

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「光の特性を活用した生命機能の時空間
制御技術の開発と応用」
研究課題「マイクロからマクロまでシームレスに細胞と
会話する光技術」

研究終了報告書

研究期間 2016年10月～2022年3月

研究代表者：松田道行
(京都大学 大学院生命科学研究科、
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究チームは、細胞から個体に至る解像度で、細胞機能を可視化して新規の現象を発見し仮説を立て、光遺伝学ツールで摂動を加えることでその仮説を証明するという戦略で研究を進めてきた。研究は、この戦略を支える技術開発と、その技術を使った生命機能のメカニズムの解明の二つの柱からなる。特に、光遺伝学ツールの利用がほとんど神経科学に限定されている状況を踏まえ、神経以外の組織でその有用性を示すことを大きな使命とした。

【テクノロジー】 観察に用いるバイオセンサーおよび光遺伝学ツールの大半が青～緑の短波長領域を使っているということを最初に克服すべき課題として挙げた。そこで、バイオセンサーおよび光遺伝学ツール双方の長波長化を進めた。

1. **PCB 産生系の確立：** 長波長作動性光遺伝学ツールの色素であるフィコシアノビルリン (PCB) の動物での産生系を分担研究者の青木らが中心となって確立した。様々な検討を加え、シアノバクテリア由来の 4 つの酵素を発現することで、PCB の産生が可能となり、遠赤色光での光遺伝学ツール PhyB-PIF システムを利用可能とした。
2. **赤色系 FRET バイオセンサーの開発：** フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理に基づく蛍光バイオセンサーを赤色光領域で使えるようにするために、多数の蛍光タンパク質をスクリーニングし、さらにリンカー領域の最適化を行うなどして、赤色蛍光タンパク質に基づく FRET バイオセンサー Booster を開発した。
3. **ハイブリッド型バイオセンサーの開発：** FRET バイオセンサーを光遺伝学ツールと併用できるよう、発光と蛍光のハイブリッド型のバイオセンサーを開発した。
4. **マウス埋植用 CMOS センサーの開発：** 発光および蛍光バイオセンサーを生きたマウスでリアルタイムに観察できるように、分担研究者の笹川は、マウスに埋植できる CMOS センサーを開発した。

【バイオロジー】 開発した技術を使ってチャレンジする主課題は、「細胞間コミュニケーション」の生物学的意義の解明である。パラクラインシグナルを介した細胞間コミュニケーションについては培養細胞において非常に詳細に研究されているが、組織レベルや個体レベルでの知見は限定的である。以下の生命現象の解明を行った。

1. **細胞集団輸送における ERK MAP キナーゼの活性波の意義の解明：** 上皮細胞集団運動における ERK MAP キナーゼ活性波の意義の解明を行った。細胞が動くことによる機械的刺激が細胞増殖因子受容体活性化を引き起こし、これが ERK MAP キナーゼ活性波として伝わる。光遺伝学ツールを使って、この波を人為的に作成すると細胞運動を誘導できることも分かった。さらに、フリースペースに向かって伸長する仮足が肝細胞増殖因子に対する感受性をもたらし、先導細胞と後続細胞の違いをもたらすことを見出した。これらの観測および摂動実験の結果をもとに、細胞運動に関わるメカノケミカルカップリングモデルを提唱した。
2. **ERK マップキナーゼの個体発生過程における役割の解明：** 分担研究者の藤森らは研究代表者の開発したバイオセンサーを発現するマウスを作成し、マウス胚において細胞増殖因子情報伝達系のパルス状の活性化が分化を制御している可能性を示唆する結果を得た。また、マウス内耳形成過程においても ERK MAP キナーゼ活性波の伝搬が蝸牛様構造の形成誘導に重要であることを明らかにした。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 細胞増殖シグナル波による細胞集団運動の制御機構

上皮細胞において細胞増殖シグナル活性波が細胞運動と逆方向に伝搬する。そのメカニズムを光遺伝学ツールにて解析し、個々の細胞は引張力を受けると伸展→細胞増殖シグナル活性化→収縮という応答を示すことを示した。力学-生化学相互作用が細胞集団の協調的な運動を支配するものであることを示し、高い評価を得た。

2. がん細胞が免疫から逃れるメカニズムの解明

がん細胞は、自身を取り巻く腫瘍微小環境を改変し、免疫から逃避する。二光子顕微鏡を用いてマウス生体内のがん細胞と周囲の細胞を観察し、そのメカニズムの一端を明らかにし、高い評価を得た。まず、免疫の働きを抑制するプロスタグランジン E2 (PGE2)ががん細胞から放出されるのは、血管内皮細胞から分泌されるトロンボキサン A2 によることを示した。さらに、肺転移したがん細胞がNK細胞からの殺傷を逃れるのは、血液凝固因子により細胞表面のNK細胞活性化リガンドが切断されるためであることを示した。

3. 網膜が持つ未知の光応答を新しい顕微鏡観察法で発見

網膜が光に反応して環状AMP依存性キナーゼ(PKA)を活性化する現象を発見した。FRETバイオセンサーを発現するマウスの網膜で起こるPKA活性変化を詳細に顕微鏡観察した結果、網膜を構成する140種類以上とも言われる神経細胞群の中でたった1種類、桿体視細胞だけが、光オフのタイミングでPKAを活性化することを明らかにした。さらに、この現象にロドプシンの関与を強く示唆するデータも得た。桿体視細胞は暗所視を司る光受容細胞なので、当現象は暗所視力を支える仕組みの発見として高く評価された。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 蛍光共鳴エネルギー移動に基づく二光子励起光遺伝学操作法の開発

光スイッチタンパク質の多くはフラビンを発色団として内包している。3次元空間で狙った細胞だけを活性化するには多光子励起法を用いるが、フラビンの多光子励起効率は低いことが問題だった。そこで、二光子励起で効率よく活性化できる蛍光タンパク質からの蛍光共鳴エネルギー移動を利用し、フラビンを蛍光団として有している光スイッチタンパク質を活性化するFRET assisted photoactivation法を開発した。多光子顕微鏡を用いた光遺伝学ツールの利用を促進する技術として高い評価を得た。

2. 動物におけるフィコシアノビルン合成系の確立

赤色光-近赤外光に反応する光スイッチタンパク質 Phytochrome B (PhyB)は光遺伝学ツールとして高いポテンシャルを秘めているが、動物細胞には存在しない発色団であるフィコシアノビルン(PCB)を外部から添加する必要があり、技術的障壁となっていた。本研究では、PCBを動物細胞に合成する4遺伝子カセットを開発し、光合成をおこなわない動物においてPCBを発色団とする光スイッチタンパク質の利用を可能とした。光スイッチタンパク質の応用を広げるものとして高い評価を得た。

3. 蛍光と発光のハイブリット型バイオセンサーの開発

フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)バイオセンサーを簡単に生物発光バイオセンサーに改変する技術を開発した。これにより、青色光を照射すれば蛍光共鳴エネルギー移動型バイオセンサーとして、ルシフェラーゼの基質を添加すれば生物発光共鳴エネルギー移動型バイオセンサーとして使うことができ、数多くあるFRETバイオセンサーを簡便に発光バイオセンサーに改変できるものとして高い評価を得た。

<代表的な論文>

1. Kinjo, T., K. Terai, S. Horita, N. Nomura, K. Sumiyama, K. Togashi, S. Iwata, and M. Matsuda. 2019. FRET-assisted photoactivation of flavoproteins for in vivo two-photon optogenetics. **Nat Methods**. 16:1029-1036.

植物が光を感じ取るための光応答性分子であるCRY2を使った細胞内情報伝達系の光制御は広く行われている。しかし、CRY2は二光子励起効率がきわめて悪い。そこで、蛍光タンパク質からの蛍光共鳴エネルギー移動を利用して、CRY2を二光子励起で活性化する2paCRY2を開発した。この技術を用い、3次元空間の狙った単一細胞のみで、細胞の増殖や分化に重要な分子であるERKの活性をコントロールすることに成功した。

2. Konishi, Y., H. Ichise, T. Watabe, C. Oki, S. Tsukiji, Y. Hamazaki, Y. Murakawa, A. Takaori-Kondo, K. Terai, and M. Matsuda. 2021. Intravital imaging identifies the VEGF-TXA2 axis as a critical promoter of PGE2 secretion from tumor cells and immune evasion. **Cancer Res**. 81:4124-4132.

がん細胞は、自身を取り巻く腫瘍微小環境を改変し、免疫から逃避する。二光子顕微鏡を用いてマウス生体内のがん細胞と周囲の細胞を観察し、そのメカニズムを解析した。皮下に担がした組織を観察し、免疫の働きを抑制するプロスタグランジンE2 (PGE2)ががん細胞から放出されるのは、血管内皮細胞から分泌されるトロンボキサンA2によることを示した。この系を遮断すると獲得免疫が作動し、腫瘍が排除されることを見出した。

3. Ichise, H., S. Tsukamoto, T. Hirashima, Y. Konishi, C. Oki, S. Tsukiji, S. Iwano, A. Miyawaki, K. Sumiyama, K. Terai, and M. Matsuda. 2022. Functional visualization of NK Cell-mediated killing of metastatic single tumor cells. **eLife** 11, e76269.

がんの主要な死因は転移によって起きる。最も転移が起きる肺において、がん細胞がNK細胞によって排除される過程を二光子顕微鏡を用いて解析した。その結果、NK細胞とがん細胞との衝突イベントは2時間に1回程度であること、このイベントにおいてNK細胞が腫瘍を排除できる確率は時間とともに低下すること、それはがん細胞のNK細胞活性化分子が消失するためであることを明らかにした。

4. Yamamoto, K., H. Miura, M. Ishida, Y. Mii, N. Kinoshita, S. Takada, N. Ueno, S. Sawai, Y. Kondo, and K. Aoki. 2022. Optogenetic relaxation of actomyosin contractility uncovers mechanistic roles of cortical tension during cytokinesis. **Nat Commun**. 12:1-13.

青色光によってアクチオシンの収縮力を弛緩させる光遺伝学ツールOptoMYPTを開発した。OptoMYPTにより1細胞レベルでミオシン調節軽鎖の脱リン酸化と牽引力が減少すること、アフリカツメガエル受精卵における上皮細胞の辺にかかる張力が弱くなることを示した。またOptoMYPTを用いて細胞質分裂における細胞表層張力と収縮環の張力のバランスを定量的に見積もることに成功した。

5. Hino, N., Matsuda, K., Jikko, Y., Maryu, G., Sakai, K., Imamura, R., Tsukiji, S., Aoki, K., Terai, K., Hirashima, T., X. Trepast, M. Matsuda. 2022. A feedback loop between lamellipodial extension and HGF-ERK signaling specifies leader cells during collective cell migration. **Dev Cell**. 57:1-15. 細胞集団運動時に先導細胞と後続細胞との区別がどのようにして現れるかを解析した。肝細胞増殖因子(HGF)に対する感受性が先導細胞にのみあること、これは、フリースペースに向かって仮足が伸びることにより獲得する性質であることなどを光遺伝学ツール等を使って明らかにした。

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 研究代表者グループ

研究代表者: 松田 道行 (京都大学大学院生命科学研究科 教授)

研究項目

1. CRY2 系光スイッチの改良
2. CRY2 系および PhyB 系光スイッチを導入した hyBRET マウスの開発
3. SPREAD を引き起こす細胞間情報伝達系の解明
4. がん細胞排除過程におけるがん細胞と宿主細胞コミュニケーションの可視化
5. 筋細胞再生過程における細胞増殖・分化シグナルネットワークの解明

② 光スイッチ開発グループ

主たる共同研究者: 青木 一洋 (自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 教授)

研究項目

1. フィコシアノビルン(PCB)の動物細胞内での高効率全合成系の開発
2. 誘導性二量体化システム PhyB-PIF 系の改良
3. 動物細胞内 PCB 全合成系を用いた光誘導性二量体化システム PhyB-PIF 系による細胞内シグナル伝達系の制御、遺伝子発現、細胞系譜トレース技術の開発
4. 2光子顕微鏡を用いたマウス個体による PhyB-PIF 系の3次元的な光制御技術の開発
5. 多色光による多重光操作技術の開発

③ イメージングセンサ開発グループ

主たる共同研究者: 笹川 清隆 (奈良先端科学技術大学 准教授)

研究項目

1. FRET/BRET 観察用フィルタの開発
2. 光スイッチ制御光源開発
3. 埋植用デバイス作製とその無線化

④ 初期発生イメージンググループ

主たる共同研究者: 藤森 俊彦 (自然科学研究機構 基礎生物学研究所 教授)

研究項目

1. ES 細胞の”ERK 活性の揺らぎ”は何をコントロールするのか
2. 着床前のマウス胚での ERK 活性の変動とその意義
3. Nanog に代表される発生関連分子の光制御による分子活性の解析

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

代表者のグループでは、蛍光イメージング技術をコアとして多くの共同研究を遂行してきた。FRET バイオセンサーを用いた共同研究としては、服部雅一、柳田素子(京都大学)、宮脇敦史(理研)、築地真也(名古屋工業大学)、笠井謙次(愛知医科大)、Masanori Nakayama (Max Planck Institute)、Satu Kuure (University of Helsinki)、Evgeni Ponimaskin (Hannover Medical School)、Edouard Hannezo (Institute of Science and Technology Austria)、Xavier Trepast (Institute for Bioengineering of Catalonia)、Tobias Meyer (Stanford University)らと論文発表を行った。Tobias Meyer 研究室からは2名の大学院生が共同研究のため京都に滞在したほか、当研究室で博士課程を修了した学生がポスドクとして Stanford 大で雇用されるなど密接な共同研究体制を構築するに至っている。また、もう1名の大学院生も共同研究のち、IST

Austria でポスドクとして研究を継続している。京都大学の蛍光生体イメージング室を担当しているということもあり、企業との共同研究(2社)および、企業の研究に関わるイメージングのサポートも頻繁に行っている。

青木グループは、プリンストン大学の Jared Toettcher 博士と共同研究を進めており、自然科学研究機構国際連携研究センターとの連携で博士研究員 1 名を雇用し、co-PI として共同研究を推進している。そのほかにも、デンマーク Aarhus 大学の竹内倫徳博士、Stanford 大の Jan Skotheim 博士、プリンストン大学の Barbara Engelhardt 博士と国際共同研究を進めている。また、OptoMYPT に関する論文を発表した後、多くのプラズミドリクエストが来ており、そのなかのいくつかは国際共同研究で進めることになっている。国内の研究者との共同研究においても、この CREST の研究期間内に数が増え、それらのうちのいくつかは論文化に至っている。以下に列挙する。東京大学(澤井哲、伊藤創祐、神谷真子)、大阪大学(岡田雅人)、広島大学(本田直樹)、名古屋工業大学(築地真也)、名古屋市立大学(木村幸太郎)、帝京大学(月田早智子)、愛知がんセンター(小根山千歳)。産学連携については、現在、オリンパス社と共同で細胞のトラッキングに関するソフトウェアを開発し、論文として発表した。残念ながら、社内の検討の結果、商品化には至らなかったため、出版後にソフトウェアを無償で提供しており、すでに多くのユーザーから問い合わせが来ている。