

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19357

研究課題名(和文) Tet-Lightシステムによる光分子遺伝学の構築と睡眠覚醒制御への応用

研究課題名(英文) Development of opto-molecular genetics by Tet-Light system and its application to sleep-wake regulation

研究代表者

丹羽 康貴 (Niwa, Yasutaka)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教

研究者番号：40590071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では研究代表者らが開発したTetシステムのリプレッサーであるtTRを光感受性に改良することで、Tetシステムの遺伝子発現制御を光によって時間的にコントロールできるTet-Lightシステムの構築を試みた。研究期間内に、培養細胞系を用いたTet-Lightシステムの構築を行い、その時間変化を明らかにすることができた。また、in vivoでの睡眠覚醒異常を示し、Tet-Lightシステムでのレスキュー実験に有用なOrexin-iCreノックインマウスの樹立に成功した。今後はこのマウスを使用してTet-Lightシステムのin vivoでの動作確認および有効性を検証していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個体の行動の中には、神経活動に依存した速い制御だけでなく、睡眠覚醒行動で見られる睡眠負債のようなゆっくりとした細胞生物学的機能の変化がその制御に大きく関わっていると予想されるものも少なくない。そのため従来の光遺伝学による神経活動操作から一歩階層を深めた、遺伝子発現制御を介した細胞内分子の操作、すなわち分子遺伝学的手法が求められている。本研究で構築したTet-Lightシステムは光制御による分子遺伝学的手法を可能にする。今後、Tet-Lightシステムは神経細胞の細胞生物学的機能と個体の行動との間の因果関係を明らかにしていく有効なツールになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to construct a Tet-Light system that can temporally control gene expression of the Tet system by photosensitizing tTR, a repressor of the Tet system developed by us. During the research period, we constructed a Tet-Light system using a cultured cell line and were able to clarify the kinetics. We also succeeded in establishing Orexin-iCre knock-in mice, which show in vivo sleep-wake abnormalities and are useful for rescue experiments using the Tet-Light system. In the future, we will use this mouse to verify the in vivo operation and effectiveness of the Tet-Light system.

研究分野：睡眠医科学

キーワード：Tet-Lightシステム Orexin-iCre

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

藻類由来のタンパク質であるチャンネルロドプシンは、青色光が当たると外部からナトリウムイオンを取り込むその性質により、哺乳動物の特に神経細胞を刺激する光スイッチとして利用できることが分かり、神経科学の研究手法を一新し、光遺伝学という分野を切り開くことになった。その光遺伝学が対象とするのは神経細胞の主に神経活動の操作であり、神経回路を描出する研究や、神経回路と個体の行動の因果関係を探る研究の発展には大きく貢献していた。一方で、個体の行動の中には、神経活動に依存した速い制御だけでなく、睡眠覚醒行動で見られる睡眠負債のようなゆっくりとした細胞生物学的機能の変化がその制御に大きく関わっていると予想されるものも少なくない。そのため神経細胞の細胞生物学的機能と個体の行動との間の因果関係を探るためには、従来の神経活動操作から一步階層を深めた、遺伝子発現制御を介した細胞内分子の操作、すなわち分子遺伝学的手法が求められていた。

2. 研究の目的

マウス個体における遺伝子発現制御を介した細胞内分子の操作として Tet システムがうまく機能することが分かっている。Tet システムではドキシサイクリンの添加によって遺伝子発現制御を時間的にコントロールすることが可能だが、個体での時間解像度は日～週のオーダーであり、光遺伝学的手法に比べてかなり長い。研究代表者らはこれまでに Tet システムの強力なリプレッサーである tTR を開発し、それを用いた遺伝学的なレスキュー実験を行うことで、睡眠覚醒異常をもたらす責任細胞タイプの同定に成功していた(Niwa et al. 2018)。そこで、本研究ではこの tTR を光感受性に改良することで、Tet システムの遺伝子発現制御を光によって時間的にコントロールできる Tet-Light システムを構築する。さらに、それを睡眠覚醒異常のレスキュー実験に適用することで、Tet-Light システムの in vivo での有効性を初めて示すことを目的とする。

3. 研究の方法

Tet システムの遺伝子発現制御を光によって時間的にコントロールできる Tet-Light システムを構築し、in vivo での有効性を示すために以下の実験を行う。

(1) 大腸菌由来の遺伝子発現制御系 Tet-off システムを改良し、青色光依存的に制御可能な Tet-Light システムを、培養細胞系を用いて構築する。

(2) Tet-Light システムを脳内神経細胞に導入して、睡眠覚醒制御ペプチドであるオレキシンの発現を光依存的に誘導し、オレキシン KO マウスのナルコレプシー様症状を光依存的に回復させる。

4. 研究成果

(1) 研究代表者らが開発した Tet システムのリプレッサーである tTR に対して、光感受性の核外移行シグナル LEXY 配列 (Niopak et al. 2016) を融合した tTR-LEXY を発現するベクターを作製した。これによって非照射時は tTR-LEXY が核内にとどまり Tet システムによる遺伝子発現はオフとなる。一方、光照射時には tTR-LEXY が核外に移行し、Tet システムによる遺伝子発現がオンになると考えられる。そこで培養細胞 HEK293T にルシフェラーゼを誘導する Tet システムとともに、tTR もしくは tTR-LEXY をトランスフェクションし、青色光照射を行ったところ、tTR-LEXY を加えた時のルシフェラーゼ活性比 (照射/非照射) はそれ以外の場合に比べて 10 倍以上高かった (図 1)。さらに、Tet システムと tTR-LEXY を含めた Tet-Light システムの時間解像度を調べるために、ルシフェラーゼ活性の時間変化を経時的に観察したところ、基準のルシフェラーゼ活性に対して、30 分の青色光照射によってその後約 60 分の上昇を観察することができた (図 2)。

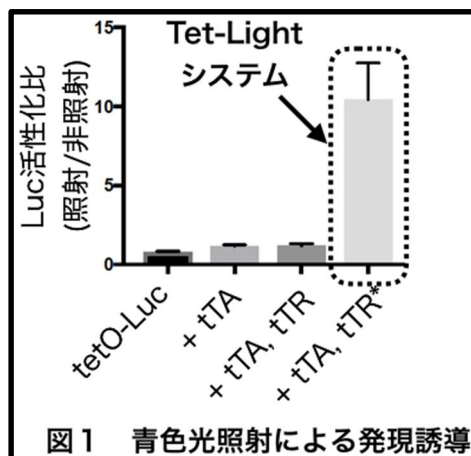


図1 青色光照射による発現誘導

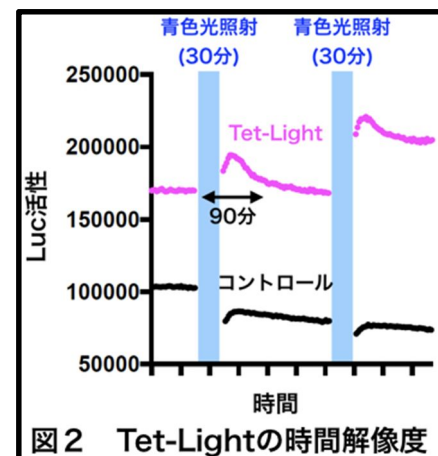


図2 Tet-Lightの時間解像度

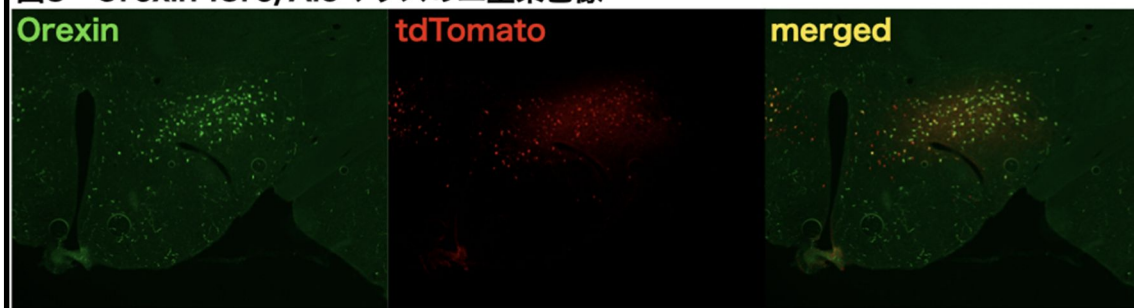
(2) オレキシン遺伝子を欠失したマウスはナルコレプシー様症状を示すことが知られている。しかし、このマウスのオレキシン神経に対して特異的に遺伝子を導入するツールがなかった。そ

ここで、オレキシン遺伝子の開始コドン直下に iCre を挿入したノックインマウスの作製を試みた。このマウスはナルコレプシー様症状を示すと同時に、アデノ随伴ウイルス(AAV)によって iCre を発現するオレキシン神経特異的に遺伝子導入することができる。そのため、ナルコレプシー様症状がレスキューされたかどうかを確認することで、Tet-Light システムによるオレキシンの発現誘導が十分にできたかどうかを確認することが可能になる。

オレキシン遺伝子開始コドン付近に gRNA を設計し、CRISPR/Cas9 およびターゲティングベクターとともに受精卵に導入し、2系統のノックイン系統を得た。そのうち1系統は非特異的な遺伝子の挿入が見られたため除外し、1系統のオレキシン iCre ノックインマウスを樹立することができた。このマウスを Cre レポーター系統である Ai9 系統と交配し、視床下部外側野における Orexin とレポーター(tdTomato)の発現を免疫組織化学によって調べた。その結果、Orexin に対する染色が見られる細胞では tdTomato に対する染色が観察された(図3)。また、Orexin に対する染色が見られない細胞にも一部 tdTomato に対する染色が観察された。おそらくこれらは過去に Orexin を発現した細胞であると予想される。また、Orexin-iCre マウス同士を交配し Orexin-iCre ホモマウスを作製した。これまでの知見から、このマウスでは Hcrt/Orexin 遺伝子が欠失することでナルコレプシー様症状を示すと予想される。実際に Orexin-iCre ホモマウスの睡眠覚醒行動を調べてみると、ナルコレプシーに特徴的なカタプレキシー(情動脱力発作)が観察された。

以上(1)(2)より、培養細胞系で Tet-Light システムを確立し、それを睡眠覚醒行動に適用するための Orexin-iCre マウスを樹立することができた。今後はこのマウスを使用して実際に Tet-Light システムをオレキシン神経に導入し、カタプレキシーが回復するかを検証することで、Tet-Light システムの in vivo での有効性を検証していく。

図3 Orexin-iCre/Ai9マウスの二重染色像



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Niwa Y., Ueda H.R., Sakurai T.
2. 発表標題 Cholinergic regulation of sleep-wake states in mice
3. 学会等名 RIKEN BDR symposium 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丹羽康貴
2. 発表標題 睡眠はどこまで削れるか：マウス遺伝学を用いたアセチルコリンによる睡眠覚醒制御の理解
3. 学会等名 定量生物学の会第九回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Niwa Y., Ueda H.R., Sakurai T.
2. 発表標題 Cholinergic regulation of sleep-wake states in mice
3. 学会等名 第4回AMED若手研究者ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Niwa Y.
2. 発表標題 Establishment of in vivo cell separation method without losing the function in mice
3. 学会等名 The All-RIKEN Workshop 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丹羽康貴
2. 発表標題 遺伝学を駆使して睡眠を理解する
3. 学会等名 リバネス超異分野学会大阪フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丹羽康貴
2. 発表標題 遺伝学的手法によって生体の構造及び行動と分子を結びつける
3. 学会等名 NIPS-ARIHHP共同ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Niwa Y., Obo H., Wess J., Ueda H.R., Sakurai T.
2. 発表標題 Molecular and cellular understanding of cholinergic regulation of sleep-wake states
3. 学会等名 Neuro 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Niwa Y.
2. 発表標題 Genetic identification of cholinergic mechanisms of controlling sleep and wakefulness
3. 学会等名 World Sleep 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丹羽康貴, 於保拓高, Jurgen Wess, 上田泰己, 櫻井武
2. 発表標題 覚醒制御システムから眠気の分子実体を紐解く：アセチルコリンによる睡眠覚醒制御の分子遺伝学的解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----