

令和元年6月10日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14575

研究課題名(和文)光遺伝学的操作による線虫の細胞特異的な1遺伝子座の発現制御法の確立と応用

研究課題名(英文) Study for establishing a method to optically and cell-specifically manipulate single locus gene expression

研究代表者

杉 拓磨 (Sugi, Takuma)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・助教

研究者番号：70571305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまず、線虫*C. elegans*をモデル系として、転写活性化因子VP64を利用した人為的遺伝子発現制御の系を確立した。この技術の拡張を目指し、細胞特異的なエピゲノムの操作による遺伝子発現制御系の確立を試みた。その結果、VP64を利用した遺伝子発現制御が不可能であった神経細胞においても、CBP1などのエピジェネティックファクターを利用して、エピゲノムを直接操作することにより、遺伝子発現制御が可能となった。このことは、細胞ごとのクロマチン構造状態が異なることを示唆している。また本技術を応用するため、簡便な*C. elegans*の記憶・学習評価系の確立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本手法が単純な遺伝子発現量の操作方法としてだけでなく、特定の神経細胞のクロマチン構造の「ロバストネス」を調べる方法としても有望である可能性がある。また現在、*in vivo*で光刺激によるエピゲノム操作を行えるように技術拡張しており、将来的に本研究により、*C. elegans*の記憶・学習機構を人為的に操作することにより、記憶形成に必須のエピゲノムを同定することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I established a technique, in which a gene expression of a single locus in *C. elegans* can be modified by genome editing technique in a cell-specific manner. I first expressed VP64 transcriptional activator in several neurons (~10 neurons) of *C. elegans*. This expression induces *glr-1* gene in several neurons, but there were a few neurons on which VP64 has no effect. Therefore, I next tried to directly manipulate the epigenome using TALE-epigenetic factor. In this experiment, I succeeded in inducing the *glr-1* expression in the neurons in which TALE-VP64 could not induce its expression. Overall, I proved that these techniques are useful to artificially induce gene expression and epigenome editing of a single locus in a cell-specific manner. Furthermore, I also insist that the techniques are also important to understand the robustness of a single locus. I am now trying to drive the gene expression and epigenome editing in a cell-specific manner by an optical manipulation.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：線虫 ゲノム編集 光遺伝学 記憶・学習 行動

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで、脳神経回路内の各神経細胞の機能を規定する遺伝子発現調節のメカニズムが多く明らかにされてきた。しかし、それらの中で、実際に各神経細胞の機能発現に本質的役割を果たすメカニズムは何なのかは未だ不明である。例えば、記憶の長期的維持には遺伝子発現調節を伴うことが知られ、多くの分子が同定されているが (Greer & Greenberg, 2008)、記憶の実体は何なのかという問いに答えは得られていない。必要十分な要素を絞り込むためには、各神経細胞の遺伝子発現を非侵襲的に操作し、1対1でその機能発現を観察する技術が必要である。

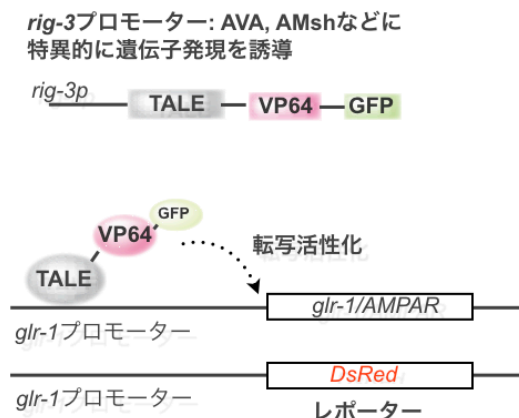
近年の研究において、TALENやCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術が汎用的に使われるようになった。昨年、この技術を応用し、DNA結合ドメインTALEと転写活性化因子VP64に、光応答性ドメインを融合し、マウスの神経系に発現させることにより、光刺激で標的遺伝子の発現を制御する論文が報告された (Koneremann et al. 2013)。しかし、マウスなどの神経系は、膨大な数の神経細胞から構成されるため、1細胞レベルで、特定の遺伝子座を操作することは難しいといわざるおえない。この背景において、本研究は、線虫 *C. elegans* を用いることにより、1細胞レベルの特定の遺伝子座操作を可能にする挑戦的なものであり、国内外の研究と大きく異なる位置づけにある。

### 2. 研究の目的

*C. elegans* の神経系はわずか302個の神経細胞からなり、遺伝学的操作により、1細胞レベルで遺伝子導入が可能である。本申請者は、準備段階において、ゲノム編集技術を応用し、*C. elegans* の1遺伝子座の発現を制御する方法を確立した (Sugi\* et al. *Dev. Growth Differ.*, 2014; Sugi\* et al. 投稿準備中)。さらに、簡便な1細胞レベルの遺伝子発現量の定量化法を開発した (Sugi\* & Ohtani, *BBRC*, 2014)。本研究では、これらの技術に、光技術を組み入れ、*C. elegans* の1神経細胞内の1遺伝子座の発現を光操作する技術を開発する。この技術を、メカニカルな刺激の馴化学習・記憶 (Sugi\* et al. *PNAS*, 2014) の解析に応用し、記憶に主要な役割を果たす介在神経細胞AVAの特定の遺伝子座を操作することにより、記憶成立に必要な遺伝子発現調節を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

図に遺伝子発現制御法の概略を示す。本研究者は準備段階の研究において、ゲノム編集技術を応用し、*glr-1* 遺伝子のプロモーター領域に特異的に結合するTALE型DNA結合ドメインと転写活性化ドメインVP64-GFPを融合したTALE-VP64-GFPをコードするcDNAを作製していた。そこで、少数の神経細胞に恒常的かつ特異的に発現を誘導する *rig-3* プロモーターDNAの下流に、TALE-VP64-GFPのcDNAを連結し (*rig-3p::tale-vp64-GFP*)、*C. elegans* へのインジェクションを行った。さらに、*glr-1* のプロモーターDNAの下流にDsRedのcDNAを連結したDNAがゲノムに組み込まれたレポーターアッセイ用株 (N2; *Is[glr-1p::DsRed]*株) と掛け合わせ、TALE-VP64-GFPにより、レポーターDsRedの発現が亢進されるかどうかを確認した。



さらに、TALE-VP64のVP64部位をヒストンH3K27アセチル化酵素CBP1やヒストンH3K4脱メチル化酵素LSD1などのエピジェネティックファクターで置換した種々のTALE-epigenetic factorを作製した。このDNAを線虫の特定の神経細胞のみに発現させた線虫を作製した。この線虫を用い、VP64による遺伝子発現制御が不可能であった細胞での活性化の有無について検証を行った。

#### 4. 研究成果

TALE-VP64-GFPが発現している株では、TALE-VP64-GFPを発現するAMsh細胞で、TALE-VP64-GFPが発現していない株では見られないDsRedの蛍光が再現よく観察された。この結果は、TALE-VP64-GFPが、*glr-1*プロモーターを活性化し、DsRedが、異所的に発現したことを示している。つまり、恒常的ではあるが、特定の標的神経細胞の1遺伝子の発現を人為的に制御したことを示している。

さらに、興味深いことにVP64を利用した遺伝子発現制御が不可能であった一部の神経細胞においても、ヒストンH3K27アセチル化酵素CBP1を利用して、エピゲノムを直接操作することにより、遺伝子発現制御が可能となった。また一方で、ヒストンH3K4脱メチル化酵素LSD1を用いて、*glr-1*プロモーターにより*glr-1*遺伝子が発現している細胞の一部においてこの発現を人為的に抑制することにも成功した。これらの結果から、まず結論の1つとして、同じ遺伝子座においても神経細胞ごとにクロマチン構造状態が異なる可能性を得た。一方、エピジェネティックファクターを利用してもなお、遺伝子発現量を変化させることが不可能であった神経細胞も見られた。この結果については、異なるエピジェネティックファクターの利用により、遺伝子発現量を操作しうる可能性と、あらゆるエピジェネティックファクターでも操作不可能な可能性があげられる。後者では恒常的なクロマチン構造の不活性を意味している。

本研究で確立した手法が単純な遺伝子発現量の操作方法としてだけでなく、神経細胞のクロマチン構造の「ロバストネス」を調べる方法としても有望である可能性が示された。本研究を通じて得られた結果に対しては、現在、論文執筆中であり、早期の投稿・出版を目指している。一方、当初計画では、DNA結合ドメインであるTALEをCRY2ドメインに融合し、一方で、VP64やエピジェネティックファクターをCIB1ドメインに融合したコンストラクトを作製し、線虫に強制発現し、単一神経細胞の遺伝子発現量を光で制御することをかかっていた。しかしながら、研究期間中にこの目標までは達しなかった。今後は、得られた線虫が光刺激のない状態で、強制発現遺伝子の悪影響を受けずに、通常の野生株と同様の記憶・学習能を有するかどうかを確認し、実際に単一細胞レベルで光刺激により遺伝子発現量を制御する技術として完成させる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1) **Sugi T\***, Igarashi R\*, Nishimura M

Noninvasive mechanochemical imaging in unconstrained *Caenorhabditis elegans*

**Materials** Vol. 11 No.6, 1034, 2018 (原著論文, 査読有)

2) **Sugi T\***

Genome editing of *C. elegans*

**Methods Mol Biol** Vol. 1630, 247-254, 2017 (総説論文, 査読無)

3) **Sugi T\***

Genome editing in *C. elegans* and other nematode species

**International Journal of Molecular Sciences** Vol. 17 No.3, E295, 2016 (総説論文, 査読有)

4) **Sugi T\***, Okumura E, Kiso K, Igarashi R

Nanoscale mechanical stimulation method for quantifying *C. elegans* mechanosensory behavior and memory

**Analytical Sciences** Vol. 32 No.11, 1159-1164, 2016 (原著論文, 査読有)

5) Yoshinari Y\*, Mori S, Igarashi R, **Sugi T**, Yokota H, Sugihara F, Ikeda K, Sumiya H, Tsuji S, Mori I, Tochio H, Harada Y\*, Shirakawa M

Optically detected magnetic resonance of nanodiamonds *in vivo*; Implementation of selective imaging and fast sampling

**J Nanosci Nanotechnol** Vol. 15 No.1, 1014-1021, 2015 (原著論文, 査読有)

[学会発表] (計 5 件)

杉 拓磨

「*In vivo*における細胞特異的機能解析から明らかにする記憶の仕組みとその応用」  
第7回産と学をつなぐSENRIの会、大阪、2017年

杉 拓磨

「動物1個体と集団レベルの行動を規定する力学的制御機構」  
ERATO-さきがけジョイントシンポジウム、筑波、2017年

杉 拓磨

「Deciphering physical and chemical rules governing behavior and plasticity」  
京大大学生命科学研究科、京都、2016年

杉 拓磨

「行動とその可塑性を規定する物理・化学法則の分子論的理解の試み」  
東京大学、東京、2016年

Takuma Sugi

Neural circuit encoding mechanosensory habituation in *C. elegans*

5th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology 2015, Nanjing, China, 2015

[図書] (計 2 件)

1) 杉 拓磨 (分担執筆)

論文だけではわからないゲノム編集成功の秘訣 Q&A  
実験医学別冊 218-227, 2015

2) **Sugi T** (分担執筆)

Book Title: Targeted Genome Editing Using Site-specific Nucleases: ZFNs, TALENs, and the CRISPR/Cas9 System

Chapter 4: Genome editing in nematode

**Springer**, 2015

[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：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：伊藤 浩史

ローマ字氏名：Hiroshi Ito

所属研究機関名：九州大学

部局名：芸術工学研究院

職名：准教授

研究者番号 (8桁)：20512627

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。