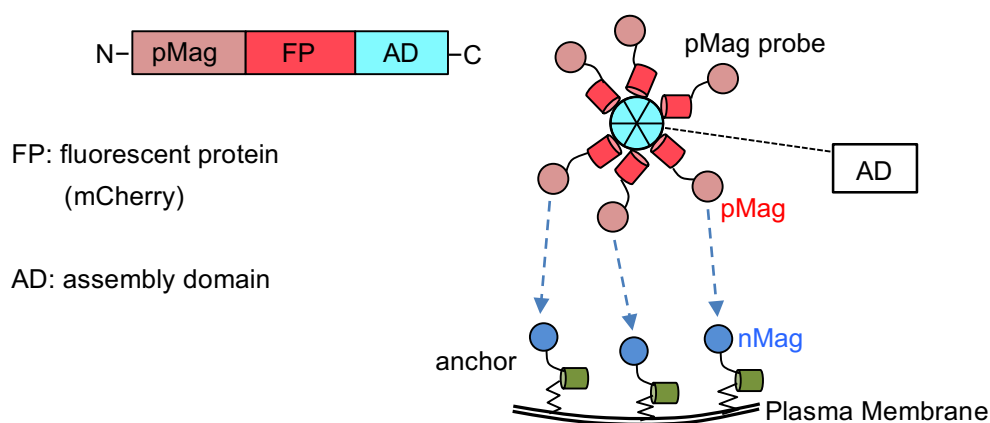


図2 Magnet system への AD の導入

【pMagFast2-mCherry-CAD (F2C)の性質】

CAD を用いて集合させた pMagFast2 プローブが光活性化に対してどう振る舞うかを調べた。青色光を照射、遮断を繰り返すと、細胞質プローブ F2C は細胞膜アンカー nMagHigh1-EGFP-CAAX が局在化された細胞膜に対して移行・解離を明瞭に繰り返した(図 3)。青色光を照射開始すると、瞬時に完全な細胞膜移行が起こった。これはプローブの親和性が細胞膜移行に十分に増幅されていることを示す。一方、解離の半減期はデータから 8.6 s となり、細胞機能の制御においては、非常に速い速度である。つまり、CAD で pMagFast2 をまとめることによる解離速度への影響はほとんどなかった。これは空間制御で非常に重要で、光を照射している領域から拡散して外部へ出た F2C はすぐさま不活性化して、結合能力を失わなければならない。このような on/off の速い光受容体が、精密な空間光制御に必須であり、F2C はその条件を満たす優れた光スイッチである。実際、F2C の発現した細胞に対して特定の領域に光照射すると、その領域に F2C の含む赤色蛍光タンパク質 mCherry が集合して明るくなり、照射部分の外では応答がなかった。光を遮断すれば、速やかに mCherry の蛍光は消えた。他の領域に光照射した際にも、同様の応答が見られた。こうして F2C が光操作に対してさらに優秀な特質を持つことが示された。即ち、F2C は時間的且つ空間的に精緻な光スイッチである。

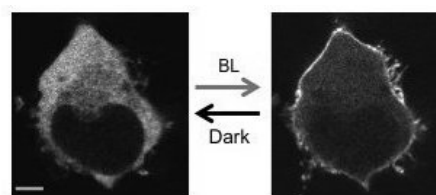


図 3 F2C の光サイクル

【F2C を用いた細胞シグナル伝達】

F2C に細胞機能誘導因子を結合し、その光誘導効率を調べた。CAD により集合した光スイッチプローブは、1つのプローブ当たりに多くの機能誘導因子を持つことから、直列型に比較して、より大きなシグナル誘導効率を示すことが期待される(図 4)。本研究では、細胞膜に存在する低分子量 G タンパク質 Rac1 特異的な GEF (活性化因子) である Tiam1 DH/PH domain を F2C に導入し(TiamF2C と呼ぶ)、青色光依存的に Rac1 を活性化する (Tiam DH/PH domain を細胞膜に移行する) ことで、シグナルを高効率に誘導することができるか試みた。即ち、Rac1 は活性化されると、細胞膜に対してラメリポディア(葉状仮足)やラフリング(波打ち)を誘導するので、青色光の照射により TiamF2C がそのような細胞膜の運動をどの程度誘起するかどうか、蛍光顕微鏡で観察した。その際、ラメリポディアの形成により光照射の前後で増加した細胞面積の計測に基づいて、TiamF2C と、Tiam DH/PH-pMagFast2(3×) (直列型、TiamF2(3×))の膜運動形成効率を比較すると、TiamF2C が 2.7 倍高い効率を示した。この効率上昇は各々の細胞膜への親和性の大小だけでなく、1つのプローブに対してより多くの機能誘導因子(Tiam1 DH/PH)が存在するためだ(multivalency)と考えられる。

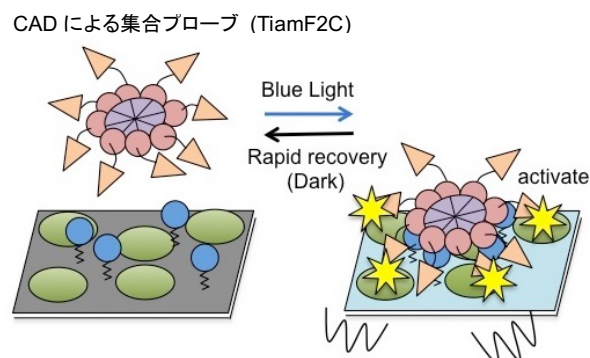


図 4 TiamF2C による光活性化スキーム

さらに、TiamF2C システムの発現した細胞に対して中心部に青色光を照射すると、細胞全体が大きく縮小した(細胞周辺のアクチンが細胞中心で急速に拡大するアクチンの網目に引かれて起こると推測している)。この測定についても TiamF2C と TiamF2(3×)とで光照射前後の細胞面積縮小量で比較すると、TiamF2C が 2.9 倍優れているという有意な差が得られた。

さらに、TiamF2C システムの発現した細胞に対して中心部に青色光を照射すると、細胞全体が大きく縮小した(細胞周辺のアクチンが細胞中心で急速に拡大するアクチンの網目に引かれて起こると推測している)。この測定についても TiamF2C と TiamF2(3×)とで光照射前後の細胞面積縮小量で比較すると、TiamF2C が 2.9 倍優れているという有意な差が得られた。

TiamF2C と TiamF2(3×)についてのこれら 2 つの結果から、1つのプローブ当たりの機能誘導因子の数の

多さ, 加えて pMag の数に基づく親和性の高さが細胞機能光誘導の効率向上の上で大きな要素となっていることが分かった。

TiamF2C のラフリングの光誘導の様子を 4D-movie で撮影した(図 5)。細胞のやや外側に領域を設定し, 青色光を照射すると, すぐさま応答が開始し, 光を遮断すると, 数分で応答が停止した。z 軸方向に 5 μm 程度の高さのラフリングを確認し, その生成から消滅までを追跡することができた。また, 数多くの大きなラフリングがのたうつ様子を捉えた。このようなデータはこれまでに無かったもので, 細胞膜運動のライブイメージングにおいて新たな局面を切り開いたと考えている。

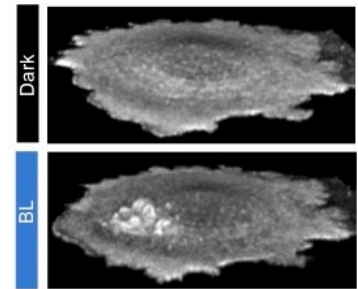


図 5 TiamF2C による
細胞膜運動の光誘導

【まとめ】 本研究において, 光遺伝学システム Magnet system を元に, 発現の良さ, 親和性の高さ, on/off の速さ(時空間制御の精密さ), 細胞機能誘導効率の高さ, といった数々の重要な性質を備えた, 高性能な光スイッチシステムを開発した。この理想的な光遺伝学システムは, 他のシグナル伝達経路においても高効率にはたらく可能性を秘めており, 光遺伝学のコンストラクト設計手法の 1 つとして, その発展をさらに推し進めるものである。