

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Control of functional lipids using optogenetics

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京大学 大学院総合文化研究科広域科学専攻広域システム
科学系：特任研究員 上田善文

所属 役職 氏名： (英語) The University of Tokyo, Graduate School of Arts and Sciences,
Department of General Systems Studies, Specially Appointed Researcher,
Yoshibumi UEDA

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

(和文) 本研究の目的は、ホスファチジルイノシトールリン脂質を始めとした機能性脂質の量を光によって細胞および個体レベルで時空間的に制御することで、精神疾患病態やその他の疾患のモデルマウスにおいてその病態が改善できることを検証することである。さらに、

この研究を通して、脂質を時空間的に自由に制御するための技術、脂質光遺伝学を確立することを目的とする。

平成 28 年度は、ホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-三リン酸 (PIP3) を細胞内で光制御するための、PI3K opto (PIP3 の濃度を上げる) および XXX opto (PIP3 の濃度を下げる) を遺伝子工学的に作製した。PI3K opto に関しては、これらを培養細胞レベルで機能することを確認した。即ち、COS7 細胞に PI3K opto を発現させ、細胞の一部分のみを光照射し、PI3K opto を活性化し、その部位で PIP3 を産生することができた。それに伴い、COS7 細胞の遊走が観察された。また PIP3 の活性化の指標である PIP3 下流のシグナル分子である Akt のリン酸化も上昇することがウエスタンブロッティングで確認した。XXX opto に関しては、PI3K opto によって、COS7 細胞に誘導された遊走を、XXX opto によって抑制できることを確認した。

同時に、次のステージである、神経細胞スパインでの PIP3 の制御が可能かを検証するための、ラット脳、海馬初代培養系および海馬スライスを作製する設備を整えた。海馬初代培養系においては、リポフェクション法によって、光遺伝学ツールを発現させることができた。また、神経回路ネットワークを保存している海馬スライスレベルにおいては、遺伝子銃によって、PI3K opto および XXX opto を神経細胞特異的に発現させることに成功した。7 日間の青色光刺激によって、海馬 CA1 神経細胞において、apical 側での樹状突起の伸長は観察されなかったが、basal 側での樹状突起の異常な伸長が観察された。

脂質光遺伝学は、その汎用性から、その他の機能性脂質分子にも適応可能である。そこで、細胞内で産生され、オートクライン的に自己の応答を誘導するのみならず、細胞外に放出され、パラクライン的にその他の細胞に働き免疫抑制などの機能を制御する機能性脂質 ABC を光制御するための光遺伝学ツールを作製した。ABC は、細胞外の実受容体に結合した後に活性化させ、カルシウムシグナルを誘導する。カルシウムを指標に、ABC 光遺伝学ツールの応答を評価するためのイメージングの系および発光高度計での評価系の確立を行った。

(英文) Functional Lipids including phosphatidylinositols plays important roles in a broad spectrum of cellular functions including cell proliferation, cell motility, and apoptosis. The purpose of the present study is to establish research field “lipid optogenetics”, by which we are able to spatiotemporally control lipid amounts in the living cells, tissues, and animals using light. This methods allows us to demonstrate that lipids is promising targets for a variety of diseases such as mental retardation like autism, and cancer.

The temporal goal for 2016 was to prepare the constructs of lipid optogenetics

to increase and decrease the amount of phosphatidylinositol 3,4,5-3 phosphates (PIP3), and other functional lipids.

I constructed the genetically encoded optogenetics tools to increase PIP3 (PI3K opto) and to decrease PIP3 (XXX opto). At first, PI3K opto was transfected in HEK cells. We confirmed that PI3K opto produces PIP3 in response to blue light irradiation. Next, we expressed PI3K opto in COS7 cells. When PI3K opto was activated at the local regions by blue light, PIP3 was produced on site, and induced cell membrane lamellipodia and membrane expansion. This PIP3 increase was also checked with the phosphorylation of Akt that is a downstream signaling proteins regulated by PIP3. These data indicates that PI3K opto works well.

In order to investigate the function of PIP3 in neurons, primary culture neuronal system and organotypic hippocampal slice system were established. For hippocampal slices, we observed the abnormal extension of basal dendrites of CA1 pyramidal neuronal cells at 7 days after the stimulation of PI3K opto by blue light, whereas apical dendrites were not affected.

Additionally, I attempt to prepare the optogenetics of a functional lipid, ABC. ABC is crucial for regulating the immune system through the suppression of T cell egress. The interesting point of ABC is that ABC works not only inside the cells where ABC was produced, but also at neighbor cells through paracrine action. This year, I constructed genetically encoded ABC optogenetics tool. Additionally, I established the assay system by calcium increase by which I examine whether ABC optogenetics tool works well or not.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 3件)

1. Furuya A, Kawano F, Nakajima T, Ueda Y, Sato M.
Assembly Domain-Based Optogenetic System for the Efficient Control of Cellular Signaling.
ACS Synth Biol. 2017 Mar 3. doi: 10.1021/acssynbio.7b00022.
2. Taniguchi M, Tasaki T, Ninomiya H, Ueda Y, Kuremoto KI, Mitsutake S, Igarashi Y, Okazaki T, Takegami T.
Sphingomyelin generated by sphingomyelin synthase 1 is involved in attachment and

infection with Japanese encephalitis virus.

Sci Rep. 2016 Nov 28;6:37829. doi: 10.1038/srep37829.

3. Yu G, Onodera H, Aono Y, Kawano F, Ueda Y, Furuya A, Suzuki H, Sato M.
Optical manipulation of the alpha subunits of heterotrimeric G proteins using
photoswitchable dimerization systems.
Sci Rep. 2016 Oct 21;6:35777. doi: 10.1038/srep35777.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 招待講演)

Lipid visualization and manipulation

(口頭) Yoshibumi Ueda

CNRS July 7th 2016 Strasbourg, France

2. 機能性脂質の動態可視化および光制御法

Lipid observation and photo-regulation

(口頭) 上田善文

日本分析化学会第 65 年会

2016 年 09 月 16 日 北海道大学工学部、北海道

3. 「免疫を有するマウスにおける、がん細胞の浸潤、転移巣形成の動態可視化法の確立」

(口頭) 上田善文

第 5 回 日本比較病理学研究会

2017 年 2 月 18 日 13:00-18:00

東京都健康長寿医療センター 1 階多目的室

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

特になし