

令和 1 年 6 月 7 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 104

氏 名 二本垣 裕太

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ジョンズホプキンス大学（国名： 米国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
一次繊毛におけるオールオプティカル膜電位測定・操作を実現する光遺伝学ツールの開発
3. 派遣期間：平成 29年 4月 1日 ～ 平成 31年 3月 31日
4. 受入機関名及び部局名
ジョンズホプキンス大学医学部細胞生物学科

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

■目的

本研究では、流れに応答して発生するカルシウムシグナルと一次繊毛膜電位の関連を検証するために、一次繊毛上での膜電位の可視化・操作を実現する光遺伝学技術の開発を行っている。これを実現するにあたって、膜電位の可視化・操作を行う膜貫通型光遺伝学ツールを一次繊毛に局在させる手法の確立を試みた。

■内容 一次繊毛に局在する光遺伝学イオンチャネルの開発に向けて

STIM1 は、小胞体内腔のカルシウムイオン濃度の減少を感知して、細胞膜に局在する Orai1 チャネルを介してカルシウムイオン流入を促進させる。近年、この STIM1-Orai1 を用いて、青色光依存的にカルシウムイオンの流入を活性化する光遺伝学ツールが複数報告されている。このツールを一次繊毛に局在させることができれば、光依存的に一次繊毛内でのみカルシウム濃度を上昇させ、それに応じて一次繊毛膜でのみ膜電位の脱分極化を誘導できると考えられる。そこで、Orai1 チャネルを一次繊毛特異的に局在させることが可能かを初めに検証した。Drosophila 由来の Orai1 (dOrai1) に対して、黄色蛍光タンパク質 YFP と、一次繊毛膜局在シグナル(CTS)を連結した人工遺伝子ベクターを作成した(図1)。CTS に関しては、現在確立されたアミノ酸配列が特定されていないため、一次繊毛膜に局在することが知られているタンパク質の一部を候補として複数検証した。具体的には、Polycystin-1 (PC1) の C 末端側配列、Polycystin-2(PC2)の N 末端側配列、ARL13B の C 末端側配列、NPHP3 の N 末端側配列、5ht6 の全長体・細胞質側第三ループ、Sstr3 の細胞質側第三ループを用いた。これらの人工遺伝子をマウス胎児繊維芽細胞に遺伝子導入し、血清飢餓により一次繊毛を形成させたのちに、蛍光顕微鏡により YFP 蛍光を観察した(図2)。YFP-dOrai1 は細胞膜上に局在することが確認された。一方、CTS 候補を連結することにより、その局在は様々に変化した。その中で、YFP-dOrai-ARL13B(C 末端ドメイン)、5ht6(全長体)-YFP-dOrai が、非常に効率よくほ乳類細胞の一次繊毛に局在することを発見した。この2つの一次繊毛局在型 dOrai1 については、一次繊毛マーカーであるアセチル化 α チューブリンに対する蛍光免疫染色を行い、一次繊毛特異的に局在することを確認した。これらの結果から、ARL13B あるいは 5ht6 のシグナル配列を用いることで、本来一次繊毛に局在しない膜タンパク質を強制的に一次繊毛に局在させられることがわかった。

CTS-YFP-dOrai

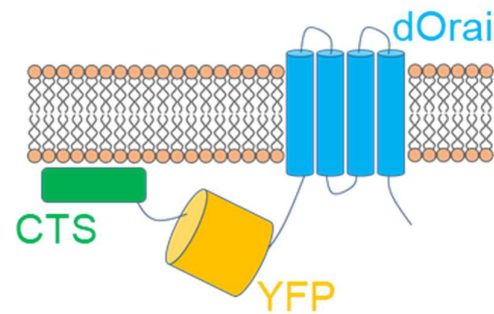


図1. 一次繊毛局在型 dOrai1 の模式図。一次繊毛膜局在シグナルの性質に応じて、N 末端側と C 末端側につけたものを検証する。

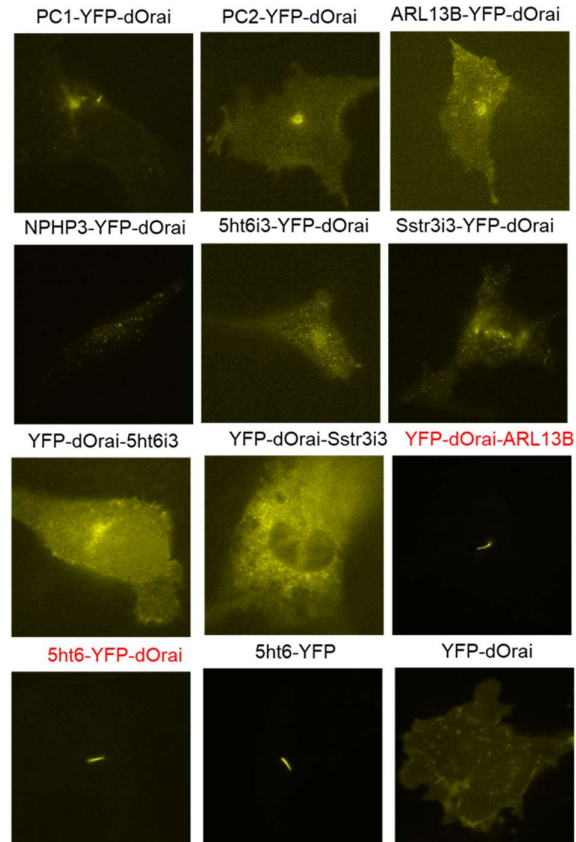


図2. 一次繊毛局在型 dOrai1 の蛍光画像

また、これと並行して、化学二量体形成誘導法を用いて、dOrai1 を一次繊毛に局在させられるかも検証した(図3)。化学二量体形成誘導法とは、FKBP タンパク質と FRB タンパク質を用いて、任意のタンパク質の局在を小化合物ラパマイシン依存的に制御する手法である。ここでは、一次繊毛に局在する 5HT6 タンパク質に蛍光タンパク質 CFP と FRB を連結し、一方 dOrai1 に蛍光タンパク質 YFP と FKBP を連結した。5HT6-CFP-FRB は一次繊毛に、FKBP-YFP-dOrai は細胞膜全体に局在する。ラパマイシンを添加すると、FKBP と FRB は二量体を形成するため、FKBP に連結している dOrai1 も一次繊毛に移動する仕組みになっている。

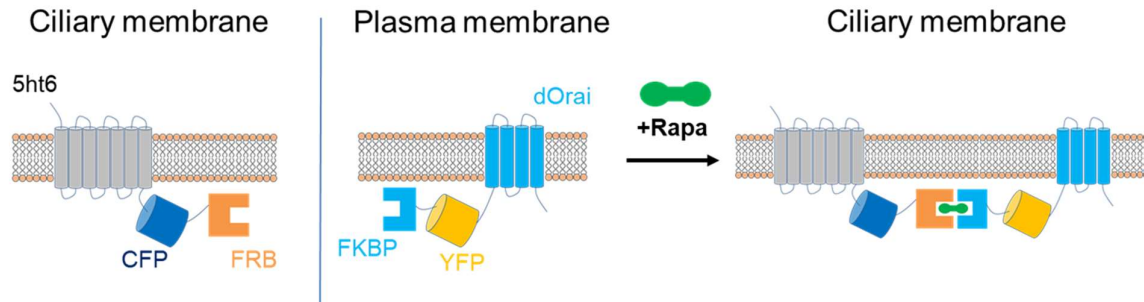


図3. 化学二量体形成誘導法による一次繊毛局在型 dOrai1 の模式図。

実際に、これらの遺伝子を細胞に遺伝子導入して CFP と YFP の蛍光観察を行った(図4)。ラパマイシン非存在下では、5ht6-CFP-FRB は一次繊毛に、FKBP-YFP-dOrai (または YFP-dOrai-FKBP)は細胞膜全体に局在することが確認された。一方、ラパマイシンを加えて 24 時間後再度観察すると、FKBP-YFP-dOrai が一次繊毛へ移行していることが観察された。同様にラパマイシンを加えてから2時間タイムラプス蛍光観察を行ったが、2 時間では YFP-dOrai の一次繊毛への移行は観察されなかったため、この手法による局在の移行にはある程度長い時間を必要とすることが分かった。以上の結果から、一次繊毛膜タンパク質 5HT6 と、FKBP-FRB を組み合わせることによって、任意の膜タンパク質を一次繊毛膜に局在させられることがわかった。

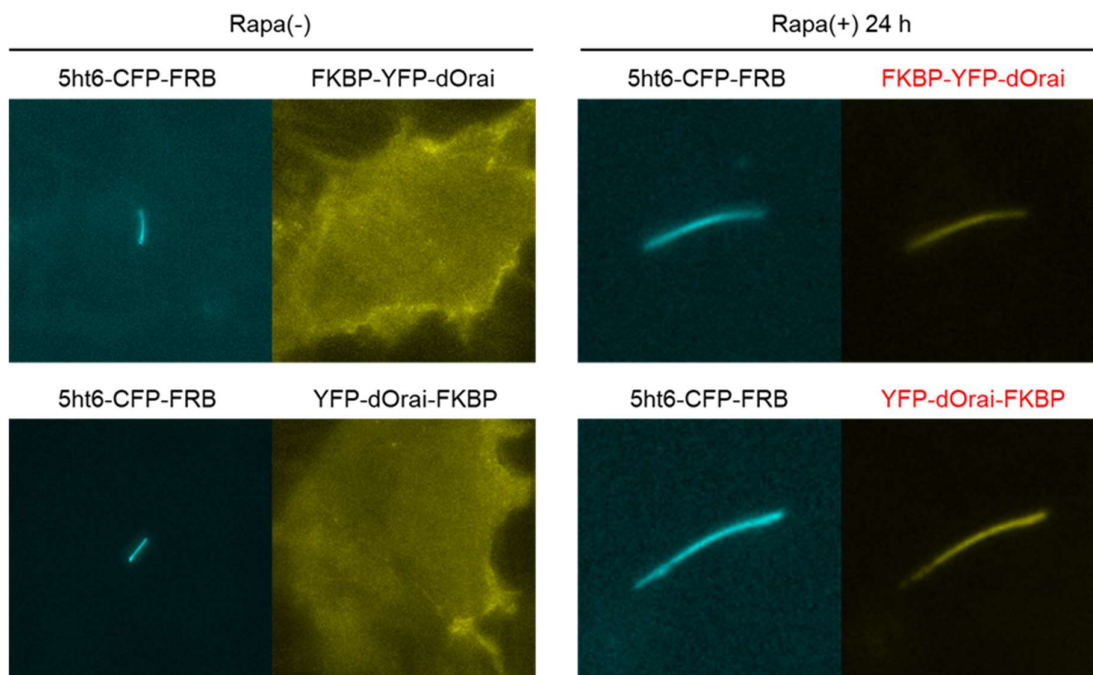


図4. ラパマイシン誘導型 dOrai 局在制御実験。

次に一次繊毛に局在する 5ht6-Y-dOrai を光で活性化できる技術の開発に取り組んだ。先行研究で、ほ乳類細胞において過剰発現させた dOrai を、光活性化タンパク質 LOV2 と同じく *Drosophila* 由来の STIM1 の活性化ドメインと組み合わせた dmBACCS2 タンパク質と共に用いることで光依存的なカルシウム流入をコントロールできると報告されている。これにならって、dmBACCS2 と 5ht6-YFP-dOrai を一次繊毛特異的赤色蛍光カルシウムセンサー 5ht6-R-GECO と共発現させ、青色光による刺激を行う前後での R-GECO 蛍光測定を行った。この実験において、青色光依存的な一次繊毛における赤色蛍光の増大は認められたが、5ht6-YFP-dOrai を発現させない対照実験においても同様の蛍光増大が観察された。また、5ht6-R-GECO のみを発現させた細胞においては、青色光による赤色蛍光の増大は観察されなかった。考えられる原因の一つとして、この実験系においては dmBACCS2 が内在性の Orai1 を活性化してしまっている等が考えられる。そこで、dmBACCS2 タンパク質が内在性の Orai1 と反応せずに、dOrai とのみ反応するような分子デザインを模索する事とした。既に、dOrai1 に光スイッチタンパク質 LOV2 と STIM1 の活性化ドメインを連結することで、光依存的に dOrai の活性をコントロールできるという報告があるので、これを一次繊毛特異的に局在させられるかを検討した(図5)。先ほど一次繊毛に局在することが分かった 5ht6-YFP-dOrai の C 末端側に LOV2 と STIM1 の活性化ドメインをタンデムに連結したコンストラクトを作成し(5ht6-YFP-dOrai-dmBACCS2)、細胞に赤色カルシウムマーカー R-GECO と共に遺伝子導入後、蛍光観察を行った。一次繊毛が存在しない増殖環境下では、5ht6-YFP-dOrai-dmBACCS2 は、小胞体、ゴルジ体、細胞膜に主に局在する(図6)。

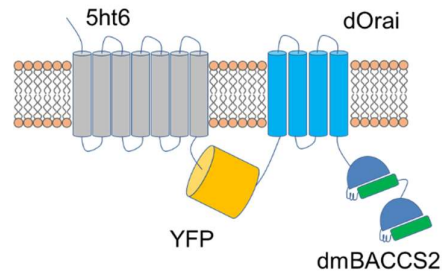


図5. 一次繊毛特異的に局在する光遺伝学カルシウムチャネルの模式図

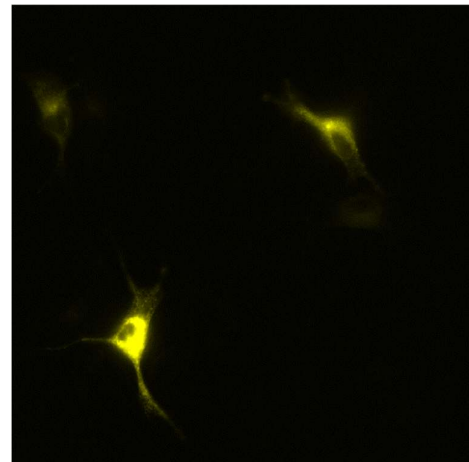


図6. 一次繊毛非存在下での 5ht6-YFP-dOrai-dmBACCS2

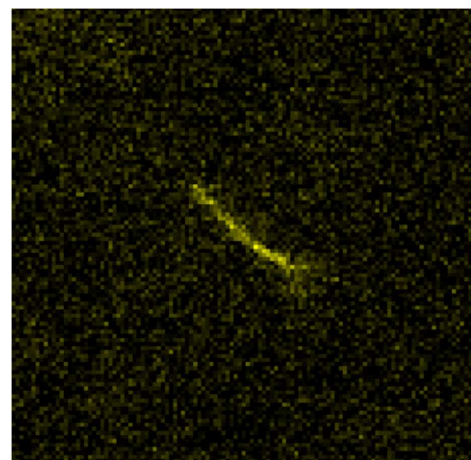


図7. 一次繊毛存在下での 5ht6-YFP-dOrai-dmBACCS2

この細胞に青色光を 5 秒間照射したところ即座に R-GECO シグナルの瞬間的な上昇が観察された。この結果より、5ht6-YFP-dOrai-dmBACCS2 は、光依存的にカルシウムイオンを流入させる能力を維持している事が確認できた。続いて、遺伝子導入後、血清飢餓処理により一次繊毛を形成させて、同様の実験を行ったところ、5ht6-YFP-dOrai-dmBACCS2 が一次繊毛へ移行するのが観察された(図7)。これに青色光照射を行うと、一次繊毛に局在させたカルシウムマーカー 5ht6-R-GECO の蛍光強度の一時的な上昇が観察された。この結果は 5ht6-YFP-dOrai-dmBACCS2 を使って一次繊毛のカルシウム濃度の光制御が実現できることを示唆している。

次に、この 5ht6-YFP-dOrai-dmBACCS2 による一次繊毛内カルシウム濃度の上昇が、細胞質からのカルシウム流入でなく、一次繊毛特異的なカルシウム濃度の上昇であることを確認するために、一次繊毛特異的に青色光刺激を行いつつ、5ht6-R-GECO による一次繊毛内カルシウムイメージングを行った。しかし、青色光刺激を一次繊毛のみに与えた前後で、5ht6-R-GECO の蛍光強度に変化は見られなかった。細胞全体への光照射では蛍光強度の上昇が観察されたことと合わせると、5ht6-YFP-dOrai-BACCS2 は一次繊毛膜上に局在はするが、カルシウムを流入させる機能を喪失していると考えられる。また、一次繊毛非形成時には細胞膜に局在し、光依存的にカルシウムを流入させる機能を持っていることから、何らかの一次繊毛膜特異的な環境が dOrai-BACCS2 を不活性化していると考えられる。

そこで、STIM1-Orai1 とは異なる光依存的にカルシウムの流入を制御できるシステムを一次繊毛特異的に局在させることで、一次繊毛特異的なカルシウム濃度と膜電位の光制御を試みた。具体的には、青色光依存的に活性化する陽イオンチャネルである藻類由来のチャネルロドプシン 2(ChR2)を、一次繊毛特異的に局在させ、青色光照射により一次繊毛膜の電位を上昇させられるかを検証した。まず上述の dOrai と同様に、ChR2

を一次繊毛特異的に局在させられるかを検証した。ChR2 は C 末端が細胞質側に露出しているため、ChR2-YFP-ARL13B(C 末端ドメイン)を発現するプラスミドを作製した。ChR2-YFP-ARL13B を NIH3T3 細胞に発現させ、血清飢餓後に蛍光顕微鏡により観察した所、YFP 蛍光が一次繊毛に局在していることが確認できた。この結果から、ARL13B の C 末端シグナル配列を用いることで、dOrai1 だけでなく ChR2 も強制的に一次繊毛に局在させられることがわかった。

今後は、この ChR2-YFP-ARL13B を用いて一次繊毛特異的な膜電位の制御やカルシウム濃度の制御が実現できるかを検証する実験を行った後に、分子デザインの最適化等を行う。加えて、それを応用しカルシウム濃度や膜電位が一次繊毛のシグナル伝達にどのような影響を与えるかを調査する予定である。

■成果発表

一次繊毛内シグナル伝達に関する総説論文を 2 報発表した。