

研究報告書

「光応答性核酸による単一細胞内での光遺伝子制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 小笠原 慎治

1. 研究のねらい

本研究のねらいは、新しい光応答性化合物を創生し、生きた単一細胞内でタンパク質の発現様態を自在に光操作する方法を開発することである。生命現象を単一細胞レベルで見ると、タンパク質が発現するタイミングや場所さらには周期で巧みに制御されていることが分かってきた。例えば、発生初期段階の細胞において局所発現するタンパク質によって頭と尻尾の方向(体軸)が決定されたり、神経細胞において刺激を受けたシナプスだけで局所発現するタンパク質によって記憶が増強される。また、我々が24時間を感じられるのは24時間周期で発現するタンパク質があるからである。このようなタンパク質の発現様態が引き起こす生命活動をより詳細に調べ利用するには、細胞内で起こっているタンパク質発現様態を人工的に操作する方法が必要である。現在のようにただ遺伝子を入れるだけでもしくは完全に破壊するだけの操作では、タンパク質が細胞中で恒常的に発現するか全く発現しない状態しか作り出せない。近年急速に発展している光遺伝学をもってしても、原理上転写段階しか制御できないため、単一細胞内でタンパク質の発現様態を自在に操作することは困難である。ただ、時間空間制御をおこなうにおいて光が最も優れた外部刺激である、ということは間違いない。mRNA からタンパク質への翻訳段階を光制御した例が2001年に報告されているが、不可逆であったためタンパク質発現様態を操作するには不十分であった。そこで、本研究では、翻訳段階を可逆的に光制御するための新しい光応答性分子を創生し、生きた単一細胞内でタンパク質の発現様態を自在に光操作する方法を開発する。現段階で類似の研究を行っている研究者はおらず、この方法が確立すれば、世界で初めて生きた単一細胞内でタンパク質の周期的発現や局所的発現を人工的に操作することが可能になると期待された。

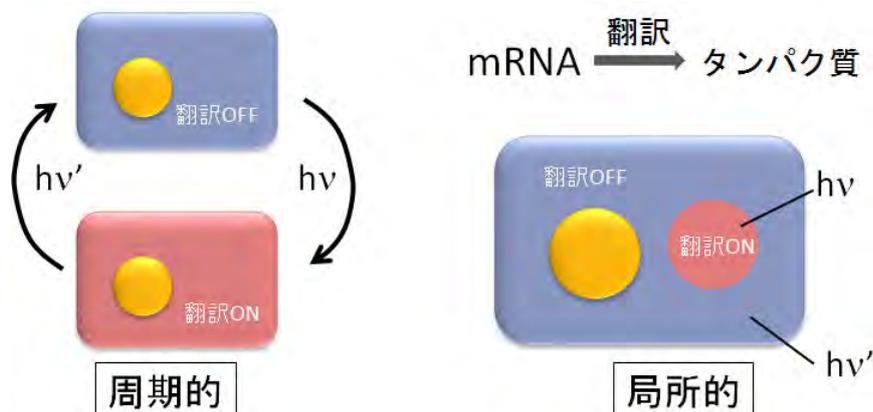


図1 本研究で目指すタンパク質発現様態の光操作

2. 研究成果

(1) 概要

mRNA からタンパク質への翻訳を光で可逆的に制御するための光応答性の7-メチルグアノシン (cap) を有機合成により創生し、細胞内でタンパク質の発現を光でスイッチングする方法を開発した。この方法を使い、これまでの方法では制御が困難であった生細胞内におけるタンパク質の周期的および局所的な発現を光で誘導することに世界で初めて成功した。また、本方法を細胞機能の光制御へ応用するため、可視光で制御できる新しい光応答性 cap を開発した。

(2) 詳細

研究テーマ A「研究テーマ翻訳を可逆的に制御するための新規光応答性分子(光応答性 cap)の創生」

mRNA の 5' 末端には cap が付加されている。翻訳が起こる最初のステップで cap に翻訳開始因子 eIF4E が結合する。その後、複数の因子が mRNA に連鎖的に結合し、最終的にリボソームが mRNA へ誘導されタンパク質が合成され始める。この翻訳初期過程で重要なのは最初の cap と eIF4E の結合であり、この結合なくして翻訳は起こらない。そこで図2に示すような光応答性 cap を考えた。この光応答性 cap は本課題が始まる以前に開発したフォトクロミック塩基 (S. Ogasawara et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* (2008)) を基に合成した。3D 分子モデリングから、光応答性 cap が trans 体の時は立体障害により eIF4E と結合できないが、cis 体では立体障害が解消され eIF4E と結合できるという知見を得た。光応答性 cap の X の部分にどの程度の大きさの芳香族化合物を導入すれば cis-trans 異性化で効果的な翻訳制御ができるのかを調べるため、フェニル基からピレニル基まで段階的に大きさを変えた4種類を合成した。合成した光応答性 cap を無細胞転写系で蛍光タンパク質 (Venus) をコードする mRNA の 5' 末端に導入した。mRNA をマイクロインジェクションで HeLa 細胞へ注入し cis 体と trans 体の時に発現するタンパク質の量を蛍光強度から比較した。結果、3D モデリングが示唆したように trans 体より cis 体の方がタンパク質の発現量が多く、フェニル基を導入した光応答性 cap においてその差はおよそ 60 倍であった。また、ナフチル基以上の大きさになると、cis 体であっても嵩高すぎて eIF4E と結合できず翻訳が起こらないことが分かった(論文1)。

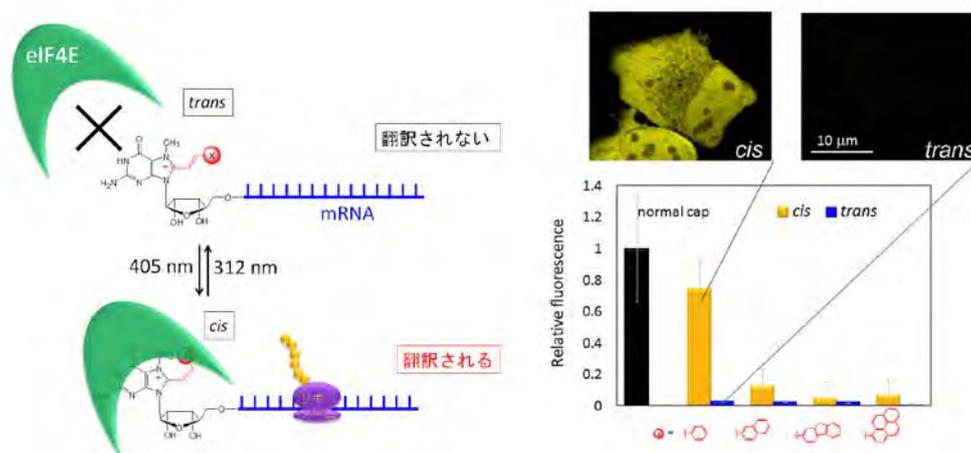


図2 光応答性 cap の異性化を利用した翻訳の光制御法

研究テーマ B「単一細胞内でタンパク質の周期的発現および局所的発現を光誘導」

研究テーマ A の結果を踏まえて以降はフェニル基を導入した光応答性 cap を用いることにした。まず初めにタンパク質の周期的発現を光操作することを試みた。周期的発現を見るために半減期が2時間程度になるよう特殊なアミノ酸配列を付加した蛍光タンパク質の発現を制御することにした。光応答性 cap が trans 体である翻訳されない状態の mRNA を HeLa 細胞へマイクロインジェクションし、405 nm の光を30秒、312 nm の光を20秒、2時間半の間隔で照射した。結果、405 nm の光を照射した直後から蛍光が増し、312 nm の光を照射すると徐々に減っていく様子が観察された。つまり、翻訳を可逆的に光制御し、タンパク質の発現を周期的に操作することに成功した(図3)。さらに、周期発現の間隔を容易に変化させられることも示すことができた。

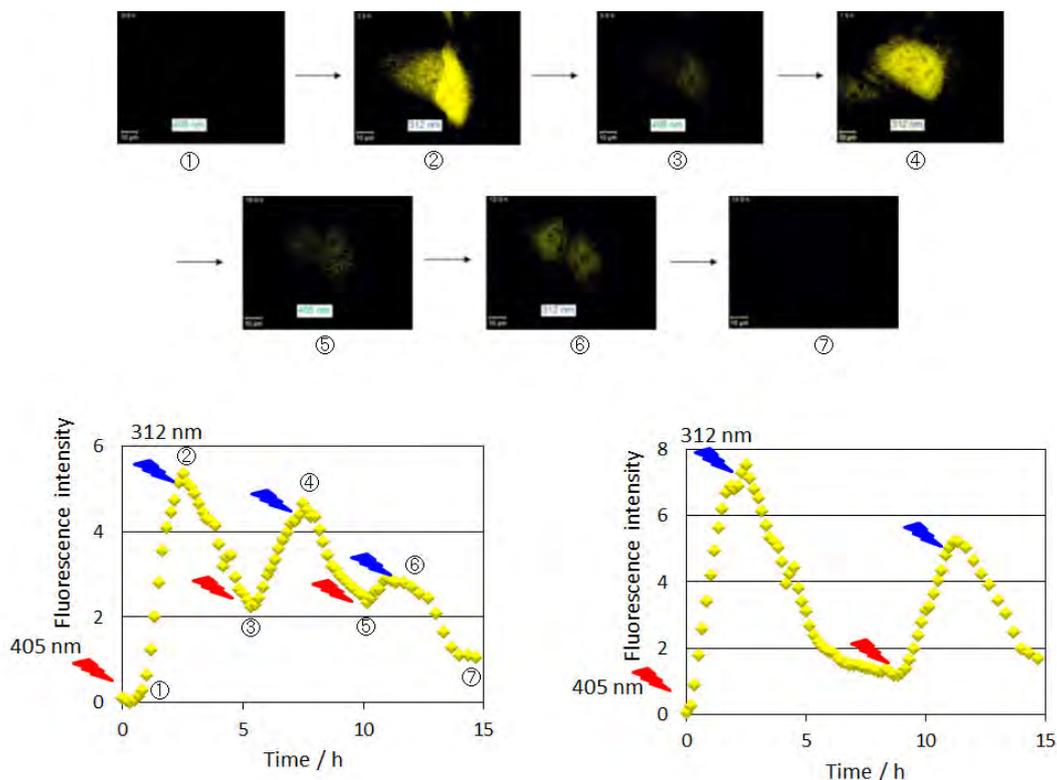


図3 翻訳の光制御法で蛍光タンパク質を周期的に発現させた例

続いて、単一細胞内でタンパク質の局所的な発現を光誘導する実験を行った。ただの蛍光タンパク質を局所的に発現させても瞬時に拡散してしまい、局所発現を観測できないため、微小管に結合する tau タンパク質を蛍光タンパク質に融合させることにした。こうすることで局所発現した蛍光タンパク質を発現場所付近の微小管に固定することができる。タンパク質を発現させたい場所に 405 nm のレーザーを10分間照射すると同時に細胞全体に 312 nm のバックライトを断続的(5分毎)に20秒間照射すると、405 nm のレーザーを照射した部位のみから新しい蛍光が観測された(特許1)。同様の実験を mRNA をインジェクションしていない細胞で行っても変化は見られないことから、新たに観測された蛍光が局所的に発現した蛍光タンパク質由来であると結論づけられた。

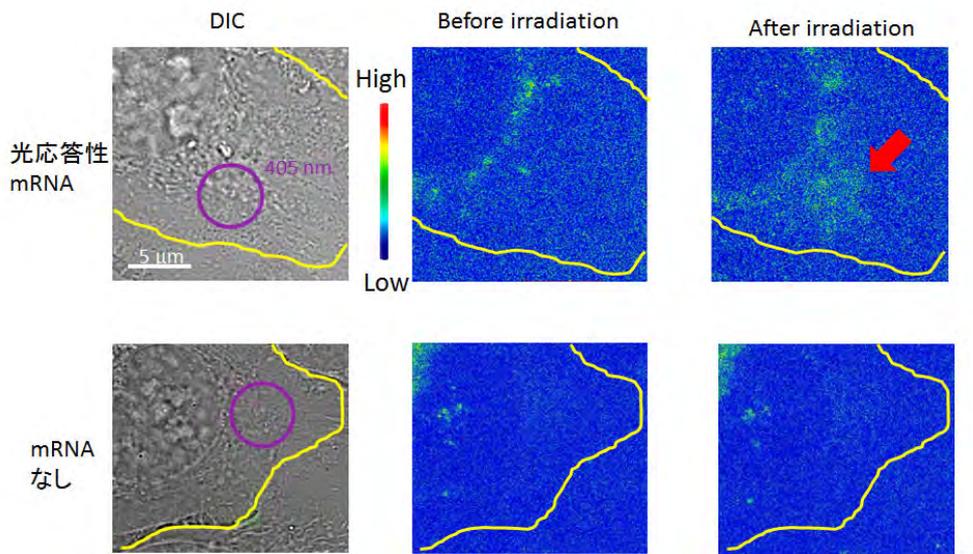


図4 翻訳の光制御法で蛍光タンパク質を単一細胞内で局所的に発現させた例

研究テーマ C「可視光に反応する光応答性 cap の創生」

翻訳の可逆的光制御法を用いてタンパク質の発現様態(周期的、局所的)を光操作することに成功したが、ここで用いた光応答性 cap は異性化に紫外光を必要とし、特に 312 nm の光は細胞にとって有害である。そこで、細胞に毒性の少ない可視光領域の光で異性化させられる光応答性 cap の開発に取り組んだ。具体的にはこれまでオレフィンリンカーで芳香族化合物を導入していたところをアゾリンカーに変更した。こうすることでより長波長を吸収する $n\pi^*$ 遷移によって異性化させられると考えた。実際に trans 体から cis 体へは 460 nm の光で、cis 体から trans 体へは 550 nm の光で異性化させられるようになった(論文2)。この光応答性 cap は cis 体の安定性が低く数秒以内に trans 体へ戻った。つまり、460 nm の光を照射している間だけ cis 体で存在し、翻訳が起こることになる。蛍光タンパク質の発現を光制御した結果、460 nm の光照射時間に依存して発現量が増していくことを確認した(図5)。

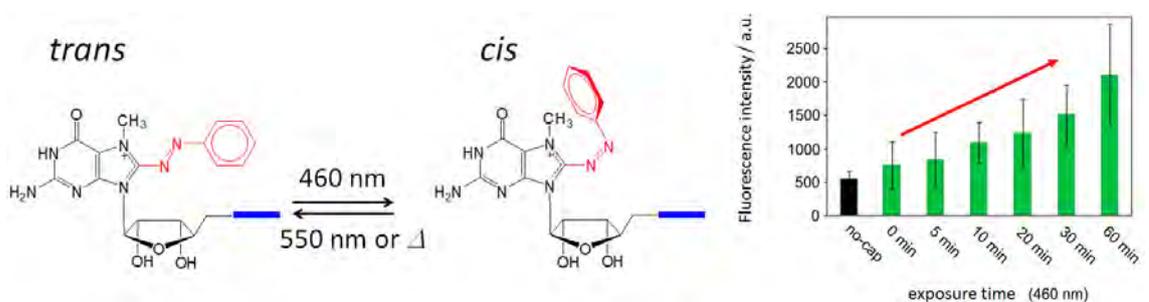


図5 可視光で異性化させられる光応答性 cap

3. 今後の展開

プロトタイプではあるが、現時点で単一細胞内でタンパク質の周期的発現、局所的発現を操作できる方法は本課題で開発した方法が世界唯一である。今後は光応答性 cap の改良と細胞機能操作への応用を並行して進めていく予定である。cis 体が熱的に安定なアゾ型光応答性 cap や二光子励起できる光応答性 cap を開発し、核酸などの生体分子や細胞に損傷を与えない領域の光でタンパク質の発現を操作できるようにする必要がある。応用先として再生医療や神経科学を考えている。試験管内臓器製造における難題の一つにいかにして複数種の細胞からなる細胞塊(組織)を作るかがある。本課題で開発したタンパク質発現の光操作法を用い、分化誘導因子を多能性幹細胞集団の個々の細胞ごとに異なったパターンで発現させ別々の細胞へと分化誘導し一つの多能性幹細胞集団から直接体内の組織と同じ組成の細胞集団を作りだせる可能性がある。また、未だにそのメカニズムが殆ど分かっていない記憶について、この光操作法を使えば、記憶が作られ増強される状況(タンパク質の局在)を人工的に再現することができ、より深い理解に繋がると期待される。もっと先を見据えれば、生きた細胞内で光応答性 cap を目的の mRNA のみに付加するシステムを構築し、光応答性 cap を培地に添加する(もしくは生体に注射する)だけで目的のタンパク質の発現を光操作できるようにしようと考えている。そうすることで、誰でも簡単にこの方法を使えるようにしたい。

4. 自己評価

本課題の目標は生きた単一細胞内でタンパク質の発現様態(周期的、局所的)を人工的に光誘導する方法の開発であった。研究期間内に新しい光応答性分子(光応答性 cap)の創生に成功し、世界で初めて mRNA からタンパク質を合成する過程を可逆的に光制御する方法を確立することができた。さらに、その方法を用い生きた単一細胞内でタンパク質の発現を周期的にまた局所的に光操作することに成功した。このことから当初の目標は達成したと言える。ただ、この方法はまだプロトタイプであり、応答波長の改善など課題は残った。また、この方法を神経細胞の突起伸長の光誘導に応用したが、再現性がとれず失敗に終わった。突起が目に見えて伸長するには数時間かかり、その間に局所的に発現させたタンパク質が拡散してしまった可能性があること、プロトタイプでは10分間しか局所的な発現を引き起こせず伸長を誘起するにはタンパク質の量が不十分であったこと、などの原因が考えられる。当初の目標のさらにその先へ到達することはできなかったが、生きた細胞内でタンパク質の発現を自在に操作できる方法はこの方法が世界唯一であり、今後あらゆる生命科学研究に寄与するものとする。

5. 研究総括の見解

光の照射により、タンパク質発現を自由にコントロールできる手法の開発を試みた。タンパク質の発現は翻訳開始因子(eIF4E)が mRNA の 5' 末端にある7-メチルグアノシン(cap)に結合することから始まる。eIF4E と結合できないトランス体と結合できるシス体を波長の異なるレーザー光を照射することにより可逆的に変化させることできる cap 分子の開発に成功した。これにより、光制御によって蛍光タンパク質の発現量を周期的に制御することや、細胞内の特定の場所のみ発現させることが可能であることを実証した。他に例のないタンパク質発現の可逆的光制御法を提案し実証したことは、「さきがけ」研究らしいチャレンジングな取り組みであった。今後は、生命科学研究に貢献できる小笠原手法として認知を得られるところまで発展させていってほしい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. S. Ogasawara, M. Maeda, "Photoresponsive 5' -cap for the reversible photoregulation of gene expression" <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 21 , 5457-5459 (2011) |
| 2. S. Ogasawara, S. Ito, H. Miyasaka, M. Maeda, "Photochromic Nucleobase Photoisomerized by Visible Light" <i>Chem. Lett.</i> 39 , 956-957 (2010) |
| |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

1.

発 明 者: S. Ogasawaras, M. Maeda

発明の名称: RNA CONTAINING NUCLEOSIDE COMPOUND, METHOD FOR CONTROLLING AMOUNT OF PROTEIN PRODUCTION FROM THE RNA AND NUCLEOSIDE COMPOUND

出 願 人: 独立行政法人理化学研究所

出 願 日: 2011/2/18

出 願 番 号: PCT/JP2011/053577

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<国際学会発表>

1. The 22nd CDB Meeting RNA Science in Cell and Developmental Biology II, June 11-13, 2012 (RIKEN CDB, Kebe)
○Shinzi Ogasawara, Mizuo Maeda
"Translation Control by Light"
2. The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, November 10-12, 2011(Hokkaido University, Hokkaido)
○Shinzi Ogasawara, Mizuo Maeda
"Reversible photoregulation of protein expression by photoresponsive mRNA"

<国内学会発表>

3. 日本化学会第 93 春季年会 特別企画講演(光化学と光生物学のマリアージュ)、2013 年 3 月 22-25 日 (立命館大学・滋賀)
○小笠原慎治
「光遺伝子制御」
4. 第 7 回ケミカルバイオロジー学会、2012 年 6 月 7-9 日 (京都大学・京都)
○小笠原慎治、前田瑞夫
「タンパク質発現を可逆的に光制御できる新規遺伝子操作法-単一細胞内におけるタンパク質



の局所的誘導-」

5. 日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月 26-30 日 (神奈川県・横浜)

○小笠原慎治、前田瑞夫

「光応答性 cap による翻訳の可逆的光制御」

6. 日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月 26-29 日 (近畿大学・大阪)

○小笠原慎治、前田瑞夫

「生体への応用を指向したフォトクロミック塩基の開発」