

【目的】 オプトジェネティクスとは、光を用いて生体活動を制御する技術であり、生体へ影響が低く、光照射の領域や時間の制御が容易な点から注目されている。オプトジェネティクスでは、様々な生物種から発見された光受容体を、生体活動を制御するためのスイッチとして利用する。生物の持つ未知光受容体を効率的に同定する手法を開発できれば、異なる波長の光や、異なるシグナル伝達経路を制御する光受容体をオプトジェネティクス分野に供給できる。我々は、新奇光受容体を同定する新しい手法として、全遺伝子発現の作用スペクトルを次世代シーケンサーによって取得する「フォトーム解析」と命名した手法を提案している。本研究では、フォトーム解析のための高分解能多波長光照射を製作し、有効性を検証するとともに、フォトーム解析を応用して、原核生物の光スイッチプロモーター配列の網羅同定を行った。

【方法】 フォトーム解析において多検体試料へ光照射を行うための多波長光照射装置を開発した。キセノンランプ白色光源を回折格子にて分光し、光ファイバーにて取り出したを波長 300~800 nm の光を 5 nm 間隔ごとに 96 ウェルプレートに照射する仕様の装置を制作した (下図)。さらに、各ファイバー先端に減光フィルターを設置することで、照射光の強度を光子単位で均一化した。この装置により、光照射から RNA 精製、次世代シーケンサーライブラリ調製までを 96 ウェルプレート上で一貫して行うことが可能となった。続いて、大腸菌とシアノバクテリアの細胞に対して製作した多波長光照射装置を用いて光照射を行い、RNA を抽出した。得られた RNA からシーケンサーライブラリを調整し、次世代シーケンサーによる RNA-Seq 解析とクラスター解析を行い、全遺伝子発現の波長依存性を網羅的に同定した。

【結果】 RNA-Seq 解析による全遺伝子発現の定量と、それらのクラスター解析により、紫外~遠赤色光までの幅広い光によって波長依存的に発現制御を受ける遺伝子を網羅的に同定した。これまでの研究で使用されていた LED 光源よりも高い分解能で遺伝子発現の波長依存パターンを取得でき、さらに、格段に少ない試料量で解析できることを実証できた。これらの結果は、より幅広い生体試料に対してフォトーム解析を応用することができる可能性を強く示している。興味深いことに、シアノバクテリア光応答遺伝子の数は、大腸菌と比べて豊富であり、多様な光環境で生息する光合成生物における光受容体の探索の有効性を強く示唆していた。また、今回の解析では、リード数の大きな次世代シーケンサー HiSeq システムを利用したが、取得したリードのうち 90%以上がリボソーム RNA 領域にマッピングされ、低発現遺伝子については波長依存パターンの精度が低下した。リボソーム RNA を除去してメッセンジャー RNA を濃縮する工程が、ゲノムサイズが小さな生物種であっても必要であることが明らかとなった。

本研究で使用した高分解能多波長光照射装置の発光スペクトル

