

京都大学	博士 (医学)	氏 名	宇田 耀一
論文題目	Efficient synthesis of phycocyanobilin in mammalian cells for optogenetic control of cell signaling (哺乳動物細胞内におけるフィコシアノビルリン産生系の構築とそれを用いた細胞内シグナル伝達系の光操作)		
(論文内容の要旨)			
<p>細胞は細胞外の入力シグナルを細胞膜の受容体で感知し、細胞内のシグナル伝達タンパク質により情報の受け渡しを行い、最終的に表現型を出力する。細胞内シグナル伝達の実態はタンパク質や生理活性物質の物理化学的な拡散や反応の連鎖であり、さらにフィードバック反応やシグナル伝達経路間のクロストークといった制御システムが複雑に絡み合っており構成されている。こういった複雑な細胞内シグナル伝達系を正確に理解するには、細胞内シグナル伝達系に急速かつ可逆的な摂動を与え、その応答を観察する必要がある。そのため、近年、光によって細胞内シグナル伝達系に摂動を与える光遺伝学技術が開発されている。その一つとして、光によってタンパク質間相互作用を誘導する光誘導性二量体化 (Light-induced dimerization, LID) システムが注目されている。既存の LID システムは、CRY2-CIBN システムや LOV2 システムなど、紫外光、または青色光などの短波長の光を用いるものが主流である。これらの系は細胞に対する光毒性があること、組織・個体の深部への到達性が低いこと、また緑色蛍光タンパク質(GFP)などの蛍光イメージングとの併用ができないなどの欠点がある。一方、赤色光/近赤外光を利用する LID システムとして高等植物由来の Phytochrome B (PhyB) とその結合因子 PIF を用いた PhyB-PIF システムが報告されている。しかし、PhyB-PIF システムは、PhyB の発色団として光合成生物に存在する Phycocyanobilin (PCB) を添加する必要があり、PhyB-PIF システムの利便性を大きく損なっていた。</p> <p>そこで本研究では、発色団添加が不要な、すべての因子を遺伝子にコードされた形で PhyB-PIF システムを利用できる実験系を開発することを目的とした。PhyB の発色団である PCB は、Heme を基質として合成される。そこで PCB 合成に必要なシアノバクテリア由来の 4 種のタンパク質 (PcyA, HO1, Fd, Fnr) の遺伝子を手に入れ、これらを哺乳動物細胞内のミトコンドリア内に異所的に発現させたところ、哺乳動物細胞内においても PCB が合成されることを見出した。さらに、PCB をより効率よく産生させるために、Biliverdin 還元酵素 A (BVRA) に着目した。この酵素は本来 Biliverdin を Bilirubin へと還元する酵素であるが、PCB も同様に Phycocyanorubin へと還元してしまう。そこで、BVRA 遺伝子を欠失させた HeLa 細胞を樹立し PCB 産生を確認したところ、PCB 合成量が顕著に増加した。最後に、遺伝子にコードされた PCB 合成系と PhyB-PIF システムを用いて、実際に細胞増殖に関与するシグナル伝達分子である ERK の活性の光操作を試みた。ERK シグナル伝達経路の上流タンパク質である CRaf は形質膜直下に移行すると活性化し、下流の ERK を活性化することが知られている。そこで、PhyB に細胞膜局在化シグナルをつけ、CRaf を PIF に融合することで、光依存的に CRaf の細胞膜移行を誘導できる系を開発した。ERK の活性は蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理に基づくバイオセンサーを用いて可視化した。この実験系により、ERK の活性化を観察しながら、同時に赤色光/近赤外光によって ERK 活性の On/Off を任意のタイミングで制御することに成功した。</p>			

<p>以上、哺乳動物細胞内において光合成関連色素 PCB を生合成させ、BVRA 遺伝子のノックアウトによって PCB をより効率的に産生させることに成功した。さらに、これらの哺乳動物細胞内 PCB 産生系を用いて、外部からの発色団添加を必要としない赤色光/近赤外光を用いた細胞内シグナル伝達系の光操作系の構築に成功した。</p>	
(論文審査の結果の要旨)	
<p>これまで、赤色光応答性遺伝学的手法である PhyB-PIF システムを哺乳動物細胞で使用するためには PhyB の発色団である PCB (Phycocyanobilin) を添加する必要があった。そこで申請者は PCB を哺乳動物細胞内で産生させ、PhyB-PIF システムを哺乳動物細胞で作動させることを目的に研究を行った。まず、藍藻由来の 4 タンパク質 (PcyA, HO1, Fd, Fnr) をミトコンドリア特異的に発現させることによって哺乳動物細胞内における PCB 合成に成功した。さらに、PCB を分解する BVRA 遺伝子をノックアウトすることにより、細胞内 PCB 量が顕著に増加することを見出した。また、PhyB およびその結合因子である PIF の最適化を行い、PhyB (1-908 アミノ酸) と PIF3 の組み合わせが、照射前での結合の低さ、光応答時間の点から最適であると結論付けた。これらの成果をもとに、哺乳動物細胞における、すべての要素が遺伝子でコードされる赤色光応答性遺伝学的手法の確立に成功した。この方法の有用性を実証するために、ERK マップキナーゼの赤色光応答性活性化系を作成した。ERK 活性は FRET バイオセンサーを使うことにより検出できるが、この系は青色光を使うために既存の青色光を用いる光遺伝学的手法とは併用できない。赤色光応答性活性化系の開発により、ERK 活性の誘導と観察を同時に行うことが可能となった。以上の研究は光遺伝学的手法のさらなる応用に貢献し、シグナル伝達系の全貌解明に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 30 年 1 2 月 2 6 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>	
要旨公開可能日:	年 月 日以降