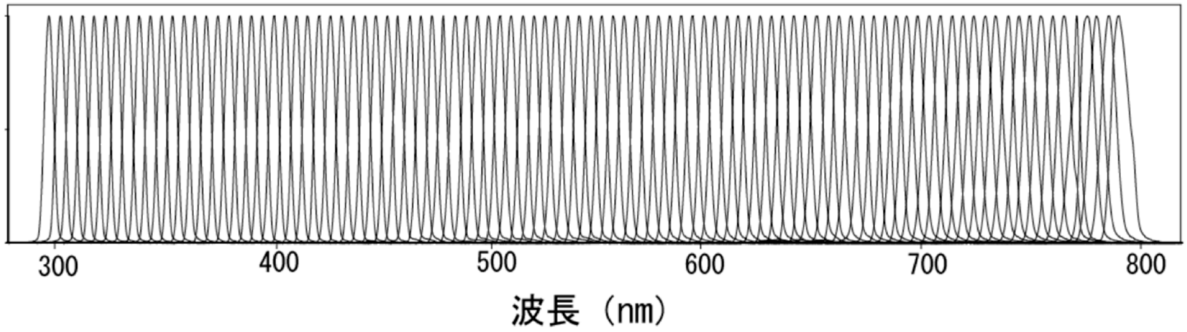
154　オプトジェネティクスのための多様な光スイッチの開発	広瀬　侑

【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クエ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、照射光の強度を光量子単位で均一化した。この装置により、光照射から RNA 精製、次世代シークエ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 からシークエンスライブラリを調整し、次世代シークエンサーによる 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クエンサー 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



154. オプトジェネティクスのための多様な光スイッチの開発

広瀬　侑

豊橋技術科学大学 大学院工学研究科 環境・生命工学系

Key words：光受容体，オプトジェネティクス，次世代シークエンサー，フォトーム

緒　言

オプトジェネティクスとは、生体活動を光照射によって制御する技術であり、フィトクロム・ロドプシン・フォトトロピンなどの多様な光受容体をスイッチとして利用する［1〜4］。これらの光受容体は、植物・動物・微生物など様々な生物種から発見されてきた。一般的に光受容体は、生体内の存在量が少ないため生化学的な単離が難しく、また、光照射によって引き起こされる生理応答の強度が小さければ、その光応答現象の存在すら認知できない。そのため、次世代シークエンサーの普及によりゲノム情報が爆発的に蓄積しつつある現在でも、生物がどれほど多様な光受容体を保有しているのか？すなわち、生物の持つ光受容体の多様性の全体像は未だに解明されてない。未知の光受容体を網羅的かつ効率的に同定できれば、光受容体の発見とその作用機序の解明のペースを飛躍的に加速でき、これはオプトジェネティクスにおける優れた光スイッチの創出に直結する。

我々は、次世代シークエンサーの超並列定量能力を活かして、新奇の光受容体を効率的に探索する手法の開発に取り組んできた。近年、「フォトーム解析」と呼ばれる生体の遺伝子発現の波長依存性を包括的に取得する手法の開発に成功した。フォトーム解析では、細胞に高分解能の全可視領域のそれぞれの光を照射し、次世代シークエンサーを用いたRNA-Seq 解析によって各試料の全遺伝子発現を定量し、光色に対する発現パターンごとに遺伝子をクラスター解析によって分類することで、転写システムの光色応答の全体像を明らかにするものである。この手法は、特定の生物が持つ転写制御型の光スイッチを超高感度かつ網羅的に探索できること、また、原理的に全ての生物種に適用が可能というメリットがある。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、その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。

方法および結果

1. 高分解能多波長光照射装置の作製

フォトーム解析では、均一な細胞培養液を分割し、それらに紫外〜遠赤色光までの幅広い光を別々に照射する必要がある。既存の細胞への光照射技術として、LED 光源、単色分光器、大型スペクトログラフなどを使用する方法が挙げられる。しかし、これらの技術は、波長分解能、同時照射光色数、装置サイズや作業性に一長一短があり、研究室単位で高分解能の多波長の光を効率よく照射する装置は存在しなかった。そこで私は、300 W 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波長 300〜800 nm の光を 5 nm 間隔ごとに照射する仕様の装置を制作した（図 1）。光ファイバーからの出射光のスペクトルを測定し、高い分解能で光照射できることを確認した（図 2）。さらに、白色光源の光強度は波長によって大きなばらつきがあるため、各ファイバー先端に減光フィルターを設置することで、照射光の強度を光量子単位で均一化した（図 1）。光ファイバーの出射先を、汎用的に使用される 96 ウェルプレートに合わせることで、光照射から RNA 精製、次世代シークエンサーライブラリ調製までを一貫して行うことが可能となった。加えて、光照射部に温度制御装置も設置し、幅広い温度で生育する細胞種に対応した。開発した多波長光照射装置について、科学技術振興機構の大学等知財基盤強化支援事業の支援を受け、国際特許出願を完了した（特願 2017-074637、国際出願日 2018.4.4）。

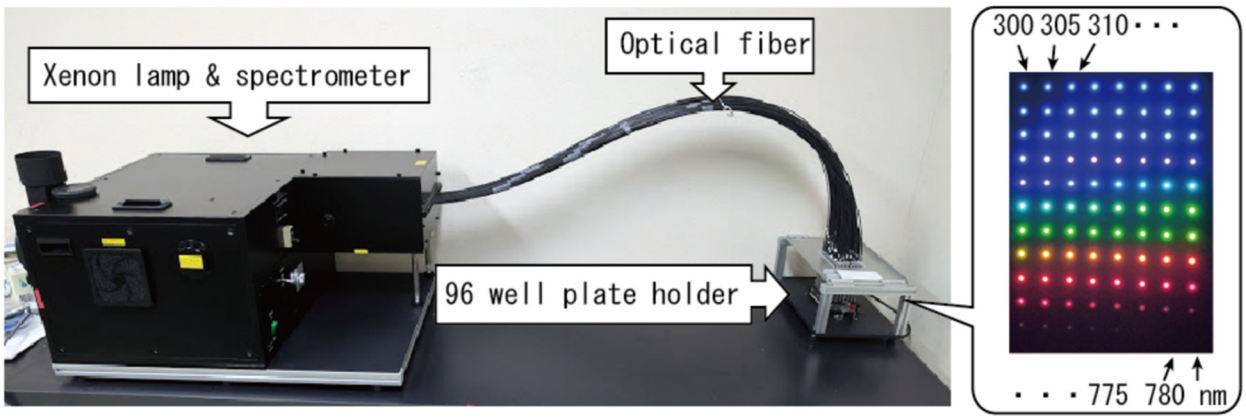


図 1.　多波長光照射照射装置の外観

豊橋技術科学大学に設置された多波長光照射装置の外観を示す。300 W キセノンランプの白色光源を回折格子によって分光し、それぞれの波長の光を光ファイバーによって取り出し、96 ウェルプレートに照射する。

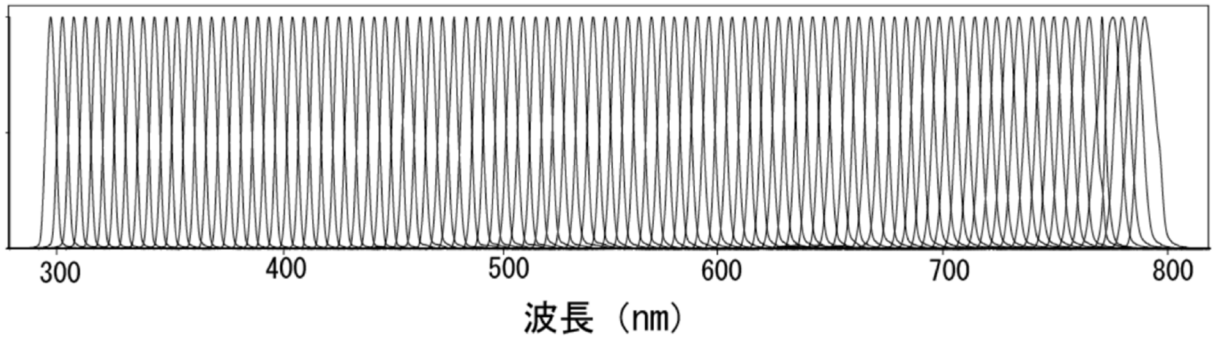


図 2.　出射光のスペクトル分布

光ファイバー先端からの出射光のスペクトル分布を示す。ピーク強度で正規化している。波長純度の目安である波長半値幅はおよそ 2 nm であり、純度の高い光を別々の試料に同時に照射することができる。

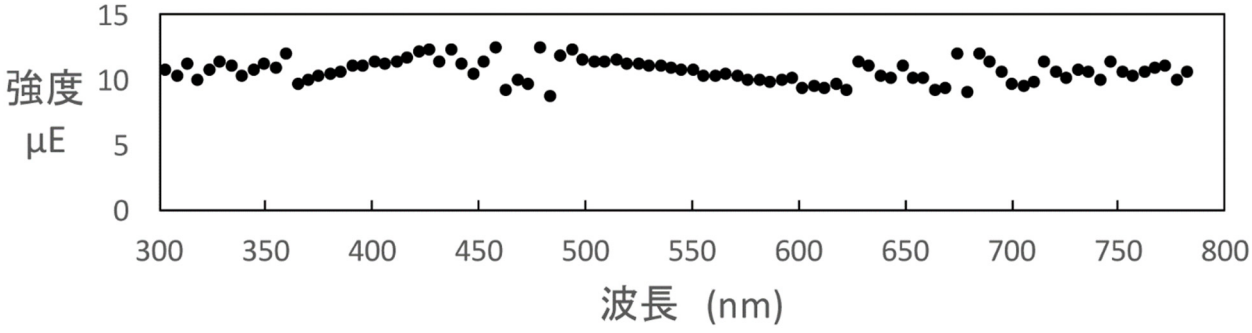


図 3.　出射光の光強度分布

光量子単位で定量した出射光のスペクトルの強度を示す。約 10 μE の光強度で均一な光強度での照射が可能である。

2. フォトーム解析の実施

製作した多波長光照射装置を用いてフォトーム解析の実証実験を行った。解析対象とする生物種として、解析費用の観点から、ゲノムサイズの小さな原核生物を選択した。その中から、多様な光環境下で光合成を行うシアノバクテリアと、モデル生物として最も研究が進んでいる大腸菌を選択した。これらの 2 種の細胞のそれぞれを 96 ウェルプレートで培養し、多波長光照射装置を用いて 96 波長の光照射を実施し、RNA を抽出した。その後、次世代シークエンサー用のシークエンスライブラリを作成して RNA-Seq 解析とクラスター解析を行い、全遺伝子発現の作用スペクトルを取得した。論文未発表のため、データの詳細はここでは示さないが、シアノバクテリアについては、紫外光から遠赤色光までの多様な波長の光で誘導される遺伝子の同定に成功した。また、大腸菌では UV-B 領域の光で強く誘導される遺伝子の同定に成功した（図 4）。

また、これらの実験によって課題も明らかとなった。シアノバクテリアの解析では、細胞内のリボソーム RNA 除去をせず、取得リード数の大きな次世代シークエンサーHiSeq2500（東京農業大学生物資源ゲノム解析センター）を用いてシークエンスを行った。この結果、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てしまい、低発現遺伝子については十分なリード数を得ることができなかった。そこで、大腸菌の解析ではリボソーム RNA を除去し、リード数の小さな MiSeq を用いてシークエンスを行ったところ、低発現遺伝子についても十分なリード数を得ることができた。これらの結果は、フォトーム解析においてはメッセンジャーRNA の濃縮プロセスが必要であることを示している。

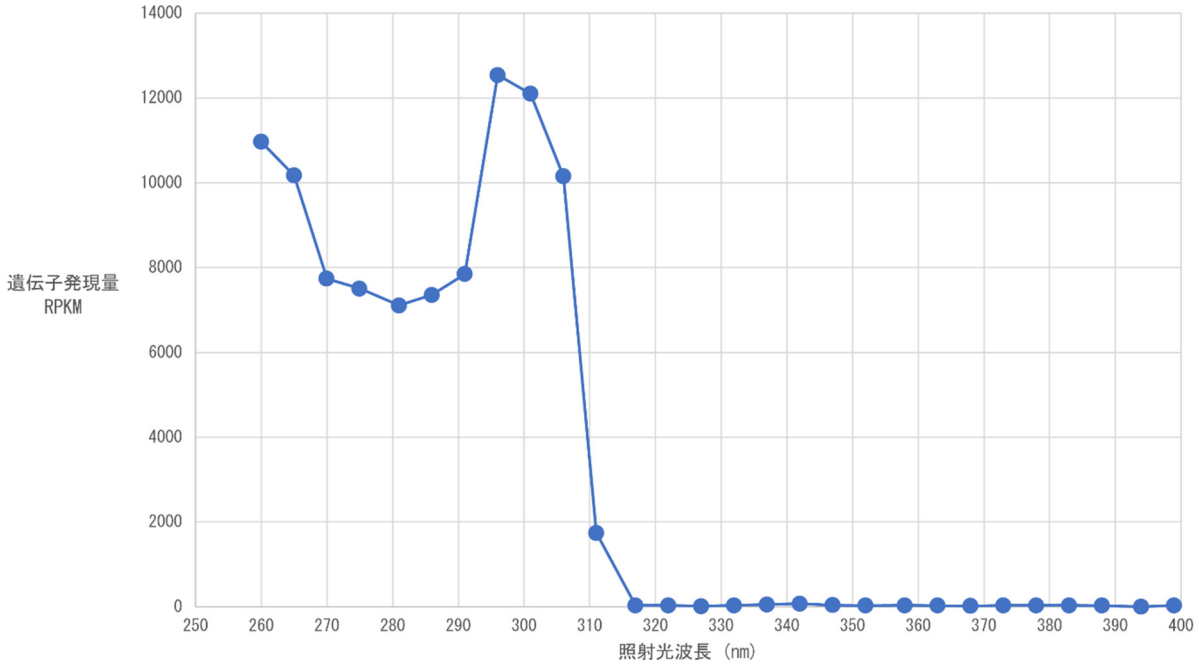


図 4. UV-B 領域で誘導される大腸菌の遺伝子

大腸菌のある遺伝子は、UV-B の光照射により、細胞内のメッセンジャーRNA の約 1%を占めるレベルまで発現が上昇する。

考　察

興味深いことに、光応答遺伝子は大腸菌と比べてシアノバクテリアの方が豊富であり、光スイッチの探索は多様な光環境で生息する光合成生物を中心に進めるのが効率的であると考えられた。今後は、シアノバクテリアと大腸菌において同定された光色応答遺伝子の上流に存在する光受容体を同定する予定である。また、シアノバクテリア以外の光合成生物である真核藻類や陸上植物において光スイッチ遺伝子の探索を行い、その機能を解明する必要がある。オプトジェネティクスは、多様な幅広い生理現象の制御が可能であり、社会に役立つ技術の創生につながることが期待されている。そのため、オプトジェネティクスの産業応用を目指した研究の競争が国際的に激しさを増している。日本のオプトジェネティクス研究の優位性を保つためには、これらの研究をスピード感を持って実施していくことが必要不可欠であると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京農業大学バイオサイエンス研究科の渡辺智博士、静岡大学グリーン科学研究所の兼崎友博士である。また、豊橋技術科学大学大学院工学研究科分子遺伝学研究室の浴俊彦教授にご助言をいただいた。厚く御礼を申し上げる。

文　献

1) Fenno L1, Yizhar O, Deisseroth K. The development and application of optogenetics. Annu Rev Neurosci. 2011;34:389-412. PMID: 21692661 doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113817.
2) Möglich A1, Moffat K. Engineered photoreceptors as novel optogenetic tools. Photochem Photobiol Sci. 2010 Oct 28;9(10):1286-300. Epub 2010 Sep 13. PMID: 20835487 doi: 10.1039/c0pp00167h.
3) Pathak GP1, Vrana JD, Tucker CL. Optogenetic control of cell function using engineered photoreceptors. Biol Cell. 2013 Feb;105(2):59-72. doi: 10.1111/boc.201200056. PMID: 23157573 Epub 2012 Dec 21.
4) Häusser M1.Optogenetics: the age of light. Nat Methods. 2014 Oct;11(10):1012-4. PMID: 25264778 doi: 10.1038/nmeth.3111.