

シグナル分子の光制御技術とその応用

Study of Cell Signalling Using Optogenetical Tools

代表研究者 東京医科歯科大学 中田隆夫 Tokyo Medical and Dental University Takao  
NAKATA

Spatiotemporal regulation of signalling molecules plays an important role in a symmetry breaking events such as neuronal polarity formation. However, it was technically difficult to activate the signalling molecule in a part of cells. Thanks to the progress in plant biology, the molecular mechanisms of light-activated proteins in plants were being elucidated, and they can be applied as tools to examine signalling in animal cells. We are developing new photoswitch molecules to perturb cell signalling in spatiotemporal manner, and applying them to cells and animals. We report some examples of these attempts currently undergoing in our laboratory. Photoactivated adenylylcyclase (PAC) is blue-light activated adenylylcyclase in *Euglena*. We made a transgenic mouse which express PAC in a subset of neurons. Using this system, we are going to analyze a role of cAMP in axonal projection in vivo. PI3K cascade which include Par complex, rho family G proteins, and cytoskeletal proteins play an important role in neuronal polarity formation. We made a molecular switch which activates cdc42, a rho family G protein, involved in polarity formation in various types of cells. Blue light irradiation caused filopodia formation in the switch transfected COS cells.

研究目的

様々な生命現象について、それに関わるシグナル分子の同定が進み、その機能が遺伝子欠失動物などで検証されている。しかし、神経細胞のように複雑な形態をした細胞では、シグナル分子がどこで活性化されるかでその作用は異なると考えられる。また、セカンドメッセンジャーの中には、その一過性の濃度変化が異なる細胞応答を起こすことが知られている。これら、シグナルの時間空間的制御の問題は、重要であるにも関わらず、これまでよい研究方法がなかった。遺伝子の過剰発現では発現量のコントロールが困難であった。また遺伝子ノックアウト動物から得られる結果は強力であるが、その分子があるか、ないかの二者択一の状態しか作れなかった。この問題にアプローチするには、光でスイッチオンオフできるシグナル分子を開発し、細胞や個体に遺伝子導入するのが最も良い。光刺激の大きさがコントロール出来れば、様々な強さ、位置、時間の刺激に対しての細胞応答を見ることが出来る。生命を工学的なシステムに例えると、その入力

を変化させ出力を測定することで、その伝達関数を求めることができる。近年、植物等の光受容分子についての研究が進み、その光受容の分子メカニズムが分かりつつある。我々はこれら光受容ドメインとシグナル分子を組み合わせることで、シグナル分子の光スイッチを作製し、生命現象における各シグナル分子の機能の定量的解析を目指す。

## 経過

光スイッチには大きく分けて2通りある。自然界にもともとあるものと、人工的に作成したものである。前者にミドリムシの **photo-activated adenylyl cyclase (PAC)**がある。この蛋白質は日本人の渡辺教授らによって発見された。この蛋白質を用いると青色光によって、細胞内の重要なセカンドメッセンジャーである **cAMP** を作りだすことができる。**cAMP** は脳のなかの神経細胞の回路形成に重要であることは知られているが、**cAMP** の細胞内濃度変化がどのように軸索をナビゲートするのかは複雑でよくわかっていない。**PAC** を用いれば、照射光を細かく変えることにより、**cAMP** の **tuning** が可能になると考えられる。我々は、この遺伝子を嗅覚系の神経細胞に発現するトランスジェニックマウスを作製に成功した。嗅覚系は、研究がよく進んでおり、どういうセカンドメッセンジャーが軸索投射に関与しているかがわかっており、その軸索も脳表層を通るので、光刺激に適している。マウスは正常に発育し、光を当てない状態では、**PAC** を発現する神経の軸索は、正常マウスと同様に、ある糸状体に収束した。このマウスを用いて、現在、神経回路網形成、特に軸索投射における **cAMP** の役割についての研究を推進している。

人工的に光スイッチをつくる方法についても幾つかの方法がある。**Phototropin** は高等植物の向日性に必要な蛋白であり、その研究が進んでいる。**Phototropin** の光感受性ドメインのひとつに **LOV2** がある。**LOV2** は球状でその C 末は暗所では  $\alpha$  ヘリックスをつくり **LOV2** 本体にへばり付いているが、青色光で構造を失い、本体から外れる。そこで、**LOV2** の C 末に機能蛋白をうまく融合し、暗所では **LOV2** 本体によりその機能が立体障害され、光照射で **LOV2** が機能蛋白から遠ざかることでその機能が回復するように設計する。我々はこの手法を用いて、神経細胞運動を制御する蛋白の光スイッチなど、幾つかの光スイッチ蛋白を作製し、**characterize** している。培養海馬神経細胞は多くの突起から一本の軸索を選び成長させ、残りは短い樹状突起となる。このような極性形成のメカニズムは興味深い問題である。現在の有力な作業仮説は、ある突起先端での当初は小さいシグナルの偏りが、ポジティブフィードバックにより増幅され、その結果、突起が軸索になるというものである。しかし、この仮説の直接的証明はなく、また、これだけでは何故他の突起が軸索にならないか明確でない。この問題にアプローチするためには、上で述べたシグナル分子の光活性化が最もよい。我々は作製したスイッチを用いて、順次培養神経における各シグナル分子の作用を解明する予定である。

## 考察

本分野は、始まったばかりであるが、アメリカを中心に強力に推進され、*nature methods* 誌では 2010 年の *methods of the year* に選ばれ、*optogenetics* (光遺伝学) という名前もついた。我々も、特許も 1 件、出願中であるが、競争の激しい分野であるため、まだデータの内容を明らかにできる部分が少ないことを申し訳なく思う。

これまで生物学は未だ多くの場合、現象の記載が主で(*descriptive*)、各ファクターを変化させるとシステムにどのような変化がおこるかの定量的測定には至っていない。蛍光蛋白を使った研究の進展から、細胞内での機能分子の活性の分布などは分かるようになってきたが、細胞の刺激法は立ち遅れていた。時間空間的に可変なシグナル伝達の光刺激の方法の導入は、生命現象の数理的記述を推進する可能性がある。

## 研究発表

### 口頭発表

角元利行、中田隆夫 Cdc42 の光制御法の開発と培養細胞への応用 第 115 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 2010 年 3 月 28 日～30 日 盛岡

### 誌上発表

中田隆夫 シグナル分子の光制御技術と神経の形態形成 *ブレインサイエンスレビュー* 2011