

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26640011

研究課題名(和文)光応答性転写因子の脳神経回路研究への応用

研究課題名(英文)Application of the photo-activatable transcriptional factor to neural circuit study

研究代表者

今吉 格 (Imayoshi, Itaru)

京都大学・白眉センター・准教授

研究者番号：60543296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子発現の光操作をニューロンにおいて機能するように最適化し、脳神経回路研究に応用するための基盤的技術開発を行った。特に、ウイルス発現ベクターに搭載しての使用を実現し、迅速にマウス個体・脳内における、遺伝子発現の光操作を可能にする事を目的とした。光照射の有無や条件により、遺伝子発現を自在にコントロールする事が可能になれば、様々な遺伝子の機能や、その発現動態の意義について、より詳細かつ構成的な解析が可能になった。

研究成果の概要(英文)：We conducted fundamental tool developments of photo manipulation of the gene expression. We optimized photo-activatable transcriptional factors for neural circuit studies. We generated a series of lenti virus vectors that can express GAVPO and UAS-downstream genes under the control of blue light.

研究分野：神経発生学

キーワード：光応答性転写因子

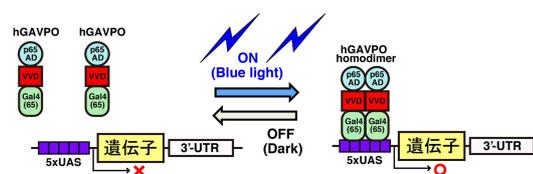
1. 研究開始当初の背景

光作動性のイオンチャネルやイオントランスポーターを使用したいいわゆるオプトジェネティクス(光遺伝学)の神経科学への応用は、近年の神経科学研究の最大のブレイクスルーと言ってもよい。光を照射する領域を変える事で、目的のニューロンの発火・抑制を自在にコントロールする事が可能になった。しかしながら、これらの光作動性のイオンチャネルやイオントランスポーターの開発や普及に比べて、光作動性の転写因子の開発や脳研究への応用は大きく遅れていた。もし、光照射の有無や条件により、遺伝子発現を自在にコントロールする事が可能になれば、様々な遺伝子の機能や、その発現動態の意義について、より詳細な解析が可能になる。しかし、現在の所、光作動性の転写因子を脳内やニューロンに発現させ、光照射依存的な遺伝子発現を実現した例は存在しない。これは、これまで報告されている光応答性の転写因子は、光照射依存的な遺伝子発現誘導能力が低い事、哺乳類の脳研究に使用するために十分な至適化が行われていない事が挙げられる。

2. 研究の目的

遺伝子発現の光操作をニューロンにおいて機能するように至適化し、脳神経回路研究に応用するための基盤的技術開発を行う。特に、ウイルス発現ベクターに搭載しての使用を実現し、迅速にマウス個体・脳内における、遺伝子発現の光操作を可能にする事を目指す。光照射の有無や条件により、遺伝子発現を自在にコントロールする事が可能になれば、様々な遺伝子の機能や、その発現動態の意義について、より詳細かつ構成的な解析が可能になるだけでなく、神経回路の可塑性の発現や維持を制御するダイナミックな遺伝子発現について、実験的にアドレスする事が可能になる。

我々は、光吸収によって構造が変化する LOV ドメイン(light, oxygen, voltage domain)を持つ、アカパンカビ(*Neurospora crassa*)由来の VVD たんぱく質を光活性化に利用した GAVPO を使用し、幹細胞において分化運命決定因子の周期的な遺伝子発現振動を実現した (Imayoshi et al., Science in press)。GAVPO は photo-activatable な GAL4 であり、二量体化能を減弱した GAL4 の DNA 結合ドメイン、LOV ドメインを持つ VVD、そして転写活性化因子 p65 の転写活性ドメインがタンデムに連結された人工たんぱく質である。シスエレメントとして GAL4 の結合配列(5xUAS)に TATA ボックスを連結し、その下流に発現させたい遺伝子を配置し、両者を細胞に導入する。すると、GAVPO たんぱく質は、VVD を介して青色光照射依存的に二量体化を起こす。その結果、GAL4 部分の二量体化により DNA 結合活性が増加し、5xUAS に結合する。次に、GAVPO の p65 を介して転写複合体が TATA ボックス上に形成され、下流の遺伝子の転写が促進されるという仕組みである。重要な点は、外因性の薬剤や補助因子を投与する事なく、遺伝子発現を強力に制御する事が可能である点である。



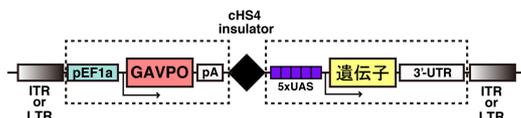
3. 研究の方法

Photo-activatable GAL4/UAS システムの単一ウイルスベクターへの搭載を実現するための条件検討を行う。また、ウイルスベクターの開発と並行して、GAVPO を発現するトランスジェニックマウス動物の作出を行う。さらに、GAVPO 分子の分子進化と photo-activatable Tet システムの開発と並行して、光照射デバイスの開発も行う。これ

らの実験計画を迅速かつ並列的に進行させる事で、光作動性転写因子の脳神経回路研究への早期応用を目指す。

4. 研究成果

遺伝子発現の光操作をニューロンにおいて機能するように至適化し、脳神経回路研究に応用するための基盤的技術開発を行った。特に、ウイルス発現ベクターに搭載しての使用を実現し、迅速にマウス個体・脳内における、遺伝子発現の光操作を可能にする事を目的とした。レンチウイルスベクターに、GAVPO や UAS 配列からなる光遺伝子操作システムを組み込み、各種の培養細胞やマウス組織への導入を行った。培養神経細胞や、マウス海馬の歯状回の神経細胞に対して、レンチウイルスベクターの感染を成立させ、光遺伝子操作システムを導入することに成功した。



今後、光照射の有無や条件により、遺伝子発現を自在にコントロールする事が可能になれば、様々な遺伝子の機能や、その発現動態の意義について、より詳細かつ構造的な解析が可能になった。今後、成体脳に存在する神経幹細胞やニューロンに遺伝子発現の光操作システムを導入し、遺伝子発現のダイナミックな変動の意義について解析を進める予定である。

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 2 件)

Imayoshi, I.* and Kageyama, R.* (2014) Oscillatory control of bHLH factors in neural progenitors.

Trends in Neurosciences 37: 531-538.

Imayoshi, I.* and Kageyama, R.* (2014) bHLH Factors in Self-Renewal, Multipotency, and Fate Choice of Neural Progenitor Cells. *Neuron* 82: 9-23.

[学会発表](計 2 件)

第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会
神戸国際会議場 2015 年 3 月 23 日

第 37 回日本分子生物学会年
パシフィコ横浜 2014 年 11 月 25 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今吉 格 (IMAYOSHI, Itaru)

京都大学・白眉センター・准教授

研究者番号：60543296

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：