

《様式B》

研究テーマ 「 フォトーム解析による新たなオプトジェネティクス技術の開発 」

研究責任者 所属機関名 国立大学法人豊橋技術科学大学

官職又は役職 助教

氏 名 広瀬 侑 メールアドレス hirose@ens.tut.ac.jp

共同研究者 所属機関名

官職又は役職

氏 名

(平成 28 年度募集) 第 29 回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000 字程度)

※産業技術として実用化の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

オプトジェネティクスとは、細胞の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。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、次世代シーケ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いない。申請者は、未知の光受容体を網羅的かつ効率的に同定するために、「フォトーム解析」と呼ばれる独自の手法を確立した。この手法は、次世代シーケンサーを用いて遺伝子発現の波長依存性を高波長分解能かつ全遺伝子網羅的に取得するものであり、新奇光受容体の発見と、それを利用したオプトジェネティクス技術の創出を促すことが期待される。本研究では、申請者が独自に開発した高分解能多波長光照射装置のフォトーム解析における有用性を実証することを目的とした。フォトーム解析対象の生物種としてシアノバクテリアと大腸菌を選択した。これらの細胞を培養して多波長光照射装置で光照射を行い、豊橋技術科学大学の次世代シーケンサーMiSeq を用いて RNA-Seq 解析を行い、全遺伝子発現の発現パターンの取得とクラスター解析により、光波長依存的な発現制御を受ける光色応答遺伝子を同定した。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、光受容体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、他のシアノバクテリアや緑藻や植物といった光合成生物において光受容体遺伝子の探索を行う予定である。また、多波長光照射装置については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、PCT 出願を完了した。現在、光学機器メーカーとの多波長光照射装置のライセンス製造に関する交渉も進めている。

2. 実施内容および成果の説明（A 4で、5 ページ以内）

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、これらの既存の技術は、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（表 1）。私は、多検体試料へ光照射を簡便に行うための多波長光照射装置の製作に取り組んだ。様々な装置構成案を検討し、最終的に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が完成した（図 2）。さらに、光照射部に温度調節機能を持つチャンバーを設置し、様々な種類の細胞の培養に対応した。多波長光照射装置は、科学技術振興機構の大学等知財基盤強化支援事業に申請して採択され、PCT 出願を完了した（特願 2017-074637、国際出願日 2018.4.4）。

表 1、多波長光照射装置の特長

装置	波長 分解能	同時照射 光色数	装置価格	作業性	光強度 温度制御
LED光源	~30 nm	5-10	◎	○	◎
単色分光 照射装置	~10 nm	1	○	○	◎
大型スペ クトログ ラフ	~5 nm	最大 100 ?	×	×	△
本装置	~5 nm	96	△	◎	◎

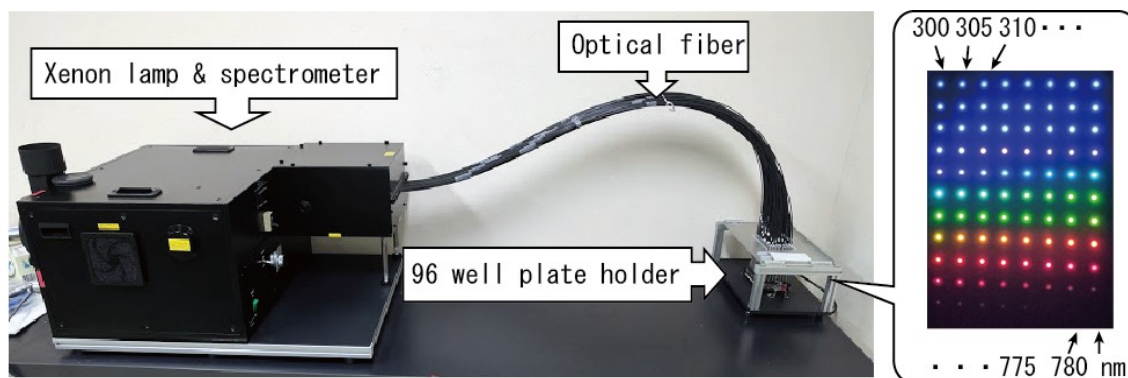


図 1、豊橋技術科学大学に設置した多波長光照射装置の概要

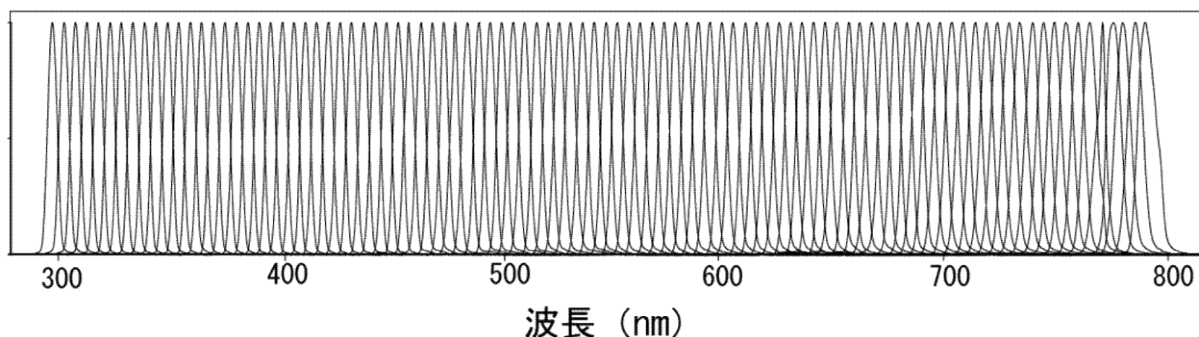


図 2、多波長光照射装置の各ウェルの波長スペクトル（ピーク高さで正規化）

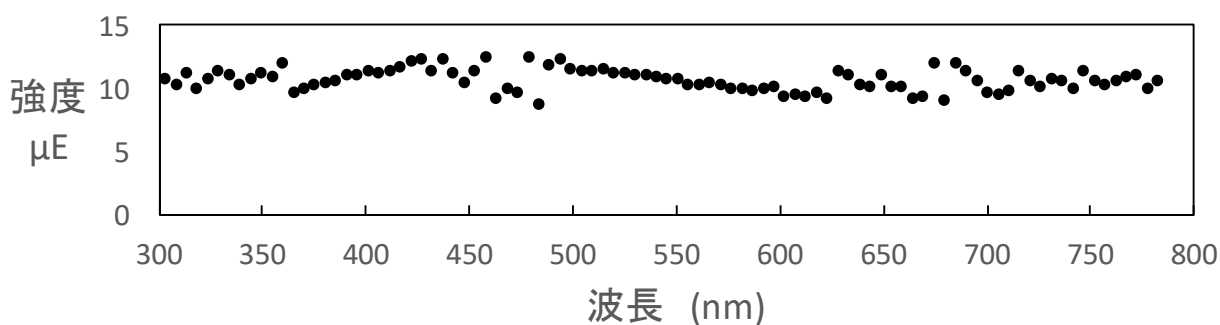


図 3、多波長光照射装置の各ウェルの光強度（減光フィルター補正後）

続いて、製作した他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。解析対象種として、ゲノム情報が整備され、ゲノムサイズの小さなシアノバクテリアと大腸菌を選択した。シアノバクテリアについては、多数の光受容体を保持することが報告されている *Nostoc* 属の糸状性シアノバクテリアを選択した（図 4）。これらの細胞に対して、96 波長の光照射を実施し、次世代シーケンサーを用いた 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、実際のデータはここでは示さないが、いくつかの課題が明らかとなったので、以下に記載する。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ケンサー HiSeq2500（東京農大学生物資源ゲノム

解析センター) を用いてシーケンスを行った。紫外光から遠赤色光までの多様な波長の光で発現が誘導される高発現遺伝子の同定に成功した。一方、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を用いてシーケ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。興味深いことに、紫外光領域で発現が誘導される遺伝子の同定に成功した。これらの遺伝子発現を制御する光受容体を同定するため、ルシフェラーゼレポーターアッセイ系の構築を進めている。

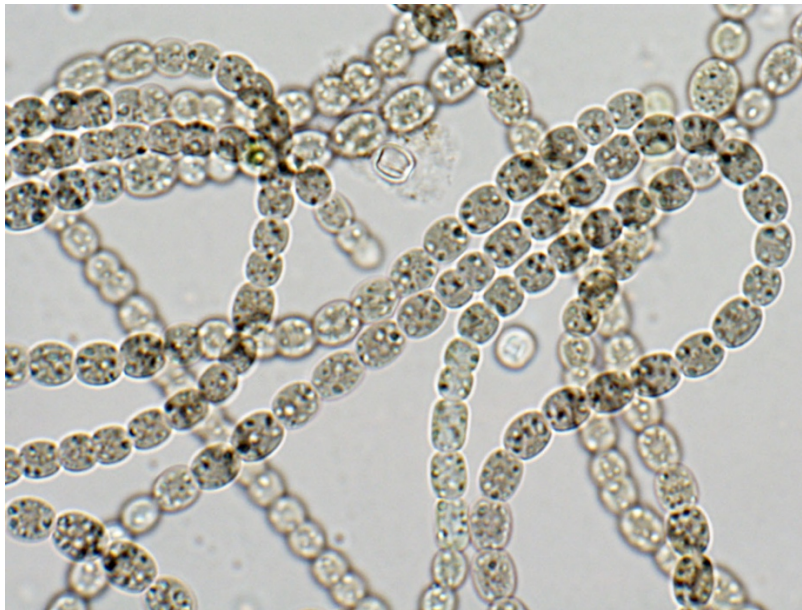


図4、本研究で着目した糸状性シアノバクテリア

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上流に存在する光受容体を同定する予定である。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、シアノバクテリアや緑藻や植物といった光合成生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予定である。また、光学機器メーカーとの多波長光照射装置のライセンス製造に関する交渉も進め、装置販売につなげていく予定である。