

令和 2 年 4 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19394

研究課題名(和文)音波振動を用いた遺伝子操作技術「ソノジェネティクス」の創出

研究課題名(英文)Development of sonogenetics: a gene control system using acoustic waves

研究代表者

桑田 昌宏(Kumeta, Masahiro)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：00582181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、音波で遺伝子をコントロールする技術の開発に向けて、細胞音波照射設備の構築・音波応答遺伝子の網羅的探索・音波応答遺伝子領域の抽出・音波による細胞分化操作、の各研究計画を推進した。その結果、独自に構築した音波照射システムを用いて、約400の音波応答遺伝子を同定することに成功した。これらの遺伝子の制御領域の音波応答性を検証したところ、有意な応答を示すものは得られたが、その応答性は高くはなかった。筋・骨細胞分化に対する音波照射の影響を調べたところ、筋分化が有意に促進されることを見出した。本挑戦的研究は、音波による遺伝子操作・細胞操作への道を拓く画期的な成果が得られたものと総括できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、音波により遺伝子や細胞をコントロールする技術の実現に向けた具体的な成果が得られたことは、音と生命の関係を根本的に転換する大きな学術的意義を持つ。この成果を元に音波が生命科学において用いられる汎用的なツールとなれば、基礎科学のみならず、応用科学や再生医療においても革新的なバイオテクノロジーの創出へとつながることが予想され、社会的にも大きな意義を持つ研究へと発展していくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：To develop an acoustic gene control system, researches consist of the following 4 topics were carried out; 1) establishment of direct/indirect acoustic system for cultured cells, 2) whole genome-wide identification of sound-sensitive genes, 3) isolation of sound-sensitive genetic regions, and 4) investigation of acoustic effects on cell differentiation. By using custom-made acoustic systems, more than 400 sound-sensitive genes were identified by the RNA-seq analysis. Although several promoter regions of these genes exhibited sound-sensitive activity control, the level of the control was not as high as expected from the gene analyses. Continuous exposure of myoblast cells under differentiation medium with acoustic stimulation significantly induced myotube formation. These findings revealed the future utility of acoustic stimulation in next-generation gene/cell control techniques.

研究分野：生化学、細胞生物学、分子生物学、生物物理学

キーワード：音波 ソノジェネティクス 遺伝子 遺伝子操作 遺伝子工学 細胞分化 メカノバイオロジー 音響細胞生物学

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子操作技術は、細胞内の内在性遺伝子もしくは外部から導入された遺伝子を人工的に操作する技術である。基礎科学分野においては、過去数十年に渡り核心的技術として様々な遺伝子機能解析に用いられてきた。更に近年では、遺伝子組換え生物の作出や遺伝子治療など、科学や医療の発展を支える基盤技術としてその重要性は増し続けている。これまでの遺伝子操作は、組織・細胞腫特異的な制御 DNA 領域を用いたものや、薬剤感受性を利用したものが主であった。近年には、光応答性タンパク質を利用した光による遺伝子操作技術(オプトジェネティクス)が実用化され、脳科学などの分野で革命を起こしている。しかしこれらの技術には、即時性・浸透性・簡便性といった面で一長一短があり、用途には様々な制約がある。

本研究代表者はこれまでに、可聴域の音波に対する細胞レベルの応答を探索してきた。これまで音は、内耳組織など音波受容に特化した器官を持つ動物のみに知覚され、脳による統合解釈を経ることで認識されるものと理解されてきた。これに対し本研究代表者は、細胞レベルでの機械的刺激受容シグナル(メカノトランスダクション)の研究に携わった経験や、超音波刺激に対する細胞応答の知見を勘案し、可聴域の音波(20-20,000Hz)に対する応答系も存在すると予測し、独自に実験系を構築して研究を進めてきた。音響工学の研究者とも連携して様々な細胞腫・細胞応答・音波パターン・処理条件を検討した結果、複数の遺伝子が2時間程度の音波処理で20-40%程度抑制制御されることを見出した(Kumeta M. 2018 PLoS ONE)。これは非常に高い抑制効果であり、また早い時間応答である。そこで、この生体メカニズムを理解して模倣することで、音波により遺伝子を制御するという全く新しい遺伝子操作技術を創出できるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究では、音波を用いて遺伝子操作する技術の開発を目指す。音波は媒質中を伝播する粗密波であり、振動数は20-20,000Hz・最大圧力は日常環境では最大およそ1 Pa (N/m²)に相当するエネルギーを伝播する物理現象である。本研究では、音波に対する遺伝子応答を網羅的に明らかにするとともに、この仕組みを利用して音波により遺伝子を制御する技術の開発に向けた取り組みを進める。具体的には、人工導入した遺伝子を音波により操作する技術と、細胞内在性遺伝子を音波により操作して細胞分化を制御する技術、の二つの革新技术の創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) 本研究目的に最適な、かつ実用化・汎用化を視野に入れた実験系の構築のため、培養細胞に対して効率よく音波を伝播する音波照射設備を構築・最適化する。スピーカーを用いた間接電波法と、振動トランスデューサーを用いた直接電波法の、主に二種類の方法でのシステムの構築を目指す。

(2) 次世代シーケンサーによるRNA-seq解析により、音波刺激に応答する遺伝子を網羅的に探索する。上記システムで音波照射した後の細胞から全RNAを抽出し、RNA-seqにより遺伝子発現量を定量評価する。異なる照射時間における遺伝子発現量を比較解析することで、音波に応じて発現調節される遺伝子群(音波応答遺伝子)を特定する。

(3) 音波応答遺伝子の制御領域(プロモーター)を用いて、この領域に音波応答性がみられるかをレポーターアッセイにより検証する。また、応答性を最適化するように配列の改変を行う。

(4) 予備実験知見に基づき、音波による遺伝子応答の結果としての細胞応答に着目し、特に筋分化や骨分化の過程が音波により影響を受けるかどうか検証を行う。更に、これらの分化を効率化するような音波条件の探索を行う。

4. 研究成果

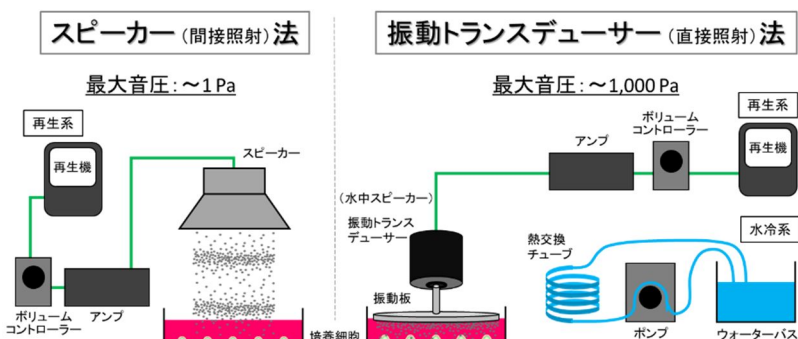
(1) 培養細胞に対する音波照射設備の構築と最適化

スピーカーによる間接照射法

スピーカーを用いて、空気から水中(培地中)へと間接的に音波を伝播する実験系を構築した。ハイドロホンで測定した到達音圧は最大で1 Paほどである。この手法では、伝達できる音波エネルギーはそれほど大きくないが、非接触で操作できることからコンタミネーションの可能性が低く抑えることができ、生命科学における汎用性が高いと考えられる。

振動トランスデューサーによる直接照射法

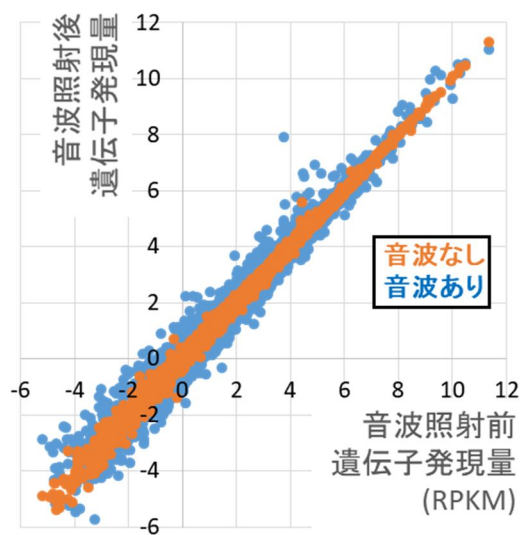
振動トランスデューサー(小型シェーカー)を用いて、培地中に浸けた振動板を振動させ、水中に直接音波を発生する実験系を構築した。当初ステンレス製の振動板をカスタム設計して用いたが、出力を上げるとトランスデューサー本体で発生する熱が培地に伝わって温



度が上昇する問題が起きたため、プラスチック樹脂製の振動板を用いることとした。各種樹脂素材を比較検討した結果、機械的特性や遮熱性に優れた PEEK 樹脂・および若干性能は劣るものの製造費用が押さえられる高分子ポリエチレン樹脂を、振動板材料として選定した。このシステムにより、最大 1,000 Pa 程度の音波を発生することが可能となった。ただし、およそ 500 Pa を越える音波高出力条件では熱の影響が無視できなくなるため、トランスデューサー本体の熱を下げるための水冷システムも構築した。

(2) 音波応答遺伝子の探索

筋芽細胞 C2C12 に対して振動トランスデューサーにより 150 Pa のホワイトノイズを継続照射し、1・2・4 時間後に全 RNA を抽出して次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行い、音波応答遺伝子を探索した。右図に、2 時間の音波照射の結果みられた遺伝子発現量の変化を、X 軸を照射前・Y 軸を照射後としたプロットを示す。音波なし(オレンジ)と比較して、音波あり(青)では $Y=X$ からはずれる音波応答遺伝子が多数生じていることが分かる。有意な閾値を設定して解析した結果、音波により活性化される遺伝子は 202 種類・不活化される遺伝子は 197 種類と、およそ 400 種類の音波応答遺伝子を特定した。また、経時的な発現変化パターンから、ピーク型・トリガー型・スイッチ型のさまざまな応答様式を示すものが存在することが分かった。現在までの解析では、これらが既存の特定の機能的遺伝子グループに属するものとは断定できていないが、細胞接着関連遺伝子や熱応答遺伝子、細胞分化関連遺伝子などが多数影響を受けていることが示唆された。

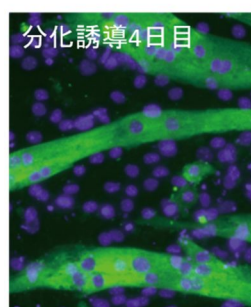


(3) 音波応答遺伝子領域の抽出

上記の音波応答遺伝子群から、特に応答性の高いものに対し、その上流にあるプロモーター領域に音波応答性が見られるかどうかをルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーターアッセイにより検証した。約 50 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし実験を行った結果、約 4 種に関しては有意な音波応答性が見られたが、いずれもその応答レベルは 8 時間の音波照射で 2 倍を下回るものであり、上記(2)の遺伝子解析で見られたような顕著な応答性は見られなかった。現在、更なる応答遺伝子のプロモーター領域をテストする取り組みを継続しているほか、プロモーター以外の遺伝子要素も含めた多角的な検証を進めているところである。

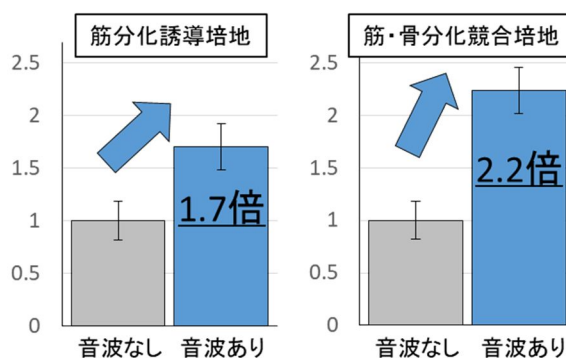
(4) 音波による細胞分化制御

上記(2)の遺伝子解析の結果、音波照射により筋・骨分化に関連した遺伝子が影響を受けることが明らかとなったことから、音波によりこの分化過程を制御できるかを追究した。筋分化誘導条件にある筋芽細胞 C2C12 に対して継続的に 150 Pa ホワイトノイズの音波照射を行ったところ、筋分化は有意に促進された。更に筋・骨分化競合状態においては、より顕著に筋分化が促進さえることが明らかとなった。これにより、音波が細胞分化に影響を与える外的刺激であることを明らかにしたとともに、音波を刺激原とすることで細胞運命をコントロールする新技術の確立が可能であることが示された。



紫: 細胞核
緑: 分化した筋繊維

筋繊維に分化した細胞の割合(相対数)



これらの成果より、本挑戦的研究は音波による遺伝子操作・細胞操作への道を拓く画期的な成果が得られたものと総括できる。今後更に研究を進めることで、新たな学術分野の創造や、革新的バイオテクノロジーの創出へとつながることが期待される。

<引用文献>

Kumeta M, Takahashi D, Takeyasu K, Yoshimura SH. (2018) "Cell type-specific suppression of mechanosensitive genes by audible sound stimulation" *PLoS ONE*, 13(1): e0188764.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kumeta M, Panina Y, Yamazaki H, Takeyasu K, Yoshimura SH.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 N terminal dual lipidation coupled molecular targeting into the primary cilium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kumeta Masahiro, Takahashi Daiji, Takeyasu Kunio, Yoshimura Shige H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Cell type-specific suppression of mechanosensitive genes by audible sound stimulation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0188764
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0188764	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masahiro Kumeta
2. 発表標題 Cellular responses to audible sound stimulations
3. 学会等名 SPIRITS International Symposium 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----