

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03932

研究課題名(和文) 光操作に基づく細胞解析技術の開発と応用

研究課題名(英文) Cell analysis based on optical control of the genome

研究代表者

佐藤 守俊 (Sato, Moritoshi)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：00323501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DNA組換え反応の光操作技術(PA-Cre)を染色体に組み込んだノックインマウスやPA-Creをコードするアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を開発すると共に、当該技術のマウスの生体(in vivo)での検証を通じて新たな細胞解析技術を創出した。さらに、光照射でゲノム上での転移反応を示す光駆動型のタンパク質分子を世界で初めて開発し、細胞レベルでの検証を行なった。これらの技術は、従来技術では困難だった生体内での様々な細胞系譜の解明や遺伝子機能の解明に大いに貢献すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来にない新しいコンセプトのゲノムの光操作技術を開発し、それをマウスのゲノム上で実際に操って、新たな細胞解析技術を創出した。これらの技術は、従来技術では困難だった生体内での様々な細胞系譜の解明や遺伝子機能の解明に大いに貢献すると考えられる。本研究で開発された技術により、神経幹細胞やガン幹細胞を含めた様々な幹細胞からの細胞系譜を解明できるようになったり、様々な遺伝子の機能解明が可能になれば、基礎生命科学の諸分野や再生医療、ガン医療等に大きなインパクトを与えることができる。

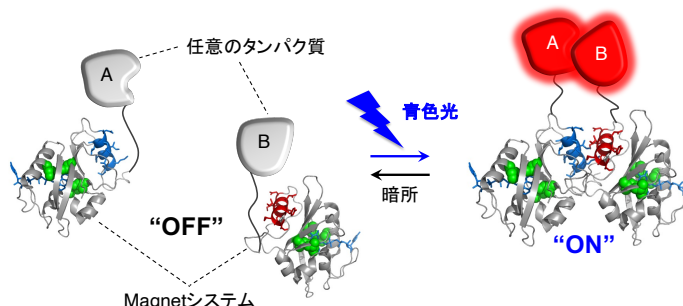
研究成果の概要(英文)：In this study, we developed knock-in mice that incorporate photoactivatable DNA recombination system, named PA-Cre, into their chromosomes and adeno-associated viral vectors (AAVs) encoding PA-Cre, thereby developing a new cell analysis technology through in vivo verification of PA-Cre in living mice. In addition, we also developed a photoactivatable gene activation system that exhibits a genomic reaction upon light illumination, and validated it at the cellular level. These technologies are expected to contribute to the elucidation of various cell lineages and gene functions in vivo, which have been difficult to achieve with conventional technologies.

研究分野：生命現象の光操作技術

キーワード：光操作 細胞 遺伝子 ゲノム タンパク質 Cre-loxP トランスポゾン

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の佐藤は様々な生命現象を自由自在に光で操ることができるようになればライフサイエンスは大きく変わると考え、新しい光操作技術の開発を戦略的に行ってきた。研究代表者が重要と考えてまず最初に取り組んだのは、「操り人形」で言えばヒモとか棒に相当する、汎用性の高い基盤技術の開発である。植物のように光を利用する生物は光受容体を持っている。このタンパク質は光による入力を構造変化や相互作用といった力学的シグナルとして出力できる。しかし、野生型の光受容体は、光応答性や反応速度などに問題を抱えていることが多い。



研究代表者はアカパンカビの青色光受容体 (Vivid) に様々なプロテインエンジニアリングを施して問題を克服し、非常にサイズが小さく、高い光反応性と可逆性を有し、反応速度を自由自在にチューニングできる独自の光スイッチタンパク質 (Magnet システム, *Nature Communications* 2015) (図 1) を開発した。さらに、研究代表者は、この Magnet システムを用いて、光刺激でゲノムの塩基配列を書き換える技術 (PA-Cas9, *Nature Biotechnology* 2015)、ゲノムにコードされた遺伝子の働きを光刺激で活性化する技術 (CPTS, *Nature Methods* 2017)、DNA 組換え反応の光操作技術 (PA-Cre, *Nature Chemical Biology* 2016) など、それぞれに特徴のあるゲノムの光操作技術を次々と開発して、ゲノムの光操作に基づく新分野の潮流を生み出してきた。

図 1. 佐藤が開発した Magnet システム. Magnet システムに任意のタンパク質 A・B を連結すれば、その結合・解離を光照射の ON/OFF でコントロールできる。

2. 研究の目的

本研究では、新たな細胞解析技術を創出することを目的として、研究代表者が先行研究において開発した DNA 組換え反応の光操作技術 (PA-Cre) をコードする遺伝子を染色体に組み込んだノックインマウスを開発する。本研究では、さらに、研究代表者が現在までに開発してきたゲノムの光操作技術とは全く異なるコンセプトに基づいて、新しいゲノムの光操作技術「光駆動型トランスポゾン」の開発に挑戦すると共に、新たな細胞解析技術の開発に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

PA-Cre は、一般的な Cre-loxP 反応のように、遺伝子をノックアウトしてその働きを調べる目的に利用できると共に、DNA 組換え反応によって蛍光タンパク質を発現するように設計すれば、細胞を遺伝子レベルで永久的に蛍光標識できる (図 2)。PA-Cre を組み込んだノックインマウスを開発できれば、生体の狙った細胞群に対して狙ったタイミングでの標識を行うことが可能となる。このような細胞標識に基づく細胞解析技術を実現するために、本研究では PA-Cre のターゲティングベクターを作製し、マウスの 6 番染色体 *Rosa26* 座位に PA-Cre のコンストラクトをノックインする。このように開発したノックインマウスを、蛍光タンパク質のレポーターマウスと交配し、PA-Cre による時間的・空間的に制御された DNA 組換え反応をマウスの生体 (*in vivo*) で可視化評価できる実験系を構築する。

また、トランスポゾンは、部位特異的なゲノム改変ツールの CRISPR-Cas9 システムや Cre-loxP システムとは大きく異なり、そのゲノム上での反応がランダムという特徴を持っている。従って、光駆動型トランスポゾンを開発してゲノムに 1 コピーを導入すれば、光刺激に応答して細胞ごとに異なるゲノム部位にト

ランソポゾンがジャンプするので、光照射領域に存在する細胞の一つ一つに対してそれぞれ異なる標識を導入できる。本研究では、上述の光スイッチタンパク質の Magnet システムを用いて光駆動型トランスポゾンを実験的に設計・開発し、細胞レベルでの評価を十分行うと共に、マウスの生体に導入して、細胞解析に利用できることを実証する。

4. 研究成果

PA-Cre をコードする遺伝子を *Rosa26* 座位に組み込んだ PA-Cre ノックインマウスを樹立し、蛍光タンパク質のレポーターマウスと交配することで、PA-Cre と蛍光レポーターを発現するマウスモデルを得た。このマウスモデルに対して、生体外より光照射を行なって DNA 組換え反応を誘導し、その結果を蛍光観察により調べた。生後 1 日目のマウスに対して生体外より 30 分間の非侵襲的な光照射を 2 回に分けて

行なったところ、皮膚や骨格筋はもとより、脳や心臓、肝臓、腎臓、肺などの臓器において、DNA 組換え反応を誘導できたことがわかった。

また、生後 8 週目のマウスに対して、足の付け根の骨格筋や肝臓をポイント照明で狙って、生体外より 1 時間の非侵襲的な光照射を行なったところ、高いレベルで DNA 組換え反応を誘導できた。また、ワイヤレス LED を頭皮と頭蓋骨の間に埋植することで長期にわたって脳に対して光刺激を与える実験系を構築して評価したところ、頭蓋骨の外からの非侵襲的な光照射によって脳においても DNA 組換え反応を誘導できることが明らかになった。

さらに本研究では、PA-Cre の改良に関する研究も実施した。オリジナルの PA-Cre には二つの改良すべきポイントがある。一つ目は暗所でのリーク応答に関する問題である。本研究ではこの点を改良するために、PA-Cre をコードする DNA の塩基配列に改変を施すことで、暗所でのリーク応答が大幅に減少した改良版の PA-Cre を開発することができた。この改良版の PA-Cre についても、マウスの *Rosa26* 座位に組み込んだノックインマウスを開発すると共に、改良版の PA-Cre をコードするアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を開発した (図 3)。改良版の PA-Cre の AAV をマウスの脳に導入し、当該ベクターにより脳神経細胞での DNA 組換え反応を光操作できることを示した。

さらに本研究では、PA-Cre の改良に関する研究も実施した。オリジナルの PA-Cre には二つの改良すべきポイントがある。一つ目は暗所でのリーク応答に関する問題である。本研究ではこの点を改良するために、PA-Cre をコードする DNA の塩基配列に改変を施すことで、暗所でのリーク応答が大幅に減少した改良版の PA-Cre を開発することができた。この改良版の PA-Cre についても、マウスの *Rosa26* 座位に組み込んだノックインマウスを開発すると共に、改良版の PA-Cre をコードするアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を開発した (図 3)。改良版の PA-Cre の AAV をマウスの脳に導入し、当該ベクターにより脳神経細胞での DNA 組換え反応を光操作できることを示した。

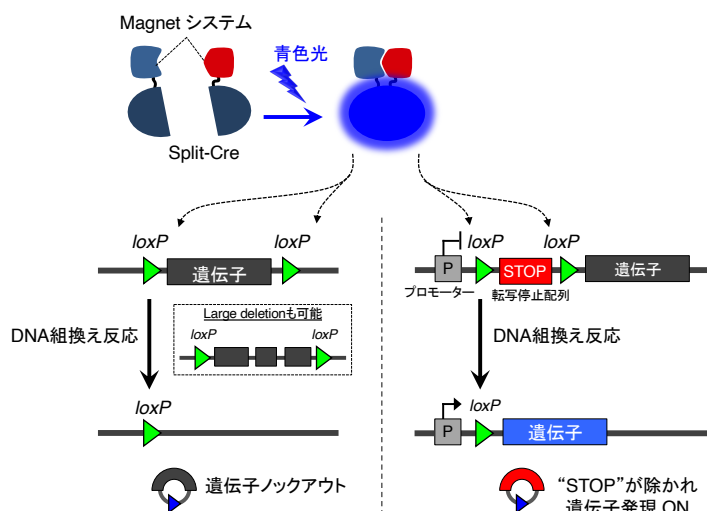


図 2. PA-Cre の原理. Split-Cre と Magnet システムからなる PA-Cre は青色光で活性化される DNA 組換え酵素である (上図). 遺伝子もしくは遺伝子群を *loxP* で挟むことにより、当該遺伝子・遺伝子群を光刺激でノックアウトできる (左下図). また、転写停止配列 (STOP) を *loxP* で挟むことにより、遺伝子の発現を光刺激で活性化できる (右下図).

さらに本研究では、PA-Cre の改良に関する研究も実施した。オリジナルの PA-Cre には二つの改良すべきポイントがある。一つ目は暗所でのリーク応答に関する問題である。本研究ではこの点を改良するために、PA-Cre をコードする DNA の塩基配列に改変を施すことで、暗所でのリーク応答が大幅に減少した改良版の PA-Cre を開発することができた。この改良版の PA-Cre についても、マウスの *Rosa26* 座位に組み込んだノックインマウスを開発すると共に、改良版の PA-Cre をコードするアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を開発した (図 3)。改良版の PA-Cre の AAV をマウスの脳に導入し、当該ベクターにより脳神経細胞での DNA 組換え反応を光操作できることを示した。

さらに本研究では、PA-Cre の改良に関する研究も実施した。オリジナルの PA-Cre には二つの改良すべきポイントがある。一つ目は暗所でのリーク応答に関する問題である。本研究ではこの点を改良するために、PA-Cre をコードする DNA の塩基配列に改変を施すことで、暗所でのリーク応答が大幅に減少した改良版の PA-Cre を開発することができた。この改良版の PA-Cre についても、マウスの *Rosa26* 座位に組み込んだノックインマウスを開発すると共に、改良版の PA-Cre をコードするアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を開発した (図 3)。改良版の PA-Cre の AAV をマウスの脳に導入し、当該ベクターにより脳神経細胞での DNA 組換え反応を光操作できることを示した。

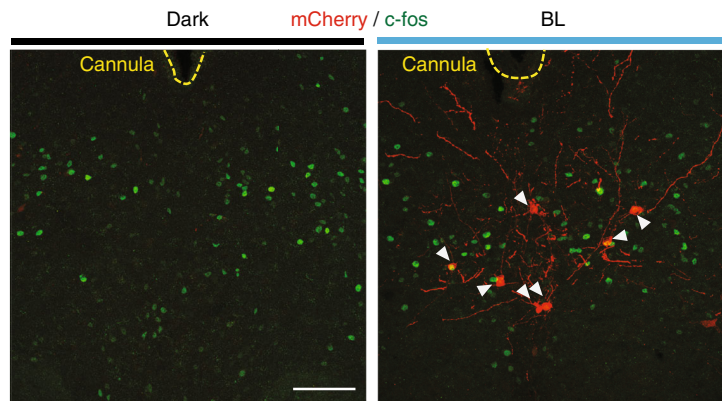


図 3. PA-Cre をコードする AAV をマウスの脳の神経細胞に感染させて PA-Cre を発現。光照射を施したところ、神経細胞内で DNA 組換え反応が誘起された。DNA 組換え反応により mCherry が発現するレポーターを利用。

オリジナルの PA-Cre のもう一つの改良ポイントは、特に PA-Cre の発現が低い細胞において、その DNA 組換え活性が十分でないことにある。この二つ目の問題を解決するために、PA-Cre にアミノ酸レベルでの改変を施すことで、DNA 組換え活性が大幅に向上した変異体を開発することに成功した。現在、この高活性の PA-Cre 変異体をマウスの生体に導入し、in vivo での検証を行なっている。PA-Cre は本研究で実施したような細胞解析技術としてのみならず、マウスの生体における遺伝子機能の新しい解析技術としても利用できると考えている。

上述のように本研究で開発した PA-Cre のノックインマウスや AAV は、これまでの技術では困難だった生体内での様々な細胞系譜の解明や遺伝子機能の解明に大いに貢献すると考えられる。また、本研究で実施した研究によって PA-Cre を大きく改良することができたため、この新たな光操作技術を武器として、新たな研究分野の開拓に挑戦したいと考えている。

光駆動型トランスポゾンについては、研究代表者の佐藤が先行研究で開発した PA-Cas9 や PA-Cre などの開発戦略と同様に、トランスポザーゼの分割体を作製し、光スイッチタンパク質の Magnet システムを連結することにより開発することを計画した。なお、Mos1 や Sleeping Beauty のようにいくつかのトランスポゾンのトランスポザーゼは結晶構造が明らかになっている(図 4)。この構造情報を利用して、様々な位置でトランスポザーゼを分割し、Magnet システムを連結して分割位置のスクリーニングを行った。ここで得られた最適の分割体に対して、さらに細かく分割位置を探索すると共に、上述の PA-Cre の高活性変異体を開発するときに採用したアプローチを導入することで、暗所ではほとんど転移活性を示さず、光照射で初めてゲノム上での転移活性が生起する光駆動型のトランスポゾンのプロトタイプを開発することができた。さらに、光駆動型のトランスポゾンのプロトタイプを培養細胞に導入し、光照射を施したサンプルを次世代シーケンサーで分析することで、光駆動型のトランスポゾンが光刺激によってゲノム上をランダムにジャンプすることを検証した。

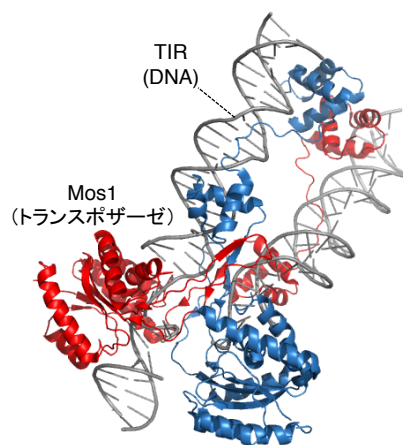


図 4. Mos1(トランスポザーゼ;タンパク質)とTIR(DNA)の複合体の結晶構造. トランスポザーゼは TIR に結合し、転移反応を触媒する。この結晶構造を参考に、トランスポザーゼの分割体を開発した。

現在、光駆動型のトランスポゾンのプロトタイプをゲノムに 1 コピーだけ持った細胞株を樹立し、ゲノムでの光刺激依存的な転移反応をテストしている。今後、光駆動型のトランスポゾンをゲノムに 1 コピーだけ導入したノックインマウスを樹立して、生体内での細胞系譜の解明や遺伝子機能の解明など、様々な応用研究を実施する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 K. Morikawa, K. Furuhashi, C. de Sena-Tomas, A. L. Garcia-Garcia, N. Gallerani, H. E. Yamamoto, A. D. Klein, R. Bekdash, S.-H. E. Park, G. S. Collins, F. Kawano, M. Sato, C.-S. Lin, K. L. Targoff, E. Au, M. Salling and M. Yazawa	4. 巻 11
2. 論文標題 Photoactivatable Cre recombinase 3.0 for in vivo mouse applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-16030-0	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 該当する

1. 著者名 K. Yoshimi, Y. Yamauchi, T. Tanaka, T. Shimada, M. Sato, and T. Mashimo	4. 巻 101
2. 論文標題 Photoactivatable Cre knock-in mice for spatiotemporal control of genetic engineering in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 125-135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-020-00482-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Takao, Y. Hiraoka, K. Kawabe, D. Yamada, L. Ming, K. Tanaka, M. Sato and T. Takarada	4. 巻 526
2. 論文標題 Establishment of a tTA-dependent photoactivatable Cre recombinase knock-in mouse model for optogenetic genome engineering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 213-217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------