

遺伝子発現を光で制御できる新技術を開発

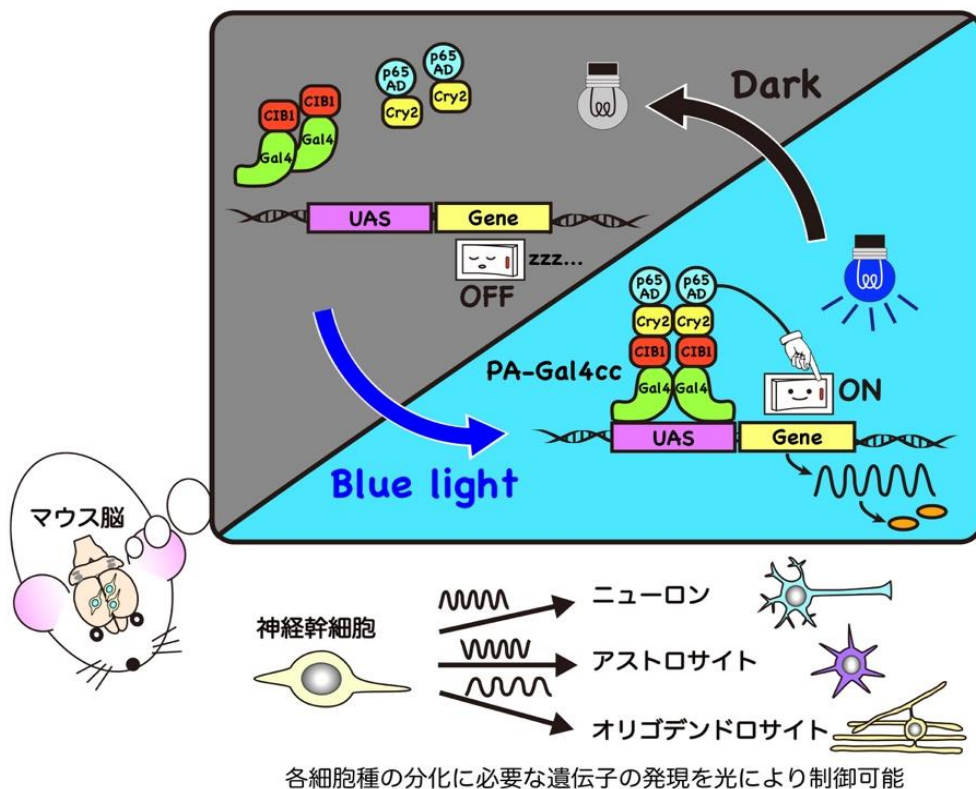
—発生・幹細胞研究への貢献に期待—

概要

京都大学大学院生命科学研究科 今吉格 教授と山田真弓 同特定助教らの研究グループは、哺乳類細胞において、「青色光」により遺伝子のスイッチ（遺伝子発現）を効率良くオン／オフできる新しい Gal4/UAS 誘導システム^{注1}を開発しました。

これまで酵母細胞などを用いて、光を利用した遺伝子発現制御技術が改良されてきましたが、哺乳類細胞では機能しない場合が多く存在しました。そこで本研究グループは、シロイヌナズナ由来の光受容体に着目し、それを従来の遺伝子発現制御技術である Gal4/UAS システムと組み合わせることによって、遺伝子発現のオン／オフを「青色光」で制御できる新しい技術の開発に成功しました。この技術（PA-Gal4cc 光作動性転写因子）を用いることにより、マウス脳の神経幹細胞などにおいて、遺伝子発現を光により効率良く制御できることが示されました。本研究によって、幹細胞の細胞増殖や細胞分化に関与する遺伝子のダイナミックな発現パターンを「光」によって人工的に操作することが可能となり、発生・幹細胞研究への貢献が期待されます。

本研究成果は、2020 年 8 月 26 日に米国の国際学術誌「iScience」にオンライン掲載されました。



発生・幹細胞研究への貢献に期待

1. 背景

脳を構成するニューロン（神経細胞）^{注1)} やアストロサイト、オリゴデンドロサイトなどのグリア細胞^{注2)} は、神経幹細胞から生み出されます。京都大学生命科学研究科 今吉格 教授と山田真弓 同特定助教らの研究グループでは、神経幹細胞に発現する転写因子^{注3)} に着目し、神経幹細胞の細胞増殖や細胞分化の過程で、これらの転写因子がダイナミックな遺伝子発現変動を示すことを見出してきました。しかし、この複雑な遺伝子発現変動の機能的な意義の大部分は未だ明らかになっていません。そこで、このような複雑な遺伝子発現パターンを人工的に制御し、その機能的意義を検証できる技術の開発が必要であると考えてきました。

そこで、本研究グループは、光の持つ時間的・空間的分解能の良さに着目し、「光」によって活性制御が可能な遺伝子発現制御法を開発できれば、より厳密な遺伝子発現の制御が可能になると考えました。従来、遺伝子発現制御法として、酵母由来の Gal4 タンパク質と、Gal4 が結合する UAS 配列を使用した Gal4/UAS システム^{注4)} が用いられており、ショウジョウバエやゼブラフィッシュなどで主に開発が進められてきました。本研究者はこれまで、神経幹細胞における転写因子の機能解析を行うために、光照射によって遺伝子発現のオン／オフを制御するシステムとして、光感受性の Gal4/UAS システムである人工転写因子 GAVPO を用いてきました。しかしながら、GAVPO では光照射しない暗所においても遺伝子発現の誘導活性が見られたり、光照射を止めても遺伝子発現のオンの状態が残っている、といった欠点がありました。

このような欠点を克服するために、本研究グループは、主に酵母細胞において開発されてきた様々な光依存性の遺伝子発現システムに着目し、哺乳類細胞における最適化を行いました。その中で、哺乳類細胞では、シロイヌナズナ由来の光受容体である Cry2 と、その結合パートナーである CIB1 が最も効率良く機能することを見出しました。これらは青色光照射によってヘテロ二量体（異なる 2 種の単量体が結合した分子）を形成します。すでに、哺乳類細胞において、Cry2-CIB1 システム^{注5)} を利用して「青色光」により遺伝子発現の制御が可能な手法が開発されていましたが(Pathak et al., 2017)、遺伝子発現の光誘導の効率において、改善の余地がありました。本研究では、光受容性タンパク質の組み合わせを数百種類も実施し、さらに転写活性化ドメイン^{注6)} の検討も実施したことにより、Cry2-CIB1 と Gal4/UAS システムを組み合わせ、より効率的に使用できる遺伝子発現の光制御システムの開発に成功しました。

2. 研究手法・成果

本研究者は、ヒト由来の HEK293T 細胞を用いて、「青色光」により効率良く駆動する Gal4/UAS システムの開発を試みました。まず、これまでに報告されていて光依存的に二量体の形成が誘導される様々な 2 種類のタンパク質（Cry2 と CIB1、TULIPs、Magnet、oLID と iLID の組み合わせなどの光作動性モジュール）と Gal4/UAS システムを組み合わせることを検討しました。例えば、CIB1 と転写因子（Gal4）の DNA 結合ドメインとの融合タンパク質をコードする遺伝子発現コンストラクト^{注7)} を作製し、一方で Cry2 と p65 タンパク質由来の転写活性化ドメイン（p65 AD）との融合タンパク質をコードする遺伝子発現コンストラクトを作製しました。光照射により両者の結合がうまくいくと、Gal4 は UAS 配列に結合し、UAS 配列の下流に人工的に配置した遺伝子（ホタルの発光タンパク質ルシフェラーゼなど）の発現がオンになる状態を観察できるような実験系を利用しました。また、光作動性モジュールの配置や組み合わせを変えて、多数のスクリーニングを繰り返した結果、哺乳類細胞で機能したのは、Cry2-CIB1 を使用した場合のみでした。さらに、Cry2 と CIB1 あるいはそれぞれの変異体の配置、安定性、細胞内局在、リンカー配列、アミノ酸置換などを詳細に検討して最適化しました。そして、GAVPO と比較して、暗所における遺伝子発現の誘導活性が低く、光に応答して誘導される遺伝子発現レベルが GAVPO と同程度あるいはそれ以上のものを 10 種類選択

し、PA-Gal4cc (Photo-activatable-Gal4) 光作動性転写因子（以下、PA-Gal4cc と省略）と名付けました（図 1A）。このシステムでは、Cry2 の変異体である Cry2PHR、Cry2 PHR(L348F)、Cry2 535 と、CIB1 の変異体である CIBN、CIB81 の組み合わせを変えて使用しています。この新たに開発した PA-Gal4cc は、従来の GAVPO と比較して、暗所における遺伝子発現誘導が起きにくく、かつ、光に応答して誘導される遺伝子発現レベルが大幅に増加しただけではなく、すでに報告されていた類似のシステムと比較して、光依存性の遺伝子発現レベルが増加しました（図 1B-E; Pathak et al., 2017）。

そこで、それぞれの PA-Gal4cc の特性を調べるために、PA-Gal4cc を一過性に発現させた培養細胞を用いて、光照射時間、光照射回数、光照射パルスを変えて、光依存的な遺伝子発現誘導の変化を観察した結果、PA-Gal4cc の種類によって傾向は異なるものの、光照射条件に依存して遺伝子発現を制御できることが分かりました。このことから、光照射条件を調整して遺伝子発現レベルをより精密に制御することができ、さらに PA-Gal4cc 10 種類の中から、目的に応じて最適なものを選択することが可能となりました。次に、光照射の間隔や UAS 配列の下流で発現する遺伝子の安定性を変化させることにより、人工的に様々な発現パターンを誘導することができました（図 1F）。また、光が持つ空間分解能の良さを利用して、単一細胞レベルで光照射を行ったところ、標的とした細胞の遺伝子発現のみを制御することにも成功しました。さらに、培養細胞だけではなく、発生期の脳内の細胞でも PA-Gal4cc は作動することが分かりました。マウス脳内の神経幹細胞に対して、エレクトロポレーション法（電気穿孔法）^{注8)}を用いて PA-Gal4ccE を導入し、LED パネルなどによる光照射によって遺伝子発現を制御することに成功しました（図 1G-I）。

以上の結果より、本研究で開発した PA-Gal4cc 光作動性転写因子を使用すれば、様々な遺伝子発現パターンを創生あるいは操作できることが明らかとなりました。この技術によって、脳の発生や神経再生の過程で転写因子が示す複雑な遺伝子発現パターンを人工的に操作することができ、その機能的意義を検証できると考えています。将来的にはモデル動物の脳内の神経幹細胞に PA-Gal4cc を適応して、発生・幹細胞研究や神経科学研究への貢献を期待しています。

3. 波及効果、今後の予定

様々な細胞の遺伝子発現を「光」により制御できる技術は、脳内での神経幹細胞の分化制御メカニズムの解明に有用です。また、この技術を用いることで、神経幹細胞の自己複製やニューロンあるいはグリア細胞への分化誘導を光で操作することが可能になるので、脳損傷や神経変性疾患に対する再生医療研究に貢献することが期待されます。さらに、本研究では、レンチウイルスベクター^{注9)}を用いて、PA-Gal4cc を哺乳類細胞に導入可能であることが分かりました。このことから、PA-Gal4cc 光作動性転写因子は、遺伝子治療に用いられているウイルスベクターと組み合わせることで、幹細胞や臓器を対象とした次世代の再生医療の新規戦略開発へ発展することも期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、「ニューロン新生による嗅覚神経回路可塑性の制御機構の解明」（若手研究(A)、課題番号：15H05570、代表者：今吉格）、「成体脳神経幹細胞の性質を制御する分子実体の解明」（若手研究(B)、課題番号：15K18362、代表者：山田真弓）、「成体脳のニューロン新生に関与する新規遺伝子の探索」（若手研究(B)、課題番号：17K14950、代表者：山田真弓）、「新規順行性神経標識法の確立と、それを用いた記憶神経ネットワークの解明」（若手研究(A)、課題番号：17H04984、代表者：平野恭敬）、「光遺伝学を用いた構成的アプローチによる細胞競合現象の解析」（新学術領域研究、課題番号：15H01489、代表者：今吉

格)、「遺伝子発現の光操作を可能にする機能性分子の開発(新学術領域研究、課題番号:16H01424、代表者:今吉格)、「生後脳神経新生を介した「個性」創発機構」(新学術領域研究、課題番号:16H06529、代表者:今吉格)、「記憶の固定化、および書き換えに寄与する新規予測誤差神経の探求」(新学術領域研究、課題番号:16H01274、代表者:平野恭敬)、「光応答性転写因子の脳神経回路研究への応用」(挑戦的萌芽研究、課題番号:26640011、代表者:今吉格)、「遺伝子発現の光操作技術を用いた神経幹細胞の制御機構の解析」(基盤研究(B)、課題番号:18H02449、代表者:今吉格)、日本学術振興会「卓越研究員事業」(研究者:今吉格)、公益財団法人「日本ワックスマン財団」(研究者:今吉格)、「細胞科学研究財団」(研究者:今吉格)、「東京生化学研究会」(研究者:今吉格)、および、科学技術振興機構(JST)戦略的創造研究推進事業 さきがけ「統合1細胞解析のための革新的技術基盤」(研究総括:浜地格 京都大学教授)における「三次元組織中における単一細胞レベルでの遺伝子発現動態操作法の開発と応用」(研究者:今吉格、 GrantナンバーJPMJPR14F3)、CREST「定量的光操作と計測技術を基軸とする生体深部の細胞応答ダイナミクスの解析」(研究総括:小澤岳昌 教授、課題番号:JPMJCR1752)、CREST「力学場と生化学場の相互作用の計測・操作と予測」(研究総括:今吉格、課題番号:JPMJCR1921)、「光操作技術を用いた神経幹細胞の新規分化制御法の開発」(日本医療研究開発機構(AMED)、課題番号JP18bm0704020、代表者:今吉格)、「ワイヤレス電力伝送システムを用いた新規神経回路光操作法の開発」(AMED 革新脳、課題番号:19dm0207090h0001、代表者:今吉格)の支援を受けて行われました。

<用語解説>

注1) ニューロン (神経細胞)

神経系を構成する細胞であり、細胞体・樹状突起・軸索を持つ。脳と脊髄を含む中枢神経系では、ニューロンは軸索末端を介して他のニューロンの樹状突起へと情報を伝達し、神経ネットワークを形成する。

注2) グリア細胞

神経系を構成するニューロンではない細胞の総称。グリア細胞は脳環境の恒常性の維持に寄与していると考えられてきたが、近年ニューロンの活動にも関与していることが示唆されてきた。

注3) 転写因子

DNA に特異的に結合するタンパク質の一群。DNA 上の転写を制御する領域に結合し、DNA の遺伝情報を RNA に転写する過程を制御する。

注4) Gal4/UAS システム

酵母由来の Gal4 転写因子と、その結合配列である UAS(Upstream Activating Sequence)を用いた遺伝子発現制御システムである。転写を活性化させる Gal4 タンパク質によって、UAS 配列下に導入した遺伝子の発現を制御することができる。

注5) Cry2-CIB1 システム

Cry2 はシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) が持つクリプトクロムと呼ばれる光受容体。Cry2 は青色光照射依存的に構造変化し、同じくシロイヌナズナ由来のタンパク質 CIB1 タンパク質に結合できるようになる。Cry2-CIB1 システムは、この性質を使用した、光依存的な二量体形成システムである。

注6) 転写活性化ドメイン

遺伝子の転写には RNA ポリメラーゼや転写因子等のタンパク質が必要である。転写活性化ドメインは転写因子の一部であり、転写に関わるタンパク質と結合して転写を活性化する。

注7) 遺伝子発現コンストラクト

対象の遺伝子を適切な宿主細胞に発現させるための遺伝子配列。プロモーター、発現させたい遺伝子、polyA鎖付加配列などからなる。

注8) エレクトロポレーション法（電気穿孔法）

電気パルスで細胞膜の透過性を上げて、DNA（プラスミド等）などの分子を細胞内に導入する手法である。

注9) レンチウイルスベクター

ヒトあるいはサル免疫不全ウイルス由来のベクター。二本鎖 DNA を、核膜孔を通過して染色体に組み込むことができるため、分裂細胞や非分裂細胞に外来遺伝子を発現させることができる。安全性を高めるため、元々のウイルス由来の修飾・制御遺伝子の機能と構造遺伝子を欠損させ、増殖能力等を欠損させてある。

<研究者のコメント>

脳の神経幹細胞に見られる転写因子のダイナミックな発現変動は、複雑な脳組織を構築する過程で重要な現象であると考えています。本研究では、このような遺伝子発現変動の機能的意義を調べるためにツールの開発に取り組みました。光応答性の転写因子を開発するためには、暗室の中でひたすら実験をする必要がありました。その甲斐もあって、哺乳類細胞で機能する PA-Gal4cc 光作動性転写因子の開発に成功できたことは感慨深いです。今後はさらに光操作技術の改良を行い、これまで解析が困難であった神経幹細胞の分化制御メカニズムの解明に取り組み、再生医療への貢献を目指したいと思います。



山田助教

<論文タイトルと著者>

タイトル：Optimization of light-inducible Gal4/UAS gene expression system in mammalian cells
(哺乳類細胞における、光作動性 Gal4/UAS 遺伝子発現制御システムの開発)

著者：Mayumi Yamada, Shinji C. Nagasaki, Yusuke Suzuki, Yukinori Hirano, and Itaru Imayoshi

掲載誌：iScience DOI：https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101506

< 参考図表 >

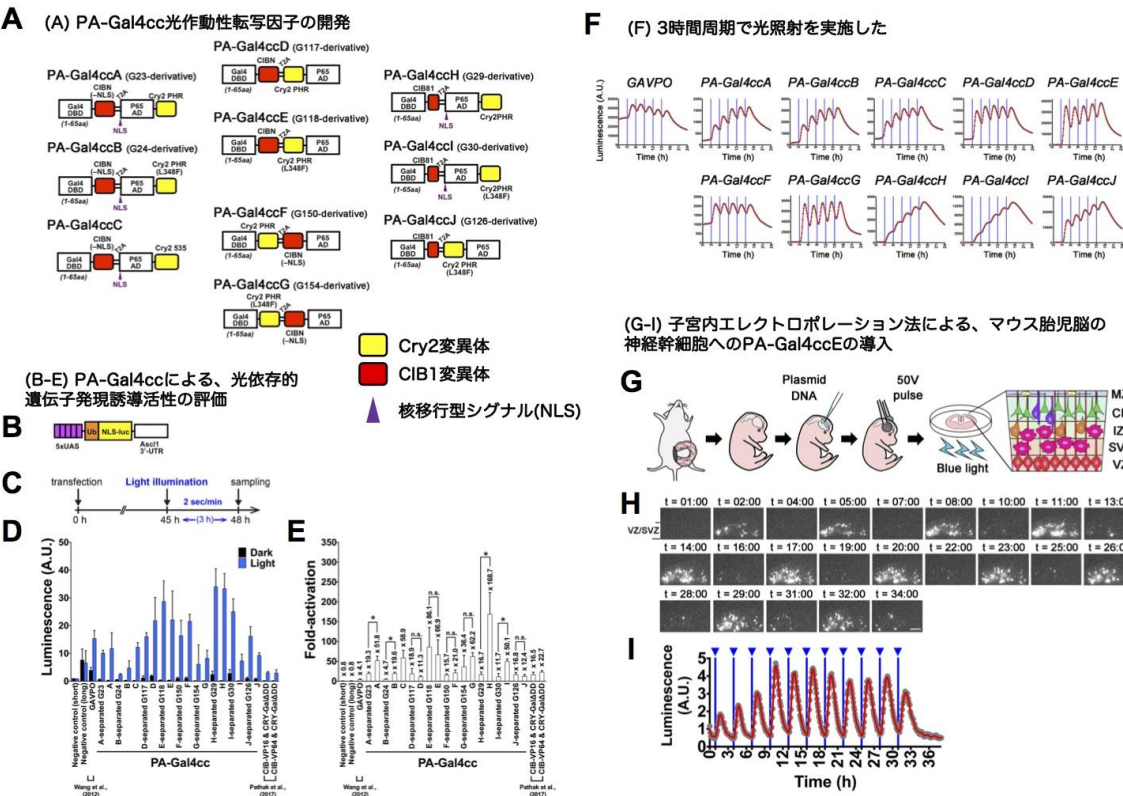


図 1 : PA-Gal4cc 光作動性転写因子の開発と応用例