

細胞内のシグナル伝達を光操作する分子プローブの創製

Molecular probes for optical control of cellular signaling processes

(日本化学会推薦)

代表研究者 東京大学 佐藤 守俊 The University of Tokyo Moritoshi SATO

Alpha subunits of heterotrimeric G proteins (G_α) are involved in a variety of cellular functions. Here we develop an optogenetic strategy to spatially and temporally manipulate G_α in living cells. More specifically, we applied the blue light-induced dimerization system, known as the Magnet system, and an alternative red light-induced dimerization system consisting of *Arabidopsis thaliana* phytochrome B (phyB) and phytochrome-interacting factor 6 (PIF6) to optically control the activation of two different classes of G_α ($G_{\alpha q}$ and $G_{\alpha s}$). By utilizing this strategy, we demonstrate successful regulation of Ca^{2+} and cAMP using light in mammalian cells. The present strategy is generally applicable to different kinds of G_α and could contribute to expanding possibilities of spatiotemporal regulation of G_α in mammalian cells.

研究目的

様々な酵素の光操作を実現するための基盤技術として、研究代表者は最近、アカパンカビ由来の青色光受容体に対して様々なプロテインエンジニアリン

グを施し、任意のタンパク質の結合解離を青色光照射で自由自在にコントロールできる光スイッチタンパク質 (“Magnet” と呼ぶ) を開発した (参考文献 1)。本研究では、この光スイッチタンパク質を用いて、

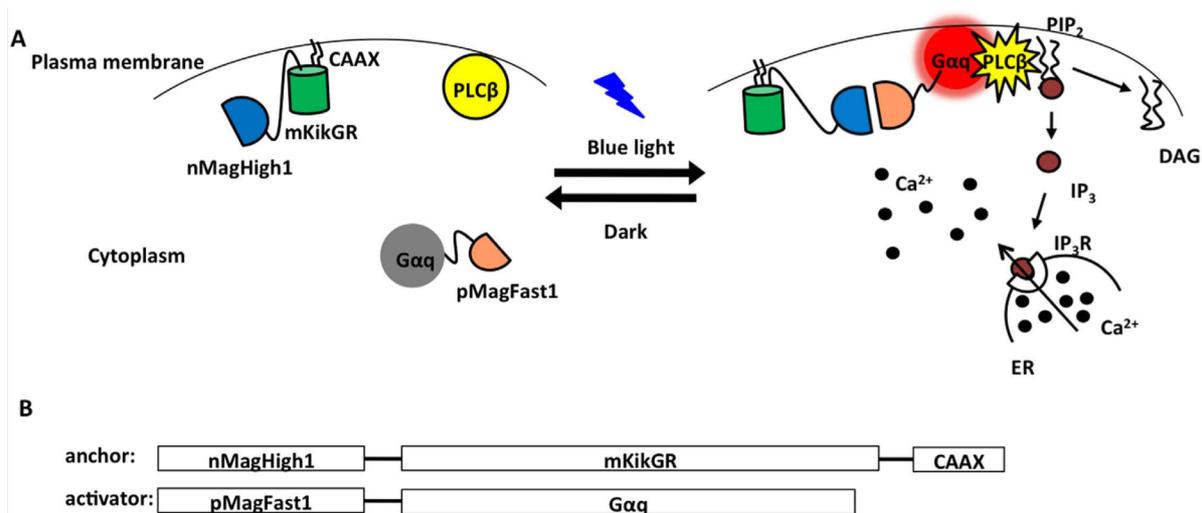


図 1 $G_{\alpha q}$ の活性を青色光で操作し細胞内のカルシウムイオンの濃度を自由自在に制御するための技術を開発. (A) $G_{\alpha q}$ の光操作技術の原理図. 青色光を照射すると光スイッチタンパク質と融合した $G_{\alpha q}$ が細胞膜に移行して PLC β を活性化. このとき生成した IP₃ が小胞体膜上の IP₃R に結合し、細胞質のカルシウムイオン濃度上昇が誘起される. (B) $G_{\alpha q}$ の光操作を実現するプローブの設計.

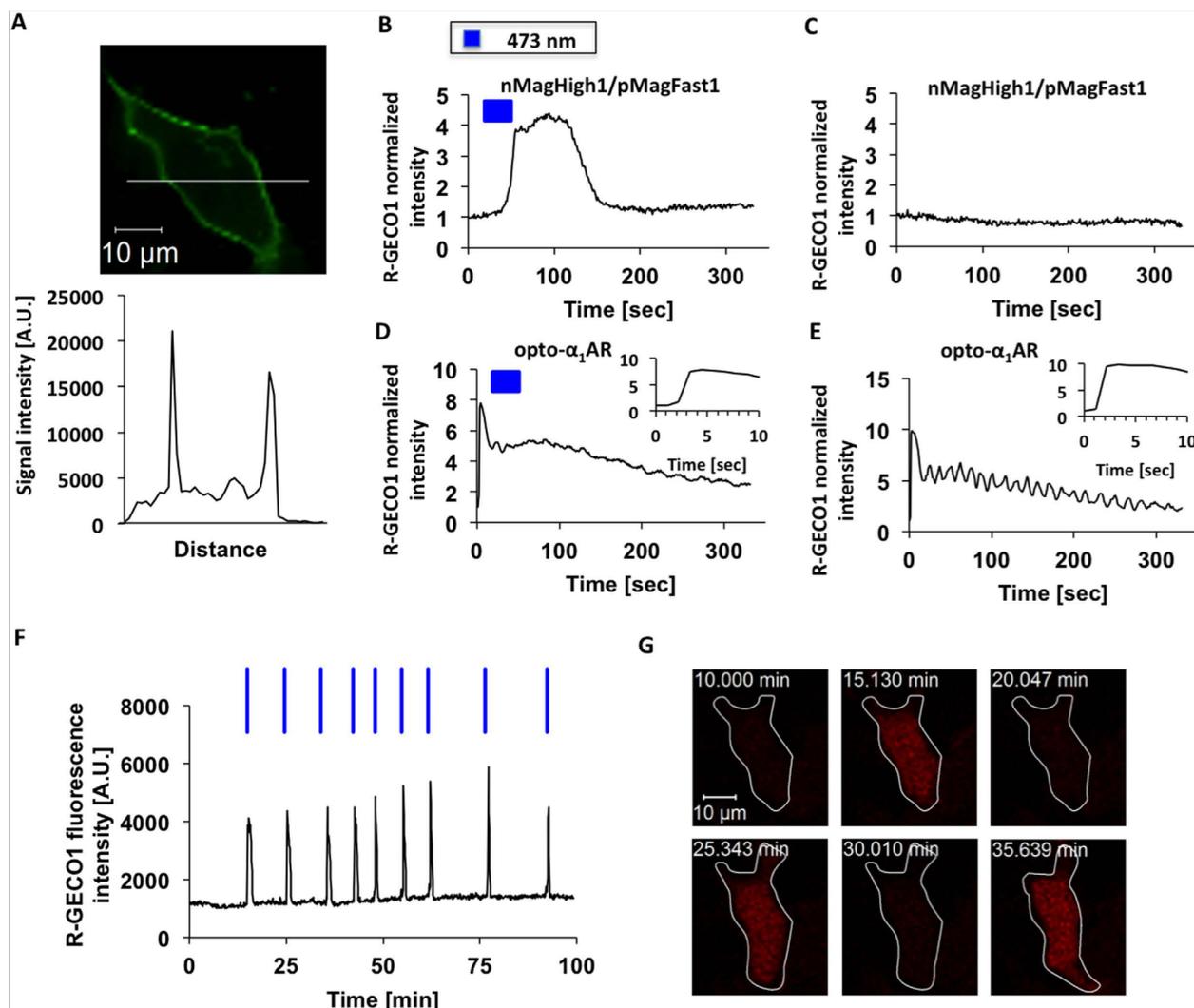


図 2 既存技術との比較と本技術の検証. (A)本技術の anchor プローブ(図 1B)の細胞膜への局在を検証. (B-E)本技術では青色光依存的に細胞質内のカルシウムイオン濃度が上昇するが(B, C), 既存技術(opto- α_1 AR)は, 青色光のみならず, 蛍光プローブ(R-GECO1)のイメージングを行うための励起光(543 nm)にも応答してしまうため, 蛍光プローブで細胞の応答をモニターしながら Gaq の光操作を行うことが困難である(D, E). (F)青色光を照射するたびに細胞質内のカルシウムイオン濃度が上昇することを R-GECO1 によるカルシウムイオンの蛍光イメージングにより検証. (G)図 2F の実験の蛍光イメージング画像. 青色光照射を与えるたびに R-GECO1 の赤色蛍光が上昇する様子を観察できる.

細胞内のカルシウムイオン (Ca^{2+}) の動態制御に関与する酵素 (三量体 G タンパク質の Gaq サブユニット) を自由自在に光照射でコントロール (光操作) することを目的として, 分子プローブ (“photoactivatable (PA) -Gaq” と呼ぶ) (図 1) の開発研究を行った (結果の発表, 誌上発表, 文献 1).

研究経過

Gaq は G タンパク質連結型受容体の活性化に伴って細胞膜で活性され, Ca^{2+} の濃度上昇を誘起する酵素である. 本研究のアイディアは, 細胞膜近傍における Gaq の動態を光でコントロールすることにより, 当該酵素の活性と細胞内 Ca^{2+} 濃度の光操作を実現するというものである (図 1). 上述のように作製した

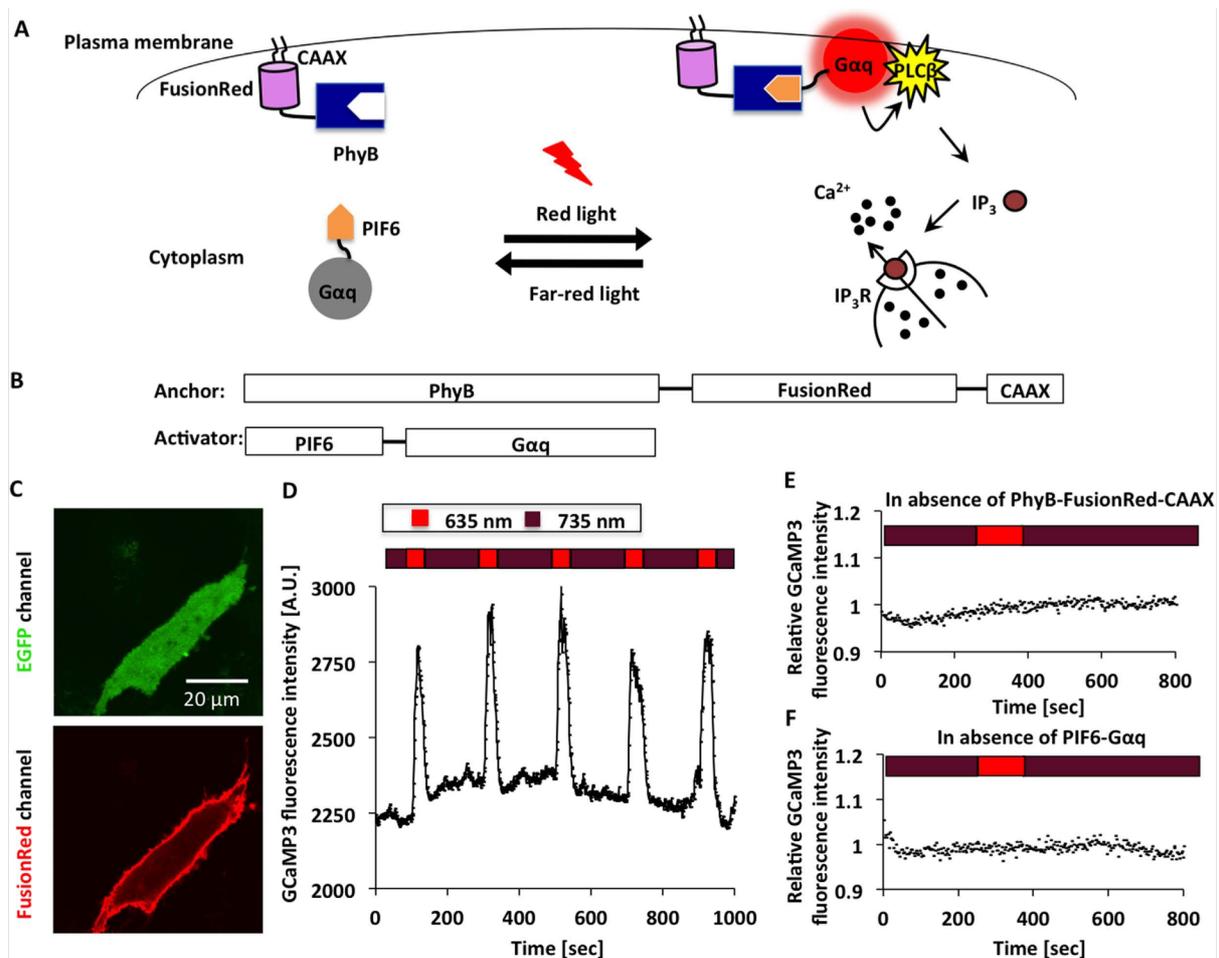


図3 Gaqの活性を赤色光で操作し細胞内のカルシウムイオンの濃度を制御するための技術。(A) 赤色光でのGaqの光操作技術の原理図。光スイッチタンパク質として、シロイヌナズナ由来のPhyB—PIF6システムを用いる。赤色光を照射すると光スイッチタンパク質と融合したGaqが細胞膜に移行してPLCβを活性化。このとき生成したIP₃が小胞体膜上のIP₃Rに結合し、細胞質のカルシウムイオン濃度上昇が誘起される。(B) 赤色光でGaqを操作できるプローブの設計。(C) 暗所における本技術のactivatorプローブ(上図、緑色蛍光)の細胞質への局在とanchorプローブ(下図、赤い蛍光)の細胞膜への局在を検証。(D) 赤色光を照射するたびに細胞質内のカルシウムイオン濃度が上昇することをG-CaMP3による蛍光イメージングにより検証。(E, F) 図3Dのコントロール実験。Anchorプローブがない場合(E)、およびactivatorプローブがない場合には(F)、赤色光を照射してもカルシウムイオンの濃度上昇は観察されない。

PA-Gaqは青色光に応答して活性化し、細胞内のCa²⁺濃度を上昇させることがわかった(図2)。しかも、PA-Gaqの反応は可逆的であり、青色光のON/OFFによって、自由自在にCa²⁺濃度を増減させることができるようになった。

上述のPA-Gaqは青色光に응答するMagnetを用いて開発されているため、青色光でGaqの酵素活性と

細胞内Ca²⁺濃度の光操作を実現できるツールである。本研究ではさらに、Magnetの部分赤色光スイッチタンパク質で置き換えることにより、赤色光でコントロールできるPA-Gaqを開発した。赤色光スイッチタンパク質として、シロイヌナズナの光受容システム(PhyB-PIFシステム)を用いた(図3)。開発したPA-Gaqは赤色光照射に응答して細胞内のCa²⁺濃

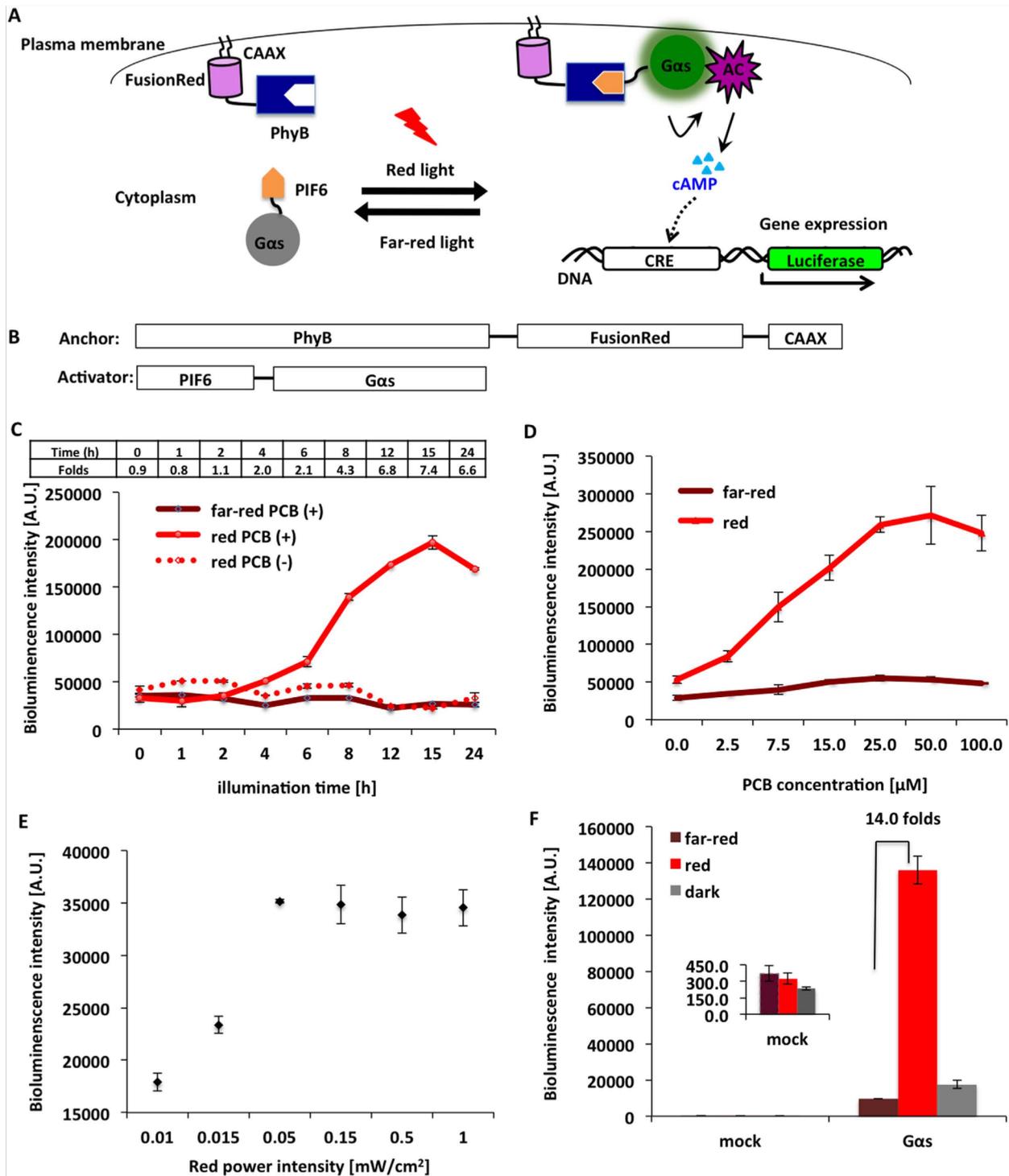


図4 Gasの活性を赤色光で操作しcAMPの濃度を制御するための技術。(A)赤色光でのGasの光操作技術の原理図。赤色光を照射すると光スイッチタンパク質と融合したGasが細胞膜に移行してACを活性化。これによりcAMPが生成する。(B)赤色光でGaqを操作できるプローブの設計。(C)赤色光の照射時間依存的にcAMPが生成されることをcAMP応答エレメント(CRE)を導入したルシフェラーゼ遺伝子の発現を指標として検証。(D)赤色光依存的なcAMPの生成には光スイッチタンパク質PhyBの補因子(PCB)が必須であることを検証。(E)赤色光強度依存的にcAMPが生成されることを検証。(F)本技術では赤色光でGasが活性化してcAMPが生成し、暗所もしくは近赤外光によりGasが不活性化しcAMPの生成が停止する。

度を上昇させることがわかった。さらに、赤色光の ON/OFF によって、可逆的に Ca^{2+} 濃度を増減できることも示した。

さらに本研究では、PA-Gaq を改変して、 Ca^{2+} とは全く異なるセカンドメッセンジャーの環状アデノシンリン酸 (cAMP) を生成する酵素 (三量体 G タンパク質の Gas サブユニット) の光操作を試みた (図 4)。具体的には、上述の赤色光に応答する PA-Gaq の Gaq ドメインを Gas で置き換えることにより PA-Gas を設計・開発した。cAMP 応答エレメント (CRE) を導入したレポーター遺伝子アッセイを利用して評価を行ったところ、PA-Gas は赤色光照射に応答して活性化し、cAMP を生成することがわかった。さらにそのレベルは CRE を介した遺伝子発現に十分であることも明らかになった。

考察

上述のように、本研究では Ca^{2+} の動態に関与する酵素 (Gaq) の光操作技術を開発すると共に、その赤

色化を実現した。さらに、cAMP の動態に関する酵素 (Gas) の光操作にも当該技術を拡張できることを示した。 Ca^{2+} と cAMP はいずれも細胞内での主要なセカンドメッセンジャーである。本研究で開発した技術は様々な生命現象を明らかにするための強力なツールを提供すると期待できる。

参考文献

1. F. Kawano, H. Suzuki, A. Furuya and M. Sato, “Engineered Pairs of Distinct Photoswitches for Optogenetic Control of Cellular Proteins” *Nat. Commun.*, 6, 6256 (2015).

研究の発表

誌上発表

1. G. Yu, H. Onodera, Y. Aono, F. Kawano, Y. Ueda, A. Furuya, H. Suzuki and M. Sato, “Optical Manipulation of the Alpha Subunits of Heterotrimeric G Proteins Using Photoswitchable Dimerization Systems” *Sci. Rep.*, 6, 35777 (2016).