

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871140

研究課題名(和文) 多能性幹細胞塊から細胞の種類と配置を制御して多種細胞集合体へ分化させる方法の確立

研究課題名(英文) Development of the method for controlling stem cell fate

研究代表者

小笠原 慎治(Ogasawara, Shinzi)

北海道大学・創成研究機構・特任助教

研究者番号：50462669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞に光を当ててタンパク質の生産を開始させたり停止させたりするオリジナルの技術を使って、細胞集団のレーザーで狙った1個の細胞だけを神経細胞に変化させることに成功しました。この手法を発展させ組織の三次元培養と併用すればiPS細胞などの多能性幹細胞の塊から細胞の種類と位置を人工的に操作し組織を作り上げることができると期待されます。

研究成果の概要(英文)：The use of light as an external stimulus offers the potential for spatiotemporal control and is thus ideal for controlling protein expression in living cells. We have developed a reversible method for regulating protein expression using a photoresponsive-cap that can control the translation of mRNA in a reversible manner by triggering the cis-trans photoisomerization of the cap. We succeeded in controlling the amount, timing and duration of protein expression in living mammalian cells. Additionally, neuronal differentiation of PC12 cells was photo-induced by controlling constitutively active H-Ras 61L protein expression.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：光遺伝学 mRNA 翻訳 細胞分化 再生医療

1. 研究開始当初の背景

再生医療の究極的な目標は、臓器を丸ごと再生し移植することである。そのためには神経、筋肉、上皮細胞など多種類の細胞から成る組織をどのようにして作り上げるのかといった問題を解決しなくてはならない。現時点では、一種類ごとに多能性幹細胞 (ES 細胞、iPS 細胞) から分化誘導し、後でそれらの細胞を接着するという戦略が有力である。しかし、望みの種類の細胞を望みの場所に正確に配置し接着することは困難である。そこで、細胞を後から接着するのではなく、生物の発生を模倣して一つの多能性幹細胞塊から同時かつ協調的に多種類の細胞へ配置を制御して分化誘導する方が自然に近く理想的である、と申請者は考えている (図 1)。それを実現するには、多能性幹細胞塊の細胞個々に異なった分化誘導条件を与える方法が必要である。

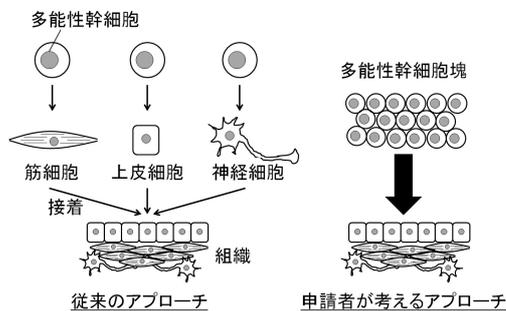


図 1 多能性幹細胞の塊から組織を作製

2009年、京都大学の影山らは Hes-1 というタンパク質がマウス ES 細胞の分化の方向性を決めておりと報告した。Hes-1 は約 4 時間周期で発現の増減を繰り返しており、その発現量によって神経細胞に分化するのかが中胚葉に分化するのかが決定される、と云うのである。つまり、多能性幹細胞塊の細胞個々に異なった分化誘導条件を与えるには、Hes-1 の発現量や発現周期を細胞個々で操作すればよく、それを可能にする方法を申請者は最近開発することに成功した。

その方法とは、mRNA からタンパク質への翻訳を可逆的に光制御する“翻訳の可逆的光制御法”である。mRNA の 5'-末端に位置し翻訳の開始を司る 7-メチルグアノシン (cap 構造) を *cis-trans* 光異性化するように改変した (以後、光応答性 cap と呼ぶ)。すると、光応答性 cap が *cis* 体の時のみタンパク質が発現するようになる。この方法を使うと、光の照射量でタンパク質の発現量を調節したり、2つの波長の光を交互に照射することによって発現の周期を制御することができる。この“翻訳の可逆的光制御法”を使えば、Hes-1 の発現量および発現周期を多能性幹細胞塊の細胞

個々で独立して操作し、異なった分化誘導条件を与えられると考え本課題の着想に至った。

2. 研究の目的

申請者は最近、mRNA からタンパク質への翻訳を可逆的に光制御できる“翻訳の可逆的光制御法”を開発し、生きた細胞内でタンパク質の発現量および発現周期を操作することに成功した。本課題では“翻訳の可逆的光制御法”を使い、Hes-1 やその他分化誘導因子の発現量や発現周期を細胞集団の細胞個々で独立に操作し、細胞の種類および配置を制御して分化させる方法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 本課題に必要な材料 (可視光領域の光で異性化する光応答性 cap、RNase 耐性型 mRNA 配列) を作製する。

可視光領域の光で異性化する光応答性 cap の開発

現在の光応答性 cap は *trans* 体から *cis* 体への異性化は 405 nm の光で、*cis* 体から *trans* 体への異性化は 310 nm の光で起こり、特に 312 nm の繰り返し照射は細胞に大きなダメージを与える。そこで、細胞にダメージを与えない可視光領域の光で異性化させられる新規光応答性 cap を開発する。具体的には、申請者が以前開発した 460 nm の光で *trans* 体から *cis* 体へ、550 nm の光で *cis* 体から *trans* 体へ異性化するグアノシン誘導体の 7 位をメチル化し、さらに三リン酸を介しグアノシンと結合させたダイヌクレオチドを合成する。合成した光応答性 cap の各種特性 (吸収波長、異性化率、熱的安定性) を UV/Vis 吸光度計で評価する。

RNase 耐性型 mRNA 配列の検討

通常、mRNA は細胞内で RNase によって数時間以内に分解されてしまう。“翻訳の可逆的光制御法”により長時間にわたり細胞分化を誘導するには分解されにくい mRNA が必要である。そこで、RNase 耐性がある β -グロビンの 3'非翻訳領域 (3'-UTR) の配列を目的 mRNA の 3'-UTR に挿入し、細胞内寿命の長寿命化を検討する。制限酵素とリガーゼによる配列の編集と PCR による増幅を使いプラスミドからテンプレート DNA を作製する。テンプレート DNA を鋳型に無細胞転写システムを使い mRNA を合成する。半減期が数時間の蛍光タンパク質の mRNA を使い細胞内における mRNA の寿命を評価する。mRNA の寿命が 24 時間以上に到達しない場合は、 β -グロビンの 3'-UTR 配列のタンデムリピートを付加する、および光応答性 cap のトリフォスフェートの一部をメチレンビスフォス

フォネートに変更するなどの更なる延命措置を施す。

(2) 上で作製した光応答性 cap と RNase 耐性 mRNA 配列を取り入れた分化誘導因子の mRNA を使い細胞の分化を光照射で操作する。多能性幹細胞へ応用する前段階として取り扱いが容易な PC12 細胞を用いて H-Ras タンパク質の発現を制御することで神経様細胞への分化を操作する。

PC12 細胞は神経成長因子の添加で突起を伸ばし神経細胞の様な形状へと変化する。このため神経細胞の分化過程を調べるモデル細胞として頻繁に使われている。また、神経成長因子の添加なしで H-Ras を強制発現させても同様に神経様細胞へ分化することが知られている。“翻訳の可逆的光制御法”を使って培養 PC12 細胞集団において H-Ras の発現を細胞個々で操作し狙った細胞のみを神経様細胞へ分化させる。

無細胞転写系で合成した光応答性 cap 含有 H-Ras mRNA をトランスフェクション試薬を用いて PC12 細胞へ導入する。顕微鏡で観察しながら視野中の狙った細胞へタンパク質の発現を開始させるレーザー光を照射する。一定時間経過 (t 時間) 後、タンパク質の発現を停止させる光を照射する。タンパク質を発現させている期間 (発現量) による分化への影響を調べる。

4. 研究成果

(1) 可視光領域の光で異性化する光応答性 cap の開発

設計通りの光応答性 cap を合成することに成功した。trans から cis への異性化は 460 nm の光で、cis から trans への異性化は 550 nm の光で起こり、目的であった可視光領域での異性化を達成できた。ただ、cis の熱的安定性は非常に低く 25 °C において 1 秒以内で完全に trans へ戻った。正確な半減期を過渡吸収測定から求める必要がある。この光応答性 cap を使い蛍光タンパク質 (Venus) の発現を HeLa 細胞内で制御した結果、460 nm の照射時間に依存した発現が見られた。つまり、460 nm の光を照射している間だけ光応答性 cap が cis に異性化しタンパク質が発現していると考えられる。460 nm の可視光であっても長時間照射すると細胞が死滅してしまうことから、光応答性 cap の cis における熱的安定性を向上させる必要があった。そこで、光応答性 cap のベンゼン環へメチル基、エチル基、ジエチルアミノ基を修飾した数種類の光応答性 cap を合成した。パラ位、オルト位、メタ位と修飾箇所をシステマティックに変えてみたが、cis における熱的安定性の向上は見られなかった。

(2) RNase 耐性型 mRNA 配列の検討

β-グロビンの 3'-UTR 配列をもつ半減期が数時間の蛍光タンパク質の mRNA を作製し HeLa 細胞内へインジェクションした。インジェクション直後から蛍光観察をおこない、mRNA の細胞内寿命を測定した。結果、12 時間をピークに蛍光強度は減衰していった。この結果から、mRNA の細胞内寿命はおおよそ 10 時間程度であると見積もられた。目標である 24 時間には到達しなかったため、β-グロビンの 3'-UTR 配列を繰り返し挿入することを試みた。DNA リガーゼを使い 10 回の反復をもたせることはできたが、それを増幅するステップで非特異的な増幅が起こり、結果として 2 回の反復を挿入することしかできなかった。β-グロビンの 3'-UTR 配列を 2 回挿入した mRNA の細胞内寿命はおおよそ 12 時間であり、若干の改善はみられたが 24 時間には及ばなかった。

(3) “翻訳の可逆的光制御法”による細胞分化操作

可視光に反応する光応答性 cap を合成することはできたが、cis の熱的安定性が低く、タンパク質を発現させている間中 460 nm の光を照射し続けなくてはならず、細胞の分化操作へ使うことは難しい状況であった。“翻訳の可逆的光制御法”の細胞分化操作への有用性を確認するため、本課題以前に開発済みの光応答性 cap を用いることにした。この光応答性 cap は、trans から cis への異性化は 405 nm の光で、cis から trans への異性化は 310 nm の光で起こる。310 nm の光が細胞へ及ぼす影響を最小限に抑えるため照射時間を 30 秒と短く設定した。光応答性 cap を含む H-Ras の mRNA を PC12 細胞へトランスフェクション試薬を使いインジェクションした後、視野中の 1 個の細胞だけに 405 nm のレーザー光を 1 分間照射した。すると、その細胞のみが徐々に突起を伸ばし始め 24 時間後、左右に長い突起を伸ばした神経様細胞へと分化した (図 2)。

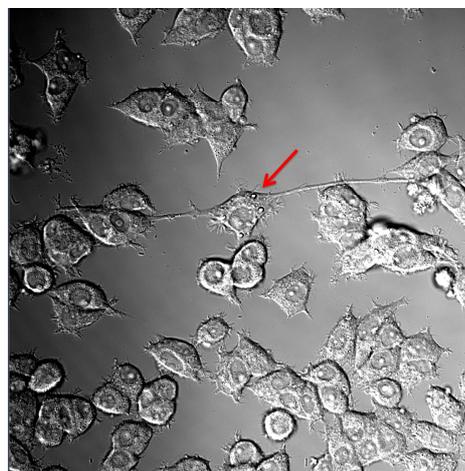


図 2 “翻訳の可逆的光制御法”を用いて中央の細胞のみを神経様細胞へ分化させた。

続いて、H-Ras の発現期間が分化へどの様に影響を及ぼすのか調べた。405 nm のレーザー光を 1 分間照射した後、2, 4, 6, 8 時間後に 310 nm の光を 30 秒間照射した。2, 4, 6 時間後に 310 nm の光を照射した場合には 310 nm の光を照射した後、一旦伸張した突起が再び収縮し元の形状へ戻った(図3)。しかし、8 時間後に 310 nm の光を照射した場合にはそのような収縮は観察されなかった。この結果から、H-Ras の発現期間によっても分化を操作できると判明した。

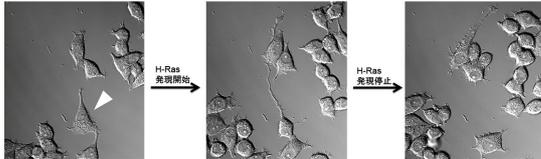


図3 H-Ras の発現を 6 時間後に停止させると突起が収縮し元の形状に戻った。

(4) まとめ

当初の目的通り ES 細胞の分化を操作するには至らなかったが、“翻訳の可逆的光制御法”を使えば細胞個々で分化誘導因子の発現を制御でき分化を人工的に操作できることが示された。このように光は熱や電気などの外部刺激と違い細胞に対して高い空間分解能で刺激を与えられ、細胞個々に異なる環境を作り出せる。本課題は光遺伝学の新しい手法と位置付けられる。現在の光遺伝学において、その全てが DNA から mRNA への転写を制御するものであり、mRNA からタンパク質への翻訳を制御する方法は申請者の開発した“翻訳の可逆的光制御法”が唯一である。転写を制御する方法は、光刺激からタンパク質が発現するまでのタイムラグが数時間と長く、即時性に欠ける。また、DNA ベースの手法であるため、ゲノムへの組み込み懸念もある。一方“翻訳の可逆的光制御法”は、タンパク質発現までのタイムラグはなく、リアルタイムの制御が可能である。さらに、mRNA を細胞に導入するためゲノムに組み込まれる心配はなく、再生医療への応用に向いている。

世界中の幹細胞研究者が多能性幹細胞を目的の細胞へ分化させる分化誘導因子の探索をおこなっている。今後多くの分化誘導因子が発見されると期待でき、本手法をその分化誘導因子の発現制御に用い、三次元組織培養技術と併用すれば、多能性幹細胞の集合体から位置と細胞の種類を人工的に操作して立体的な人工組織を作り上げる究極の再生医療へ展開できると期待される。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Shinzi Ogasawara, Control of Cellular Function by Reversible Photoregulation of Translation, ChemBioChem、査読有、Vol.15、2014、pp.2652-2655、DOI: 10.1002/cbic.201402495

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小笠原 慎治 (OGASAWARA, Shinzi)
北海道大学・創成研究機構・特任助教
研究者番号: 50462669