

## 「光による胚発生の時空間制御技術の開発 - 1 細胞追跡と遺伝子操作」

研究期間：2020年11月～2023年3月

研究者：森川 久未

## 1. 研究のねらい

発生などの多細胞生物の生命現象の解明には、細胞間の相互作用を三次元空間において時間軸の変化などを考慮しながら解析することが必須である。しかしながら、従来の発生学の解析手法は時空間の分解能に限りがあり、発生現象において、同一細胞を連続して追跡することができないという問題点がある。この課題を解決するために、本研究では、光遺伝学技術を利用する。光照射は、msec 単位・オルガネラレベルで制御可能であることから、光照射により遺伝子改変や細胞の制御をおこなう光遺伝学は、発生といった連続する生命現象の解明に非常に相性が良い解析手法である。これまでの我々の研究から、発生・遺伝学解析で多用される遺伝子改変技術である Cre-*loxP* 組換えを青色光照射により制御することができている。我々はこれまでに、光操作型 Cre 組換え酵素 (Photoactivatable Cre recombinase: PA-Cre) を搭載した PA-Cre3.0 マウスを樹立してきた (Morikawa K, et al. *Nat Commun.* 2020)。

そこで本研究では、PA-Cre3.0 を用いて、光照射の特性を利用した時空間精度の高い、発生解析手法の確立を目指す。特に、マウス初期胚とヒト多能性幹細胞 (ヒト iPS 細胞) を対象にし、発生や分化誘導過程で、時空間を限定した細胞系譜の追跡技術と遺伝子ノックアウト技術を開発し、新しい初期発生の光制御型解析システムの構築、およびそれらの技術を応用したヒト疾患の病態モデルの作製をねらいとしている。

## 2. 研究成果

## (1) 概要

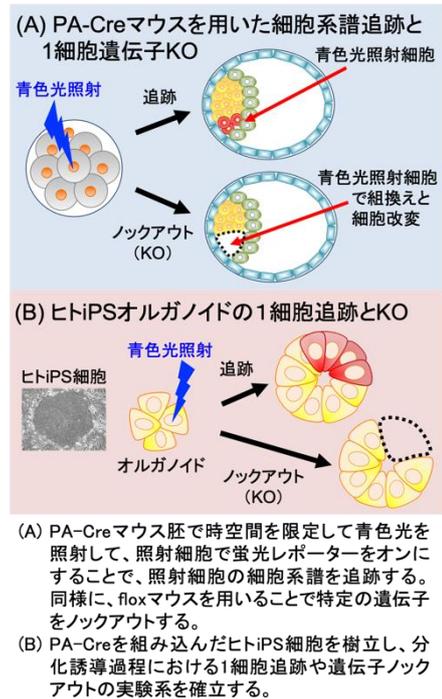
本研究では、光操作型 Cre 組換え酵素 (PA-Cre) を用いて、時空間を厳密に制御した、新たな発生学の解析手法の確立を目標としている。特にマウス初期胚とヒト iPS 細胞を対象として、単一細胞レベルで時空間特異的に細胞系譜追跡と遺伝子のノックアウトができる発生解析システムの構築を目指す。この目標を達成するために、研究期間内において、(A) マウス初期胚における単一細胞レベルでの細胞系譜追跡と遺伝子ノックアウトと、(B) ヒト iPS 細胞における PA-Cre 発現細胞株の樹立とオルガノイドを用いたヒト発生機構の解明をおこなってきた (図 1)。

(A) PA-Cre マウスの初期胚に、青色光の照射実験を行った。その結果、青色光照射細胞においてのみ、Cre-*loxP* 組換えと組換えにより誘導される赤色蛍光タンパク質の発現を確認している。また、Hippo シグナルの胚発生における機能解析のため、YAP/TAZ-flox (flox: 欠損させたい遺伝子の両端への lox 配列の組み込み) マウスを導入し、PA-Cre マウスとの交配によって、YAP/TAZ 遺伝子の光操作型ノックアウトが可能なマウスホモ個体の作製を行った。

(B) PA-Cre を恒常発現するヒト iPS 細胞株の樹立に成功した。この iPS 細胞株では、青色光照射により、当初の計画通りに、PA-Cre の活性化と Cre-*loxP* 組換えをおこなうことができ、組換えにより赤色蛍光タンパク質が誘導され、細胞追跡が可能となることが判明した。さらに、この PA-Cre 発現ヒト iPS 細胞株を用いて、ゲノム編集法により、HCN4 遺伝子の片遺伝子座を flox 化したヒト iPS 細胞株の樹立に成功した。この株では、青色光照射により、lox 配列間での組換えによる HCN4 ノックアウトがおこることを PCR により確認した。このように、ヒト iPS 細胞で光制御型遺伝子ノックアウトの手法を確立した。

以上の成果より、光操作ツール PA-Cre をマウス初期胚やヒト iPS 細胞へ応用し、新たな発生・疾患研究の研究手法を開発、実証することができた。

図1: 本研究の概略



## (2) 詳細

研究テーマ A「マウス初期胚における単一細胞レベルでの細胞系譜追跡と遺伝子ノックアウト」

### 1. マウスの導入と繁殖、初期胚実験系の立ち上げと青色光照射時の発生確認

研究に必要な以下のマウス系統の導入を行い、順次繁殖を開始した。The Jackson Laboratory から PA-Cre A20 マウス (JAX# 033544)、PA-Cre B4 マウス (JAX# 033545)、YAP/TAZ-flox マウス (JAX# 030532)、理研 BRC から R26GRR レポーターマウス (RBRC04874)、CAG-FLPe (RBRC01834)、CAG-Cre (RBRC01828) の計 6 系統を導入した。これらの系統から交配により、実験に必要な系統を作製している。

E1.5、2.5、3.5 日の初期胚の採取方法と培養系を立ち上げた。これにより、E1.5-E4.5 日胚までの培養が可能となるとともに、培養後胚の免疫染色が可能となった。さらに、初期胚を用いて、青色光照射時の光毒性・発熱の影響を調べた。結果、培養細胞で PA-Cre が作動する条件において、発生が正常に進行することを確認している。

### 2. マウス初期胚での青色光照射による Cre-*loxP* 組換えの確認と細胞系譜追跡

マウス初期胚において、青色光照射によって PA-Cre を活性化し、Cre-*loxP* 組換えを引き起こして、下流の赤色蛍光を発現し、細胞系譜を追跡できるかどうか検証した。研究計画当初に予定していたマウス系統で、青色光を照射した場合には、Cre-*loxP* 組換えと、それに続く赤色蛍光 (mKate2) の発現は全く見られなかった。そこで、考えられるトラブルシューティングを順次行い、結果、用いるマウス系統を変更した場合で、Cre-*loxP* 組換えに成功することができた。E1.5 の初期胚を回収後、E2.5-3.5 にかけて 24 時間青色光照射をおこなったところ、青色光照射直後の E3.5 日胚で Cre-*loxP* 組換えによる赤色蛍光タンパク質が核局在している細胞を顕微鏡で検出することができた。さらに、E4.5 日胚へと発生していく段階で、赤

色蛍光陽性細胞が増殖・分化していく様子を観察することもできている。一方で、暗所群では、赤色蛍光タンパク質は全く検出されなかった。さらに、青色光照射時間の短縮を試みた結果、現状では6時間までの照射時間の短縮に成功している。

以上の結果より、マウス初期胚において、青色光照射による Cre-*loxP* 組換えと、細胞系譜追跡が可能であることを確認できた。さらに、これらの結果をまとめて、現在論文投稿中である。さらに、青色光の照射時間と範囲を限定する条件検討をおこなうと共に、初期胚のタイムラプスイメージング実験系の立ち上げを試みている。

研究テーマB「ヒト iPS 細胞における PA-Cre 発現細胞株の樹立とオルガノイドを用いたヒト発生機構の解明」

#### 1. PA-Cre 恒常発現 iPS 細胞株の樹立と青色光照射による細胞追跡

まず、ヒト iPS 細胞で PA-Cre を恒常発現するための発現ベクターを作製した。PA-Cre3.0 遺伝子 (Morikawa K, et al. *Nat Commun.* 2020) を含み、また細胞追跡用の赤色蛍光タンパク質のカセットを含んだ恒常発現ベクターを作製し、ヒト iPS 細胞へ遺伝子導入した。クローニングした細胞株で青色光照射のスクリーニングを行い、最も組換え効率が高く、暗所時での自発的組換え (Dark Leak) の見られなかった株を以降の解析に用いることにした。次に樹立した細胞株で、未分化状態と、心筋分化誘導時における青色光照射による細胞系譜追跡を検証した。青色光照射を行うと、照射終了直後から赤色蛍光の発現が見られた。その後、心筋分化誘導を続けると、拍動する心筋細胞で赤色蛍光陽性細胞を確認できている。

以上の結果から、樹立した PA-Cre 恒常発現細胞は、細胞系譜追跡実験に利用可能であることが判明した。これらの結果についても現在、論文にまとめている。さらに、iPS 細胞においても、青色光の照射時間と範囲を限定する条件検討をおこなうと共に、タイムラプスイメージング実験系を立ち上げている。

#### 2. flox-iPS 細胞株の樹立と青色光照射による遺伝子ノックアウト

ヒト iPS 細胞において、青色光照射による HCN4 遺伝子 (HCN4 エクソン 2) ノックアウトの実験系を確立し、心筋細胞に重要な遺伝子を時空間特異的にノックアウトできる系の確立を目指した。両 HCN4 アレルのノックアウトを行うために、2 種類の flox ベクターを作製し、これを 1. で樹立した PA-Cre 恒常発現 iPS 細胞へ遺伝子導入し、ノックイン細胞株を樹立した。次に、樹立した細胞株で青色光照射による遺伝子ノックアウトの検証を行った。青色光照射後の細胞からゲノム DNA を精製し、PCR で flox-HCN4 アレルの組換えの確認を行った。結果、loxP 間の遺伝子配列 (HCN4 エクソン 2) の除去が確認できた。以上より、ヒト iPS 細胞における光照射による遺伝子ノックアウトの実験系を確立することに成功した。現在、もう片方の遺伝子座への loxP 配列のノックインを進めると共に、樹立した片遺伝子座の flox-iPS 細胞を用いて、心筋細胞の拍動について表現型を解析中である。

したがって、本研究の成果から、マウス初期胚やヒト iPS 細胞においても光遺伝学ツール: PA-Cre による光操作が可能であることが実証された。今後、これらの資材を用いてマウス初期発生研究や、ヒト iPS 細胞を用いた発生研究、疾患研究などのヒト生物学を大きく進めていくことができると期待される。



### 3. 今後の展開

本研究の最終目標は、哺乳類の生体深部とヒト iPS 細胞において、時空間を自由自在に、遺伝子発現や細胞機能・状態を制御する手法を確立することである。その第一歩として、ACT-X 研究で、光透過性の高いマウス初期胚やヒト iPS 細胞を対象として研究をおこなってきた。成果として、現在までに、これらの発生・分化過程における、光照射による遺伝子組換え手法を確立してきた。今後は、本 ACT-X 研究中に完了できなかったいくつかの点について、引き続き研究をおこなう予定である。1) 光照射の特性を生かした時空間特異的な遺伝子改変手法の確立。2) 光照射による遺伝子ノックアウトの完遂と発生・疾患解析。1) に関しては、1 細胞～部位特異的に Cre-*loxP* 組換えを引き起こす手法を確立していく。青色光の照射時間と強度について比較検討を行い、最適化を図る。2) については、マウス初期胚での光による時空間特異的遺伝子ノックアウトを進めると共に、樹立した flox-iPS 細胞株を用いた疾患の再現を行う。将来的には、時空間特異的遺伝子改変術の長所を生かした疾患モデル動物・iPS 細胞の開発と病因・病態の解明や創薬応用をおこなっていききたい。社会実装へのタイムラインは、今後 5 年を目処に、光照射による遺伝子改変術を実験室内レベルでのリサーチツールとしての汎用性を高め、特許、細胞特許やノウハウ登録をおこなう。ここから、企業(研究試薬販売会社等)との共同研究を開始し、リサーチツールとして商品化できるように開発を進め、7 年後までに販売にこぎ着けたい。しかし、リサーチツールは使ってもらってこそ価値があると考えているため、良いツール(ベクターや細胞、マウス系統)が完成できれば、国内や海外のバンク(理研 BRC や Addgene、The Jackson Laboratory など)に寄託することも考えている。

### 4. 自己評価

本研究から、マウス初期胚やヒト iPS 細胞など、これまで PA-Cre が応用されていなかった新たな資材で光照射による Cre-*loxP* 組換え技術を確立したことは評価したい点であると考えている。特に、ヒト iPS 細胞の flox 細胞株の樹立による光遺伝子ノックアウト実験を立ち上げたことにより、これを使用したヒト疾患研究が進むことが大きく期待される。一方で、確立した技術を用いて、実際の生命現象の解明を研究期間内に遂行完了まで至らなかったことは、反省すべき点であると考えている。これは、COVID-19 による出勤制限などにより、研究初期の立ち上げに想定外の時間を要した点が最大の原因であるが、この他にも研究の進め方、見通し等に見直すべき点があることを真摯に受け止め、今後に生かしたいと考えている。今後、引き続き研究を継続し、1 細胞光照射手法の確立と細胞系譜追跡による新たな発生機構の解明、遺伝子ノックアウトによる生命現象の解明へつなげ、原著論文や学会発表等の形で発表していきたい。

また、ACT-X 研究での実験系の立ち上げや研究結果を元にして、複数の公的研究費を獲得し、人員を増やして、自身のグループを立ち上げることができた。これは研究を推進するうえでも、私が研究者として個を確立するうえでも、大きな礎になったと捉えている。さらに、ACT-X 領域会議やオンラインでの交流会を通して、様々な研究分野の研究者、特にこれまで交流の少なかった化学分野の若手研究者たちとネットワークを構築できたことは、ACT-X 研究の大きな成果でもある。これからの研究人生で、このネットワークを生かした多領域間での共同研究を展開していきたい。



## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

### (2) 特許出願

研究期間全出願件数:0件(特許公開前のものも含む)

### (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)

1. 「光操作技術 PA-Cre による発生解析アプリケーションの開発」、森川久未、第 44 回 日本分子生物学会年会・ポスター発表 (2021 年 12 月 1 日)
2. 「光遺伝学技術:PA-Cre3.0 による生命現象の時空間解析手法の確立」、森川久未、第 20 回 産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会・ポスター発表 (2022 年 6 月 28 日)
3. 「光遺伝学手法:PA-Cre3.0 によるヒト iPS 細胞・初期発生の遺伝子操作技術の開発」、森川久未、孫略、第 45 回 日本分子生物学会年会・ポスター発表(2022 年 12 月 1 日)
4. 「求む!光操作の介添者」、森川久未、第 1 回化学未来生命材料研究会(2022 年 12 月 28 日)