

研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		光作動型シグナル伝達操作システムの多細胞生物への導入と応用			
研究テーマ (欧文) AZ		Introduction and application of a light-induced system to a multicellular organism			
研究氏 代 表 名 者	カタカナ CC	姓)オダ	名)シゲカズ	研究期間 B	2017 ~ 2019 年
	漢字 CB	小田	茂和	報告年度 YR	2019年
	ローマ字 CZ	Oda	Shigekazu	研究機関名	基礎生物学研究所
研究代表者 CD 所属機関・職名		基礎生物学研究所・特別協力研究員			
<p>概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。)</p> <p>光誘導性二量体化(Light-Induced Dimerization, LID)システムを応用すれば、シグナル伝達の活性を光で自由に操作することができるようになる。光誘導性二量体化システムの一つとして、Phy-PIF システムがある。PhyB-PIF システムでは、発色団である Phycocyanobilin (PCB) と共有結合した PhyB と Phytochrome Interacting Factor (PIF) が赤色光の照射によりヘテロ二量体を安定的に形成し、近赤色光の照射によってヘテロ二量体が急速に解離する (Ni M et al. 1999)。本研究では、PhyB-PIF システムを多細胞生物である線虫 <i>C. elegans</i> に導入し、さらに ERK-MAPK シグナル伝達経路と動物行動の定量的解析に応用することを目的とした。</p> <p>まずは PCB を外部から添加した時に線虫の体全体へ浸透するかそれを餌に混ぜて検証した。検証には、PhyB の変異体でかつ PCB を結合すると赤色光を発する PhyB Y276H を線虫の腸管、神経系および筋肉に発現させて用いた。結果、外部添加した PCB は腸にのみしか十分浸透しなかった。そこで、開発に携わった4つの遺伝子導入による PCB 細胞内合成システムを線虫に導入したところ、神経系、筋肉と腸管で合成された PCB が見られた。</p> <p>次に、実際に PCB が合成されている腸管内と筋細胞において、Phy-PIF システムが機能するか検証した。PhyB-PIF システムの2量体化を光照射で検証する際、多量体タンパク質 (MP multimeric protein) を用いてタンパク質凝集の有無を観察した。結果として、遺伝子にコードされた PCB 合成システムと PhyB-PIF システムが線虫で機能すること、またこの2両体化システムと MP を用いればタンパク凝集を制御できることがわかった。以上のことから、PhyB-PIF システムは PCB 合成システムと併用すれば、多細胞生物でもシグナル伝達の光操作のために使える可能性が高いことが示された。</p> <p>ERK-MAPK シグナル伝達経路を操作するために、PhyB-PIF システムを改変した。理論的には、ERK の上流にある CRaf を先述したように MP を用いて凝集させれば下流の ERK が活性化させることができるため、実際に実験で検証してみた。ERK の活性を見るために、FRET プローブである ERKy を用いた。結果として、CRaf が凝集したときに ERK の活性が見られたが、応答はそれほど大きくはなかった。従って、この改変 PhyB-PIF システムを改良する必要があることがわかった。</p>					
キーワード FA	光誘導性二量体化システム	光遺伝学	C. elegans		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

Manipulating or perturbing biochemical reactions would be useful to reveal how animals' behaviors emerge from molecular networks via cellular networks (e.g. neural network). Light would be beneficial for the manipulation as it can be switched within milli seconds and has variable wavelengths. Many types of light-induced dimerization (LID) systems have been developed, however, most of LIDs including CRY2-CIBN employ blue light, which is sensed by many animals, and lack of higher time resolution. Compared to these LIDs, phytochrome B (PhyB)-phytochrome-interacting factor (PIF) systems have higher time resolution and functions with red/infrared lights. Regardless of the advantages, PhyB-PIF systems have not been established in animals well. In this study, we apply this system into a nematode *Caenorhabditis elegans* and establish quantitative methods for molecular studies in animals.

For functional PhyB-PIF, a purified phycocyanobilin (PCB), a chromophore that binds to PhyB must be added to animal cells because animals do not have a set of genes to produce PCB. We found that PCB does not sufficiently penetrate worms' bodies. Thus, we introduced the set of genes into worms to synthesize PCB in cells. These four genes (PcyA, HO1, Fd and Fnr) synthesized PCB in major tissues including intestines, neurons and muscles. With this fully-genetically encoded PhyB-PIF system, we next verified whether the dimerization between PhyB and PIF could be manipulated by light in intestines and muscles. PIF was fused to a multimeric protein (MP) while PhyB was simply fused to GFP. PhyB-GFP formed clusters by binding to PIF-MP upon exposure to red light within 30 sec and the clusters dissolved upon exposure to near-infrared light within 30 sec indicating that genetically encoded PhyB-PIF system can be used for manipulating signal transduction in *C. elegans*. Our study opened the way for application of fully-genetically encoded PhyB-PIF system in animals. This system will broaden our potential for molecular analysis in animals (e.g. quantitative analysis of the relationship between molecules and animals' phenotype without interfering with responsive light such as blue light, manipulation of signal transduction while imaging molecules with a probe).