

研究報告書

「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」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 今吉 格

1. 研究のねらい

統合1細胞解析を発生生物学研究や脳研究において実現するために、単一細胞レベルでの遺伝子発現動態の光操作系の確立を目指す。これまでの遺伝子発現の光操作技術に改良を加えるとともに、新規の光作動性転写因子を開発する。特に、哺乳類細胞で高効率で作動する遺伝子発現の光操作システムの改良・新規開発を目指す。また、二次元平面の細胞培養や、組織培養やモデル動物個体の三次元組織中に存在する細胞に対して、一細胞レベルの解像度を持って、光照射するための光学系の最適化と、遺伝子発現の光操作条件の最適化を目指す。単一細胞レベルでの遺伝子発現動態の光操作技術を成熟させることで、構成的アプローチに基づいた作動仮説の実証実験の新規手法として確立し、脳をはじめとした組織や動物個体の発生メカニズムの解明や、神経回路の可塑的性質の制御機構の解明につなげることを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

遺伝子発現の光操作システムを、様々な細胞や組織に導入するための、ウイルスベクターの最適化を行った。また、新たな遺伝子発現の光操作システムの開発を行った。これらの既存・新規の遺伝子発現の光操作システムを導入した培養細胞について、単一細胞レベルでの光活性化を誘導するための、光学系のセットアップの最適化を行った。また、三次元組織中の細胞における、単一細胞レベルでの遺伝子発現の光操作を可能にするため、二光子レーザーによる、光活性化の条件検討を行った。

(2) 詳細

「遺伝子発現の光操作システムの導入方法の最適化」について

レンチウイルスベクターとアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを中心に、遺伝子発現の光操作システムを、様々な細胞や組織に導入するための、ウイルスベクターの最適化を行った。プロモーターや mRNA 安定化配列の付加など発現コンストラクトの検証とともに、ウイルスベクターのセロタイプの検証や、蛍光タンパク質や抗生物質を用いた感染細胞の選別方法の最適化を行った。なるべく均一な光応答が広範囲の細胞において誘導できるような、細胞への導入方法の検証を行った。

「新規遺伝子発現の光操作システムの開発」について

これまで、VVD 光受容体を使用した人工転写因子 GAVPO を用いた光活性化型 Gal4/UAS

システム(PA-Gal4/UAS システム)を用いてきた。GAVPO が潜在的に持つ、暗所でのバックグラウンド活性を低減させ、哺乳類細胞においてより信頼性高く使用できるような、新規の遺伝子発現の光操作システムの開発を行った。

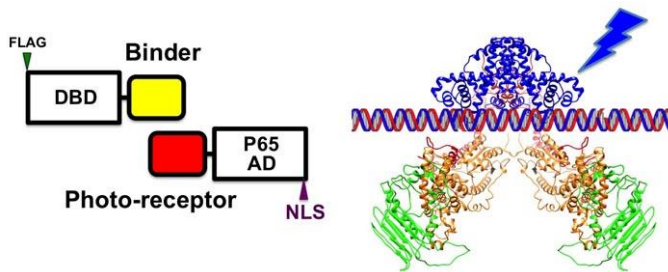


図 1: 新規の遺伝子発現の光操作システムの開発の模式図。様々な光依存的二量体形成モジュールを用いて、DNA 結合ドメイン(DBD)と転写活性化ドメイン(p65 AD)の結合を、光照射依存的に誘導する。

「二次元細胞培養系における、デジタルミラーデバイスを使用した、シングルセルレベル解像度での遺伝子発現の光操作」について

これまで、細胞培養ディッシュ全体の細胞や、顕微鏡視野内の細胞全体など、広範囲の細胞に対して光照射を行い、実験を実施していた。しかしながら、細胞間コミュニケーションの研究や、個々の細胞がもつ遺伝子発現のゆらぎの細胞間の同期やズレがもつ意義について検証を行うために、遺伝子発現の光操作技術を適応する場合は、シングルセルレベルでの解像度を持って、狙った細胞特異的に光照射を行い、照射細胞への影響を経時的に観察できるような実験系の確立が必要であった。

そのために、顕微鏡視野内の狙った任意の領域に、任意のタイミングで光照射することができる光学デバイスであるデジタルミラーデバイス(DMD)を使用した実験系を確立した。遺伝子発現の光操システムは、微弱な光に対しても感度よく応答するために、非照射領域への迷光の影響を最小限に抑えるために、光路の最適化が必要であった。本実験系は、GAVPO を用いた PA-Gal4/UAS システムをもちいて最適化を行ったが、新たに開発した新規の遺伝子発現の光操システムにおいても、同様に機能することが確認された。

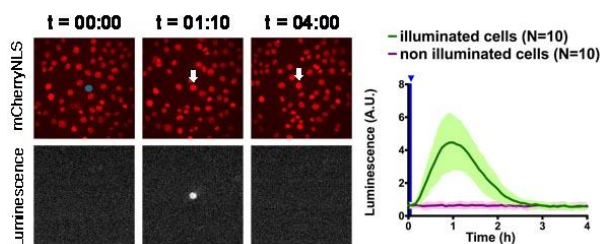


図 2: 遺伝子発現の光操作システムを導入した細胞に対して、青丸で表示した細胞に対して、光照射を行った。照射細胞特異的に、レポーター遺伝子であるホタルルシフェーゼの発現の上昇が確認された。

「遺伝子発現の光操作システムの二光子レーザーによる活性化」について

GAVPO を用いた PA-Gal4/UAS システムと、新たに開発した新規の遺伝子発現の光操システムについて、二光子レーザーによる活性化の可否と、最適波長や照射プロトコールについて検証をおこなった。多くの蛍光たんぱく質や、光活性化モジュールにおいて知られているよ

うに、遺伝子発現の光操作システムにおいても、通常の可視光光源による活性化とは異なる挙動が観察された。GAVPOについては、かなり広範囲波長の二光子レーザーによって効率の良い活性化が観察されたことから、今後、三次元組織中の遺伝子発現の光操作を二光子顕微鏡を用いて実施する場合には、現状の遺伝子発現の光操作システムの中では第一選択肢となり得ると考えられた。

3. 今後の展開

光駆動性のイオンチャネルやトランスポーターを用いた、ニューロンの神経活動の光操作に比べて、遺伝子発現の光操作技術の開発は大きく遅れていた。本研究では、哺乳類細胞で効率よく作動する、新規の遺伝子発現の光操作システムを構築することに成功した。この技術は、細胞生物学や発生生物学や神経生物学を中心に、これまで検証することが難しかったような遺伝子発現のゆらぎや、ダイナミックな変動の機能的意義を検証する際に、重要なツールとなることが期待される。さらに、デジタルミラーデバイスを用いた光限局照射技術と組み合わせることで、二次元細胞培養系においては、シングルセルレベルの解像度を持って、狙った細胞特異的に遺伝子発現動態を光操作することが可能になった。この技術は、これまで検証不可能であった空間・時間解像度にて、細胞間コミュニケーション研究や組織・個体発生の研究に使用可能な技術となると期待している。また、光作動性の転写因子の中には、二光子レーザーを用いて活性化できるものも存在することが明らかになった。今後、活性化条件を最適化することで、生体深部組織における、シングルセルレベルでの遺伝子発現の光操作が可能になると期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

デジタルミラーデバイスを用いた、二次元細胞培養系における、シングルセルレベルの解像度による遺伝子発現の操作技術については、安定して再現可能であり、今後、細胞間コミュニケーション研究や組織・個体発生の研究において、有用なツールとして提供可能であると考えている。また、新規に開発した遺伝子発現の光操作システムは、既存のシステムの欠点を克服できている部分もあり、こちらについても広範な分野の生物学研究にとって有用なツールとして提供可能であると考えている。さきがけ研究を実施している間に、所属の変更や新研究室の立ち上げなど、環境の変化はあったが、研究課題の進展は止めることなく実施することができ、今後、さきがけ研究で得られた知見・技術をさらに発展させて研究することができる研究チームを構築できたと考えている。遺伝子発現の光制御技術は、基礎生物学の新たな実験手法としてさらなる成熟と普及が期待されるが、再生医療を中心とした次世代の先端医療の基盤技術となることも期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバック、1期生成果評価会での総括・AD間での議論を踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

哺乳類細胞において低バックグラウンドで信頼性が高く単一細胞レベルで時空間的に遺伝子発現動態を制御できる光作動性人工転写因子の開発に成功しました。また、顕微鏡視野内の狙った領域に任意のタイミングで光照射することができる DMD を用いた実験系を確立しました。三次元組織中の細胞における単一細胞レベルでの遺伝子発現の光操作のための 2光子レーザーによる光活性化の条件検討も進んでいます。当初の目的は十分に達成しています。

今後は、研究成果を論文として発信して、これらの技術を世界にアピールすることにより、細胞間コミュニケーション、脳神経科学等の領域の生物学的課題の解析に応用・展開されることを期待します。さらに、本技術が広く普及し、de fact standard になることを期待します。

2017 年に日本神経科学学会 ジョセフ・アルトマン記念発達神経科学賞、2016 年度に日本神経学会奨励賞と文部科学大臣賞若手科学者賞を受賞しました。また、国内外で多くの講演に招待されており、その研究内容、業績は高く評価されています。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Suzuki, Y. and Imayoshi, I. PLoS One (2017) Network analysis of exploratory behaviors of mice in a spatial learning and memory task. Jul 10;12(7):e0180789. |
| 2. Imayoshi, I., Ishidate, F. and Kageyama, R. Frontiers in Cellular Neuroscience (2015) Real-time imaging of bHLH transcription factors reveals their dynamic control in multipotency and fate choice of neural stem cells. |
| 3. Furutachi, S., Miya, H., Watanabe, T., Kawai, H., Yamasaki, N., Harada, Y., Imayoshi, I., Nelson, M., Nakayama, K., Hirabayashi, Y. and Gotoh, Y. Nature Neuroscience (2015) Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. 18: 657-665. |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件。

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主な学会発表

- 1: 第 40 回日本神経科学大会 シンポジウム 2017 年 7 月 22 日 幕張メッセ
- 2 第 40 回日本神経科学大会 ジョセフ・アルトマン記念発達神経科学賞受賞記念講演
2017 年 7 月 21 日 幕張メッセ
- 3: 第 12 回上原国際シンポジウム「Meke Life Visible」シンポジウム 2017 年 6 月 12 日
ハイアットリージェンシー東京
- 4 9th IBRO World Congress on Neuroscience – IBRO2015 シンポジウム 2015 年 7 月 7 日
ブラジル・リオデジャネイロ
- 5: ISDN2016 (International society of developmental neuroscience congress 2016)
2016 年 5 月 11 日 フランス・アンティープ

受賞

- 1: 文部科学大臣賞若手科学者賞 (2016 年 4 月)
- 2: 日本神経学会奨励賞 (2016 年 7 月)
- 3: 和歌山県橋本市文化奨励賞 (2016 年 11 月)
- 4: 日本神経科学学会 ジョセフ・アルトマン記念発達神経科学賞 (2017 年 7 月)

著作物

今吉 格 「神経幹細胞の増殖・分化の光制御と生後脳・成体脳ニューロン新生」、
『ブレインサイエンス・レビュー 2017』、ISBN: 978-4-87805-150-0