

解説

Förster 共鳴エネルギー移動の原理に基づく
二光子励起光遺伝学操作法の開発

金城 智章 寺井 健太

Key words: 光遺伝学, 二光子励起, Förster 共鳴エネルギー移動 (FRET)

近年, 生体イメージング技術の進歩によって, 細胞内シグナル伝達を生体内で, 高い時空間解像度で観察することが可能になってきた。しかし, 観察しているシグナルと, 結果として起こる表現型との間の因果関係を証明することは困難であり, 摂動を加えて背景に存在する分子的なメカニズムを検証することが求められてきた。光誘導性タンパク質を用いて細胞内シグナル伝達系を光で操作可能な非チャネルロドプシン型の光遺伝学は, そうしたニーズに答える技術として近年急速な発展を遂げている。しかし, これらの系は培養細胞系ではよく使用されているものの, 生体内での使用例は非常に少ないのが現状である。本稿では, 生体観察に有用な二光子励起顕微鏡のための光遺伝学ツールの開発について紹介する。

I 光によるタンパク質相互作用の制御

高等植物や光合成細菌などの光受容性タンパク質のなかには, 光吸収に伴って構造やタンパク質間相互作用が変化するものがあり, そうした原理を用いてタンパク質の局在や相互作用を操作する光遺伝学ツールが近年注目を集めている。代表例として, 紫外光に応答する ultraviolet-B resistance 8 (UVR8), 青色光に応答する light-oxygen-voltage-sensing (LOV) ドメインや cryptochrome 2 (CRY2), 赤色光に応答する phytochrome B

(PhyB) などが挙げられる。なかでも, *Arabidopsis thaliana* 由来の CRY2 は flavin adenine dinucleotide (FAD) という細胞内に多量に存在する分子を補因子として利用するため, 外部から薬剤を加える必要がなく, 光応答性もよいため, 広く用いられている¹⁾。CRY2 はその結合パートナーの cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix (CIB) と青色光誘導性に結合し, 暗状態で解離する²⁾。この性質を利用することで目的のタンパク質の局在や相互作用の光操作が可能になり, シグナル伝達, 脂質代謝, 転写など様々なシグナルの光制御に応用されている³⁾。

II 二光子励起顕微鏡

筆者らの研究室では, FRET バイオセンサーを用いた生体イメージングに取り組んでいるため, これらの光遺伝学ツールを生体観察に有用な二光子励起顕微鏡下で使用するを試みている。二光子励起とは, 1つの蛍光分子が同時に2つの光子を吸収し, 励起状態へ遷移する非線形光学過程である。二光子励起は一光子励起の約2倍の波長を用いるため, 可視光分子の励起には生体透過性のよい近赤外光が用いられ, 組織深部まで観察可能である⁴⁾。また, 二光子励起は励起光強度の2乗に比例することから, 励起光が強く集光される焦点面に限局して分子が励起されるため,

Development of optogenetic tools for two-photon excitation based on Förster resonance energy transfer

Kinjo Tomoaki: 京都大学大学院医学研究科病態生物医学教室

Terai Kenta: 京都大学大学院生命科学研究科生命科学研究科生体制御学教室 (〒606-8315 京都府京都市左京区吉田近衛町)

0370-9531/08/¥500/ 論文/JCOPY

三次元空間上でも単一細胞レベルでのシグナル活性化や、特定の細胞内区画における標的分子の励起が可能になる。

筆者らが実際に二光子励起による CRY2 の活性化を試みたところ、CRY2 の二光子励起効率は非常に低く、活性化するためには光毒性をきたすような非常に強いレーザー光を当てる必要があり、生体内での使用に耐えないことが判明した。原因を検証したところ、CRY2 の発色団である FAD の二光子吸収が非常に低いことが考えられた。これについては、詳しくは筆者らの論文⁵⁾を参照していただきたい。

Ⅲ FRET-assisted photoactivation (FRAPA) 法を用いた二光子励起光遺伝学操作法

筆者らは、CRY2 の二光子励起効率を向上させる手段を考えた結果、二光子吸収効率が高い蛍光タンパク質からの Förster resonance energy transfer (FRET) により CRY2 を活性化することはできないかという仮説を立て、検証を行った(図 1)。蛍光タンパク質からの FRET により CRY2 を活性化するため、下記の基準をもとにドナーの選定を行った。

① 二光子吸収断面積が FAD と比較して十分大きい

② Förster 距離が十分に長い

③ FRET バイオセンサーと同時に使用可能

① の二光子吸収断面積は二光子吸収の大きさを示す値である。ドナーからのエネルギー移動により CRY2 を活性化させるためには、発色団である FAD と比較して二光子吸収が十分大きい必要がある。

② の Förster 距離とは、50% の FRET が起こ

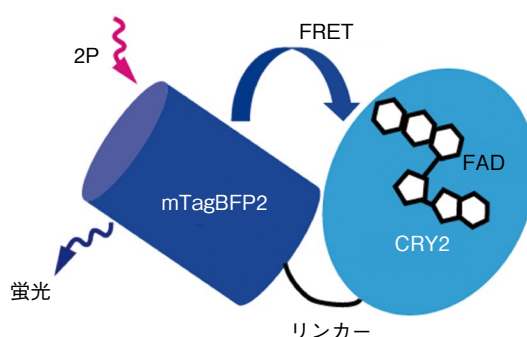


図 1 FRET による CRY2 の活性化モデル

る距離であり、FRET の起こりやすさを示す指標になる。Förster 距離である R_0 は下記の式に従うことが知られている。

$$R_0 = 9.78 \times 10^3 (Q_D J n^{-4} \kappa^2)^{1/6}$$

Q_D はドナーの量子収率、 J はドナーの発光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルの重なり、 n は屈折率、 κ はドナーとアクセプターの相互分子配向である。 Q_D および J は、ドナーとアクセプター(ここでは FAD)の性質に由来するため、 n と κ を一定の値に仮定することにより、各々のドナーについて R_0 の値を概算することができる。

③ 筆者らの研究室では、シアン/黄色蛍光タンパク質を含む FRET バイオセンサーを発現するマウスを用いて分子活性の観察を行っており、これらのバイオセンサーと併用可能な励起波長を持つ分子が望ましいと考えられた。

これらの基準を考慮し、最終的に青色蛍光タンパク質 mTagBFP2 をドナーとして選定した。候補となる青色蛍光タンパク質の性質を表にまとめた。

次に、ドナー蛍光タンパク質 mTagBFP2 から

表 ドナー候補となる青色蛍光タンパク質の性質

Protein	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{2P} (nm)	σ_2 (GM)	QY	R_0 (nm)
SIRIUS	355	424	15,000	NA	NA	0.24	3.18
EBFP2	383	448	32,000	750	13	0.56	3.88
TagBFP	402	457	52,000	807	12	0.63	4.01
mTagBFP2	399	454	50,600	NA	NA	0.64	4.02

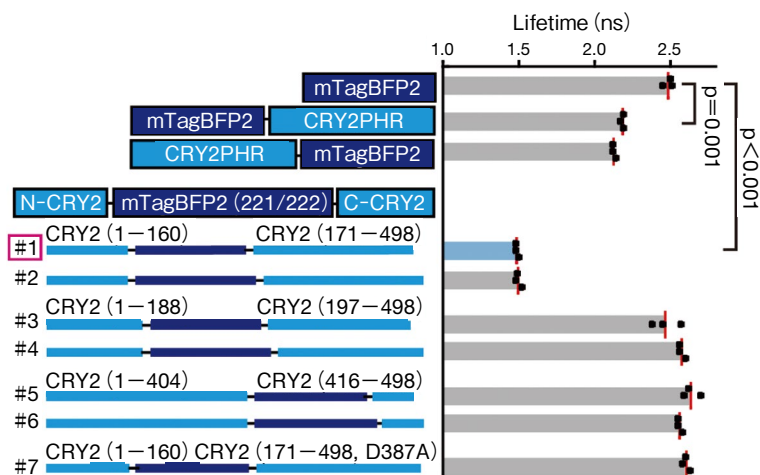


図 2 蛍光寿命イメージング顕微鏡法による FRET 効率の最適化

標記のキメラタンパク質について FLIM により蛍光寿命を測定した。#1, 3, 5, 7 は mTagBFP2 (アミノ酸 1-221), #2, 4, 6 は mTagBFP2 (アミノ酸 1-222) を挿入。最も大きな蛍光寿命の短縮を示した融合タンパク質 (#1) を 2paCRY2 とした。(文献 5 より引用)

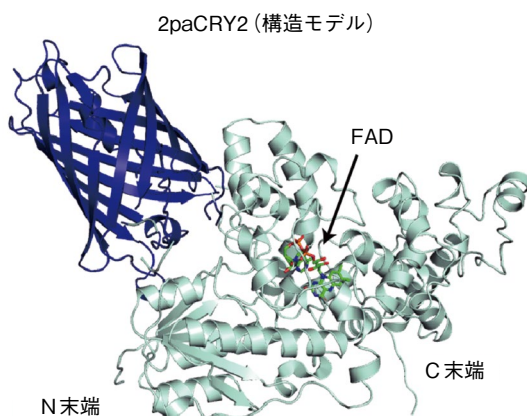


図 3 2paCRY2 の構造モデル

FAD への FRET の有無を検証し、その効率を定量する必要がある。しかし、CRY2 結合型の FAD が発する蛍光は微弱なため、ドナーとアクセプターの蛍光比測定による FRET 効率の定量は困難である。そこで、蛍光寿命イメージング顕微鏡法 (fluorescence lifetime imaging microscopy; FLIM) を用いて FRET 効率を定量した。蛍光寿命とは、蛍光分子が励起されてから蛍光を放出するまでの時間のことで、発する蛍光の強度が $1/e$ になるまでの時間として定義される⁶⁾。蛍光分子は固有の蛍光寿命を持つが、FRET が起こると

エネルギーの一部がアクセプターに移動するため、ドナーの蛍光寿命が短縮する。ドナー単体の蛍光寿命を τ_D 、アクセプター存在時のドナー蛍光寿命を τ_{DA} とするとき、FRET 効率 E は下記式に従う。

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$

筆者らはまず、mTagBFP2 を短いリンカーを挟んで CRY2 の N 末端に結合させた融合タンパク質を作製し、蛍光寿命を測定した。その結果、mTagBFP2 の蛍光寿命が 2.5 ns → 2.2 ns に短縮し、mTagBFP2 から FAD への FRET が起きていることが示唆された (図 2)。しかし、推定 FRET 効率は 10% 程度と低いため、更なる改良を試みた。

次に、構造モデルを参照しながらツール改良に取り組んだ。*Arabidopsis thaliana* 由来の CRY2 の結晶構造は未決定であったため、ホモログである CRY1 の構造を用いて、ホモロジー・モデリング法により CRY2 の構造モデルを作製した。筆者らは FAD の近傍に明確な二次構造をとらないループ構造があることに着目し、これらのループ領域に mTagBFP2 を挿入することで、発色団間の距離を縮められるのではないかと考えた。ループを選定して mTagBFP2 を挿入した結果、CRY2

の 161-170 番目アミノ酸ループに mTagBFP2 を挿入した融合タンパク質 (図 2 #1) において, mTagBFP2 の蛍光寿命が 1.5 ns 程度まで短縮し, FRET 効率は 40% と推定された。筆者らはこの融合タンパク質を, two-photon activatable CRY2 (2paCRY2) と命名した (図 3)。

最後に, 蛍光寿命の短縮が mTagBFP2 から FAD への FRET によるものかどうかを確認するため, 2paCRY2 に FAD 非結合型変異体である D387A 変異体⁷⁾を用いて同様の実験を行ったところ, 確かに FAD への FRET によるものであることが確認された (図 2 #7)。

IV 二光子励起誘導性 RAF1 活性化システムの開発

次に, 2paCRY2 を用いて, 細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) シグナル伝達経路を二光子励起により活性化するツールを開発した。ERK シグナルは細胞増殖や分化, 腫瘍形成など様々な生体活動を制御している。従来の生化学的手法では単一細胞レベルでの ERK 活性動態の観察は難しかったが, 近年 ERK 活性を可視化するバイオセンサーの発展に伴い, 培養細胞やマウス生体皮膚などにおいて, ERK のパルス状の活性上昇や隣接細胞への伝搬といった複雑な活性動態が明らかになっている⁸⁻¹⁰⁾。

二光子励起で ERK 活性を操作するため,

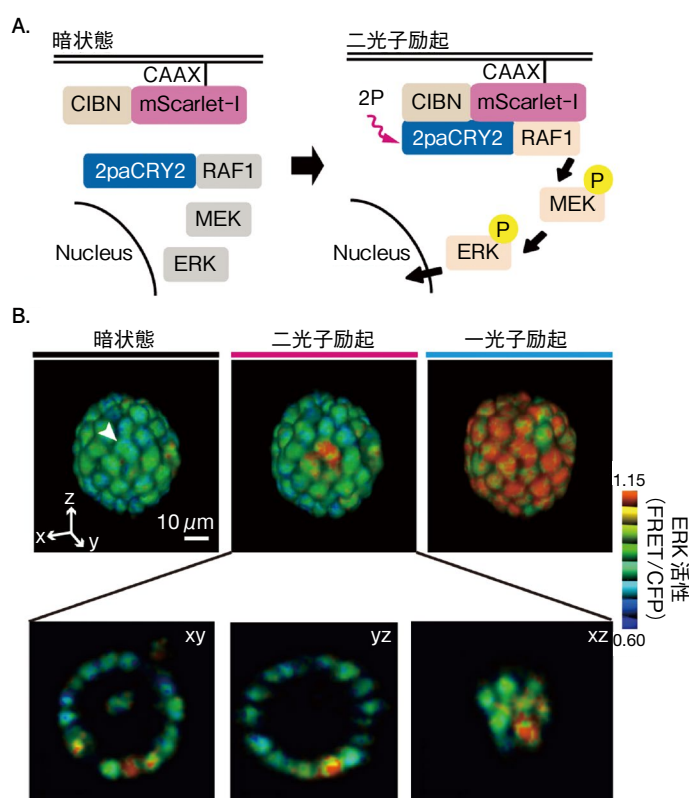


図 4 2paRAF を用いた三次元管腔構造体における単一細胞での ERK 活性化

A. 2paRAF システムの模式図。結合パートナー CIBN を CAAX ドメインの付加により膜に結合させ, 2paCRY2-RAF1 融合タンパク質を細胞全体に発現させる。光刺激に伴い 2paCRY2-RAF1 が膜に移行し, 膜上で活性化された RAF1 タンパク質が下流の MEK および ERK を活性化する。

B. 2paRAF および核型 ERK センサーを発現する MDCK 管腔構造体の 3D イメージング。暖色ほど高い ERK 活性を示す。二光子励起で三次元空間上の単一細胞で ERK が活性化できることを示している。(文献 5 より引用)

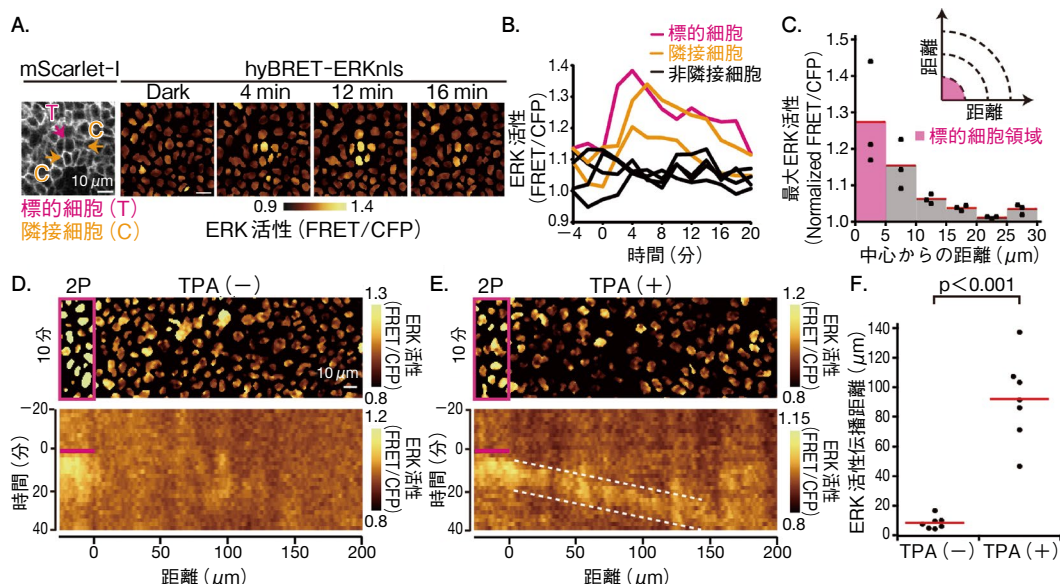


図 5 生体マウス皮膚における ERK 活性伝播誘導

A-C. 単一細胞における ERK 活性化。A. 2paRAF および核型 ERK センサーを発現するマウスの皮膚基底層のイメージング。マゼンタの矢印で示す標的細胞を二光子励起で刺激し、同時に ERK 活性をイメージングした。ERK 活性は金色の疑似カラーで示した。B. 標的細胞 (マゼンタ)、隣接細胞 (黄色)、非隣接細胞 (黒色) における ERK 活性の経時的変化。C. 標的細胞の重心からの ERK の伝播距離。

D-F. ERK 活性波状伝播の誘導。D, E. 上段, 2paRAF および ERK センサーを発現するマウスの皮膚基底層のイメージング。マゼンタで囲んだ部分を二光子刺激した。下段, 横軸に距離, 縦軸に時間を示したカイモグラフ。TPA (-) では二光子励起後に ERK 活性は伝播しないが, TPA (+) では 100 μm 以上にわたり伝播する。F. ERK 活性伝播距離の定量。(文献 5 より引用)

2paCRY を用いて二光子励起で RAF1 タンパク質の活性化が可能な 2paRAF を作製した (図 4A)。従来の CRY2 を用いた CRY2-RAF システムと, 2paRAF システムを比較したところ, 2paRAF は CRY2-RAF に対して優位に二光子励起効率が高かった。

次に, 二光子励起の特徴を活かして, 三次元構造内の単一細胞において, ERK 活性の光制御を試みた。イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞に 2paRAF および ERK バイオセンサーを恒常的に発現させ, マトリゲル上で三次元管腔構造体を作製した。この構造体内において単一細胞を二光子励起で刺激した結果, 狙った一細胞のみで ERK を活性化することができた (図 4B)。

V 生体皮膚への応用

次に, 生体内における 2paRAF の応用について

紹介する。筆者らの所属する松田研究室では, マウスの皮膚基底細胞層において, ERK の活性化が花火のように伝播する現象を発見し, この現象を spatial propagation of radial ERK activity distribution (SPREAD) と命名した¹⁰⁾。この現象をよく観察すると, ERK 活性の伝播速度は SPREAD の中心から離れてもほぼ一定であることから, 液性因子の拡散によるものではなく, ERK 活性が引き金になって更に隣の細胞の ERK 活性化を誘導して伝播する triggerwave であろうと考えられた。しかし, 観察のみでは ERK 活性化とその伝播の因果関係を証明することは困難であった。

筆者らは 2paRAF を用いてこの問題を明らかにしようと試みた。マウス生体内で ERK 活性の観察と制御を同時に行うため, 2paRAF と ERK センサーを全身に発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスの皮膚基底層において単一細胞の二光子刺激を行ったところ, 刺激した

個々の細胞では ERK が活性化するものの、伝播は隣接する細胞までにとどまっていた(図 5A, B)。伝播距離を定量すると、もともとの SPREAD では ERK の伝播距離は約 50 μm から 100 μm であったのに対し、光活性化後の伝播距離は約 10 μm であり、通常の皮膚において単一細胞における ERK 活性化は SPREAD を惹起しないことがわかった(図 5C)。また、複数細胞において ERK を活性化することで遠方まで活性化が伝播するのではないかと考え、20-30 細胞を含む領域を同時に刺激することを試みたが、やはり ERK 活性の伝播は隣接する細胞までにとどまっていた(図 5D)。

SPREAD は基底細胞増殖時によく観察されるほか、発がんプロモーターである 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) を塗布することで頻度が亢進することが知られている。そこで、TPA を用いて基底細胞を刺激した状態で、一定領域で ERK を活性化させた結果、光刺激領域から約 100 μm にわたる伝播が観察された(図 5E, F)。これらの結果は、正常の皮膚においては不必要な増殖を防ぐために増殖シグナルの伝播が抑制され、創傷治癒時などの必要時にのみシグナルを効率よく伝えるしくみが備わっていることを示唆している。また、TPA は炎症誘発剤としても用いられるため、このような ERK 活性伝播には炎症細胞による制御がかかわっている可能性もある。いずれにせよ、今後更なる分子メカニズムの検証が必要であろう。

おわりに

本稿では、生体観察に有用な二光子励起顕微鏡のための光遺伝学ツールの開発について紹介した。既に FRAPA 法は LOV ドメインにも応用可能なことがわかっており⁵⁾、様々な光遺伝学ツールへ応用可能な技術であると考えている。本ツールにより、生体内において単一細胞レベルでの分子活性制御が可能となり、生体におけるシグナル伝達研究を促進することが期待される。本稿が生体イメージングのためのツール開発を行ううえで一助となれば幸いである。

●文 献

- 1) Spiltoir JI, Tucker CL : *Curr Opin Struct Biol.* **57** : 1-8, 2019
- 2) Kennedy MJ, Hughes RM, Peteya LA et al : *Nat Methods.* **7** : 973-975, 2010
- 3) Ueda Y, Sato M : *Chembiochem.* **19** : 1217-1231, 2018
- 4) Denk W, Strickler JH, Webb WW : *Science.* **248** : 73-76, 1990
- 5) Kinjo T, Terai K, Horita S et al : *Nat Methods.* **16** : 1029-1036, 2019
- 6) Gratton E, Breusegem S, Sutin J et al : *J Biomed Opt.* **8** : 381-390, 2003
- 7) Liu H, Yu X, Li K et al : *Science.* **322** : 1535-1539, 2008
- 8) Aoki K, Kumagai Y, Sakurai A et al : *Mol Cell.* **52** : 529-540, 2013
- 9) Wilson MZ, Ravindran PT, Lim WA, Toettcher JE : *Mol Cell.* **67** : 757-769.e5, 2017
- 10) Hiratsuka T, Fujita Y, Naoki H et al : *Elife.* **4** : e05178, 2015