別紙２

平成 27 年度　全体研究開発報告書

１．研究開発領域：

画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明

２．研究開発課題名：

光遺伝学を基にしたイノシトールリン脂質制御による精神疾患病態の正常化の検証

３．研究開発代表者：　上田善文（東京大学教養学部広域システム科学系佐藤守俊研究室）

４．研究開発の成果

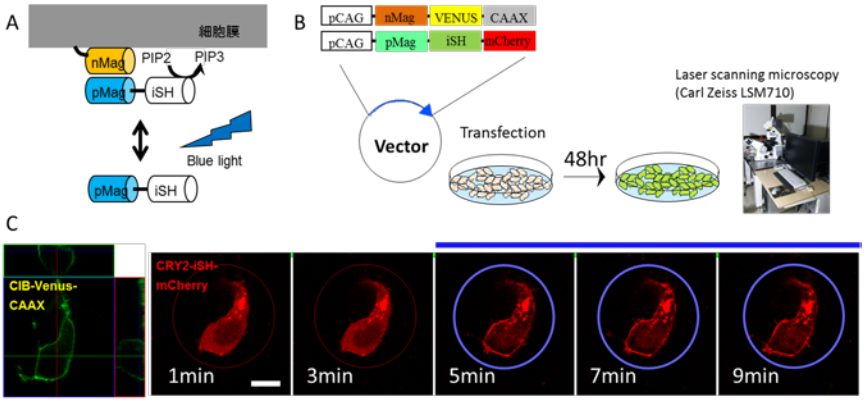
本研究の目的は、光刺激によって、機能性脂質の濃度をコントロールする脂質光遺伝学を確立する。この手法を用いて、培養細胞レベルでのコントロールだけでなく、脳などの組織切片、さらには、生きたマウス個体などにも適用することによって、様々なレベルでの機能性脂質の機能の理解を深めることを第一の目的とする。さらに、将来的には、機能性脂質を産生または分解する酵素の異常によって、機能を損なったマウスなどにも応用することによって、病態を正常化し、病態改善のためのリード化合物となることを証明する。

平成 27 年度は、本研究の核である光遺伝学の知識を有する東京大学の佐藤守俊研究室に 2016 年 1 月 4 日より籍を移し、光遺伝学実験を遂行するための環境の調整を行った。脳スライスを作製するための安全キャビネット、培養するためのインキュベーター、作製した脳スライスに遺伝子を打ち込むための遺伝子銃、発現したものを観察するための 2 光子顕微鏡のセットアップを終えた。移転およびセットアップに多少時間はかかるものの、滞りなくセットアップは終えた。

それと同時に、培養細胞レベルでの光遺伝学ツールの妥当性の検証を行った。

イノシトールリン脂質を産生させるメカニズムを magnet system を例に、図 A に示す。即ち、①膜局在ドメインを融合させたを用いて、nMag をスパインの膜に局在させる。②PIP3 産生酵素（iSH2）、と融合した pMag を用いて、③細胞に blue light を照射し、④速やかに、pMag を膜に移行、局在させ、⑤PIP3 の産生を引き起こす。HEK, COS7 などの培養細胞に、光遺伝学ツールをリポフェクション法によって導入した。2 日後、共焦点レーザー顕微鏡下で発現を確認した（図 B）。光遺伝学の土台を気付くうえで、様々な光遺伝学ツールを試しており、CRY2-CIB system において、CIB が細胞膜に、CRY2 を細胞質に発現させ、光刺激を行うと速やかに CRY2 が膜に移動することが観察された(図 C)。光遺伝学のシステムは、酵素ドメインを入れ替えるだけでその他の脂質の産生分解を誘導することが可能である。現在までに、7 種類あるイノシトールリン脂質やその他の脂質にも応用し、このシステムが機能することを明らかにしている。

このように、本研究を遂行するに当たっての研究環境及びシステムの妥当性は、今年度ではほぼ完了できたと考えている。来年度は、組織への応用を検討しており、計画通りに進んでいる。



光遺伝学ツール培養細胞系での評価

A. Magnet systemを例に用いたPIP3産生の概念図。①膜局在ドメインを融合させたnMagを用いて、nMagを細胞膜に局在させる。②PIP3産生酵素、または、分解酵素(PTEN酵素部位) と融合したpMagを用いて、③細胞にblue light を照射し、④速やかに、pMagを膜に移行、局在させ、⑤PIP3の産生または分解を引き起こす。B. 細胞培養系での実験手順。光遺伝学ツールを導入したプラスミドを、トランスフェクションし、蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察する。C. 様々な光遺伝学ツールを試しており、CRY2-CIB systemにおいて、CIBが膜に局在していることを確認し、CRY2が、光照射後、速やかに膜に局在することを明らかにした。