

## 研究報告書

### 「光で細胞内現象を完全再現する超精密タンパク質発現操作技術の開発と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年12月～2019年3月

研究者: 小笠原慎治

#### 1. 研究のねらい

光遺伝学という分野がある。この分野の手法を使うと、生体内でタンパク質の発現を容易に時空間操作できる。細胞内現象の根幹をつかさどるタンパク質の発現動態を人工的に操作できる画期的な手法であるとされた。しかし実際は、その原理上、大雑把にしか発現動態を操作できていない。とりわけ発現数においては全く操作することができない。タンパク質は1細胞当たり少ないものでは数十個程度しか発現しておらず、さらに同じタンパク質でも時期や細胞個々で変動する。タンパク質の「数」には細胞の個性を決める何らかの機能的意味があると推察されるが、現在の手法ではそれを再現できない。本提案では、任意のタイミングで生体内の狙った1細胞だけで、さらには1細胞内の狙った場所だけで、数十個オーダーでタンパク質の発現を操作する「超精密タンパク質発現操作技術」を開発し、細胞内現象を極限の忠実さをもって人工的に再現することがねらいである。そして、同技術を、発生の光操作やシナプス形成の光操作へ応用する。最終的には、超精密タンパク質発現操作技術と最新の可視化技術を統合し、それらの過程でおこる細胞間情報伝達を極限の時空間分解能で捉える究極の技術を誕生させる。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

本課題では、研究者が以前開発した光応答性 cap による翻訳の光制御法を用いた。初めに、生きた細胞内でタンパク質の発現数を光操作できるよう、可視光励起できかつタンパク質を発現しない OFF 状態での発現(リーク発現)を押さえた新型光応答性 cap を開発した。次に、新型光応答性 cap を使いゼブラフィッシュの胚発生過程で squint タンパク質の発現を操作し、同タンパク質の体軸形成における役割を調べた。続いて、リーク発現を徹底的に抑制するためグアノシン四重鎖(G-quadruplex)の光制御の利用を検討した。最後に、HeLa 細胞で微小管結合タンパク質の発現数を光操作した。

##### (2) 詳細

###### 研究テーマ A「新型光応答性 cap の開発」

7-メチルグアノシン(cap)の2位にアゾリンカーを介しフェニル基を導入した新型光応答性 cap を設計し、フェニル基のpara、orthoおよびmeta位にメチル基を修飾した3種類を合成した。どの光応答性 cap も370 nm の光で、およそ80%のコンバージョンでtransからcisへ、430 nm の光でおよそ90%のコンバージョンでcisからtransへ異性化した。新型光応答性 cap のタンパク質発現制御能を評価するため、光応答性 cap を5'末端に付加した蛍光タンパク質(Venus)のmRNAをゼブラフィッシュの胚へインジェクションし、transおよびcisでのタンパク質発現量を見積もった。結果、meta位にメチル基を修飾したタイプの光応答性 cap が最もよい

性能を示し、cis の時のタンパク質発現量は trans に比べ 7.1 倍であった(図 1a, b、論文2、特許1,2)。

数十個の精度でタンパク質の発現を操作するにはリーク発現を抑制し、限りなくゼロに近づけなくてはならない。そこで、光応答性 cap の7位のメチル基を除去し翻訳開始因子 eIF4e との結合力を低下させることで OFF 状態でのリーク発現を抑えようと試みた。その結果、PMT では検出不可能なレベルまでリーク発現を抑制することに成功した(図 1c)。

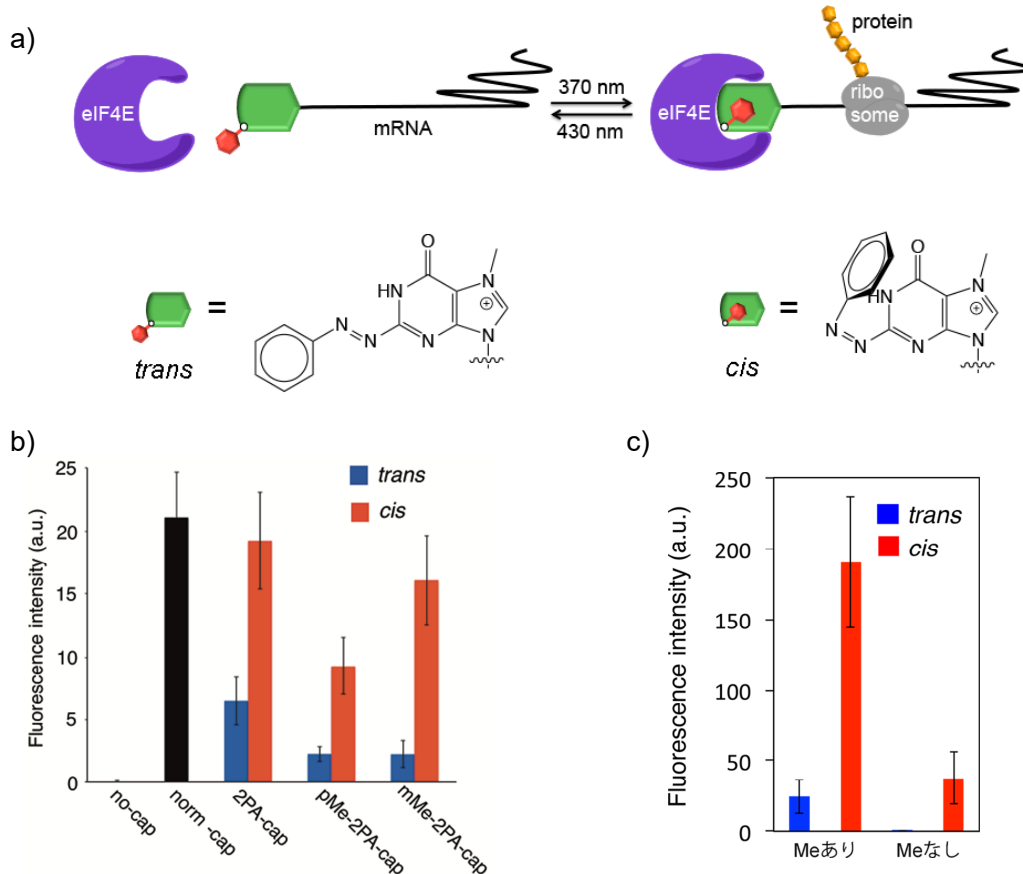


図1 (a)新型光応答性 cap の構造および翻訳の光制御の模式図。(b)trans 型および cis 型におけるタンパク質の発現量。(c)7 位メチル基除去の効果。

新型型光応答性 cap の候補として、8 位にアズリンカーを介しフェニル基を導入し、かつ 7 位のメチル基を除去した分子の合成もおこなった。この分子は、460 nm の光で trans から cis へ、550 nm の光で cis から trans へ異性化した。加えて、cis 型は  $0.63 \pm 0.001$  秒の時定数で trans 型へ熱異性化する特性を備えていた(同領域井上准教授(東京大学)との共同研究)。これは、460 nm の光照射を止めると自動的に瞬時にタンパク質の発現が OFF になることを意味し、発現数を数十個のオーダーで操作する本課題には利点となる。これらの特性から判断して、このタイプの新型型光応答性 cap を採用することにした。

研究テーマ B「ゼブラフィッシュの胚発生の光操作」

テーマ A で開発した新型光応答性 cap を使い、ゼブラフィッシュの胚発生過程で体軸の形成

を司るタンパク質(squint タンパク質)の発現期間を異所的に操作し、二次軸を誘導することで同タンパク質が持つ発現期間の機能的意味を調べた。これまでの研究では、squint タンパク質の強制発現によって頭部のない不完全な二次軸が形成され、その結果から体軸形成には他のタンパク質が支配的であると結論づけられた。しかし、この実験系では squint タンパク質の発現期間は無視されていた。そこで、新型光応答性 cap を使い、squint タンパク質の発現期間を正確に操作し、本来の機能を調べることにした。その結果、同タンパク質の発現期間を正確に再現した場合、完全な頭部を持つ二次軸が誘導された(図2、論文2)。一方、長期間発現させた場合では、頭部の欠損した二次軸が誘導され、以前の実験結果と一致した。このことから体軸発生には、squint タンパク質が支配的に作用し、その発現期間が重要であることが分かった。また、同タンパク質には頭部の形成を阻害する副次的機能があることも発見した。

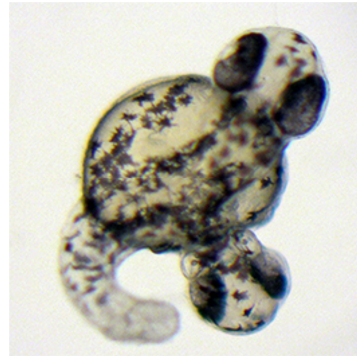


図2 squint タンパク質の発現期間を光操作し誕生した完全な頭部を持つ二次軸。

#### 研究テーマ C「G-quadruplex の光制御を利用したタンパク質発現の光操作」

OFF 状態でのリーク発現を徹底的に抑制するため、G-quadruplex で抑制する手段を検討した。G-quadruplex とはグアノシン四重鎖が作るコブ状の核酸構造体である。G-quadruplex が mRNA の 5' -UTR にあるとリボソームの進行を阻害し、タンパク質の発現が抑制されることが分かっている。そこで、G-quadruplex の光制御を光応答性 cap と併用することで OFF 状態のリーク発現をさらに抑制できなかと考えた。光応答性 cap と類似構造をもつ光応答性核酸を G-quadruplex に導入し光制御した結果、光応答性核酸を4つ導入すると完全な制御が可能であることが明らかになった。比較的合成が容易な DNA に光制御性 G-quadruplex を導入し転写段階でタンパク質の発現を操作することで、mRNA の翻訳への応用の可能性を探ることにした。光制御性 G-quadruplex を CMV プロモーターの下流に導入した蛍光タンパク質のプラスミドを作製し、ゼブラフィッシュの胚で転写の光操作をおこなった結果、G-quadruplex を形成しない時の方がタンパク質の発現量は8倍多かった(論文3)。転写では RNA ポリメラーゼが DNA 上を走行し、翻訳ではリボソームが mRNA 上を走行する。このように、両者には似た機構で作動しており、G-quadruplex の立体障害で走行を阻害する戦略は mRNA でも有効であると結論づけられた。

### 3. 今後の展開

タンパク質の発現数を生きた細胞内で光操作する方法を開発することに成功した。今後は、この方法を用いてタンパク質の発現数が持つ機能的役割を探る応用研究に重点を移していく。特に、神経細胞内で起こる諸現象に着目した研究を進めることが有力である。なぜなら、神経細胞では局所的な翻訳による機能発現が随所にみられ、翻訳を光制御する本法にはうってつけの題材であり、本法でしか実現できないからである。また、胚の発生初期におけるタンパク質の発現をターゲットにした研究にも応用していく。近年の発生生物学では、マウスよりライフサイクルが短く、飼育も容易なゼブラフィッシュを用いるケースが増えている。ゼブラフィッシュの受精卵に

mRNA をインジェクションしタンパク質の機能を調べる方法は以前からよく用いられており、本法ではその mRNA へ光応答性 cap を付加するだけで、タンパク質の発現数を時空間操作することが可能になり、導入するにあたり技術的障壁も少なく、得られる成果は絶大だと予想される。以上の応用研究を通して、タンパク質の発現数の機能的役割を調べ、機能発現の閾値の存在や発現数によって機能が変わるタンパク質を発見できれば世界初の成果となる。

#### 4. 自己評価

本研究の目的は、タンパク質の発現数を光で操作する方法を開発し、胚発生や神経細胞で起こる諸現象におけるタンパク質の発現数の機能的役割を解明することであった。方法の開発は達成されたが、応用には至らなかった。また、新型光応答性 cap を胚発生の光操作へ応用したものの、発現数を持つ機能的役割の解明にはつなげられなかった。その一因として研究体制の問題(人力的問題)が挙げられる。人材を確保し、研究スピードを上げることができていればさらなる応用研究もおこなえたと考えられる。消耗品と機器類への分配、毎年度の配分はバランスよく、研究費を効果的に執行できた。タンパク質の発現はあらゆる細胞内現象の根幹であり、それを時空間操作はもちろん「数」まで操作できる本法は、生命科学全般への波及効果をもたらすと期待される。本法は、ゲノムにシステムを組み込む必要がなく安全面においても利点を有している。このことから、人工臓器作製や有用動植物の作製などへの応用を通じて現代社会が抱える諸問題の解決に貢献できると考えられる。分子軌道計算による光応答性 cap の設計や異性化の過渡吸収測定など領域内共同研究を通して異分野の研究者とのネットワークを構築した。タンパク質の発現数が測定できるようになり、多くのタンパク質の発現数が判明してきた現在、次は発現数を人工的に操作して微小な摂動を加えると何が起こるか?そこから逆遺伝学的にタンパク質の機能を詳細に解明することが求められる。そのような観点から、本研究は細胞生物学を新たな(次の)ステップへ引き上げるものと評価できる。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1)論文(原著論文)発表

1. S. Ogasawara, Reversible Photoregulation of Gene Expression and Translation, *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1408*, 55–66.
2. S. Ogasawara, Duration Control of Protein Expression In Vivo by Light-Mediated Reversible Activation of Translation, *ACS Chemical Biology* **2017**, *12*, 351–356.
3. S. Ogasawara, Transcription Driven by Reversible Photo-control of Hyper-stable G-quadruplexes, *ACS Synthetic Biology* **2018**, *7*, 2507–2513.

##### (2)特許出願

研究期間累積件数: 2 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

1.

発 明 者: 小笠原慎治

発明の名称: Purine nucleoside derivative, polynucleotide and RNA

出 願 人: 北海道大学



出願日: 2017/9/3  
出願番号: PCT/JP2017/032310

2.

発明者: 小笠原慎治  
発明の名称: プリンヌクレオシド誘導体、ポリヌクレオチド及び RNA  
出願人: 北海道大学  
出願日: 2016/9/8  
出願番号: 2016-175758

(3)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)

#### 学会発表

1. 「生体内での翻訳の可逆的光制御」小笠原慎治, 第 98 回日本化学会春季年会, 千葉, 2018. 3
2. 「光操作で生物をつくりかえる」小笠原慎治、日本女子大学バイオイメージングセンターシンポジウム 2017、東京、2017. 12(招待講演)
3. 「発生生物学のための新規光遺伝学的手法」小笠原慎治, 第 88 回日本動物学会, 富山, 2017. 9

#### 著作物

4. 「蛋白質発現を、光で精密操作する」小笠原慎治、日経バイオテク(オンライン版) 2017年03月27日号 日経BP社

#### プレスリリース

5. 「2色の光で遺伝子発現の開始と停止を正確に操作する技術を開発」2017. 1. 5