

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22378

研究課題名（和文）新規光誘導型デグロンを用いた生命機能操作技術の創出

研究課題名（英文）Developing light inducible degron system in Drosophila

研究代表者

深谷 雄志（Fukaya, Takashi）

東京大学・定量生命科学研究所・准教授

研究者番号：00786163

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）：本研究では光依存的かつ発生段階特異的に標的タンパク質の機能を阻害する新規実験系の開発に取り組んだ。その結果、CRY2のオリゴマー化を介した異常凝集の誘導が、Bicoidなどの特定の転写因子の機能阻害に有効であることが明らかとなった。一方で、iLID-SspBシステムを介したタンパク質分解や、LINX/LEXYなどの光依存的な核外排出による機能阻害は、標的因子の特性に応じた最適化が必要であることが明らかとなった。本研究を通じて確立されたゲノム編集技術を応用することで、転写制御における高次ゲノム構造の機能解明や、転写バースト制御メカニズムの解明について大きな進展が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、近年精力的に開発されている光操作技術の実用性をショウジョウバエ個体レベルで多角的に検証した。その結果、培養細胞レベルでの解析で広く用いられてきた手法を個体レベルで応用するためには、標的タンパク質の特性に応じた最適化が必要であることが強く示唆された。本研究によって明らかとされた、転写制御における高次ゲノム構造の機能については、近年のHi-C解析などに明とされてきたTAD構造の生物学的意義を理解する上で重要な知見となる。また転写バーストを介した遺伝子発現の時空間的なパターン形成メカニズムの理解は、個体発生におけるゲノム機能を理解する上で重要な成果である。

研究成果の概要（英文）：In this project, we aimed to develop a novel experimental system to inhibit the function of target proteins in a light-dependent manner. We found that induction of aggregation via CRY2 oligomerization is effective in inhibiting the function of transcription factors such as Bicoid. On the other hand, proteasomal protein degradation via the iLID-SspB system or light-dependent nuclear export system such as LINX/LEXY requires further optimization of the experimental system in Drosophila. By applying the genome editing technology established through this project, significant progress has been made in elucidating the function of higher-order genomic structures in transcriptional regulation and the regulatory mechanism of transcriptional bursting in developing Drosophila embryos.

研究分野：分子生物学

キーワード：ショウジョウバエ オプトジェネティクス ライブイメージング 転写

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2005年に初めて報告されたオプトジェネティクス技術は、光によって神経細胞の活性を自在に操作することを可能にし、神経科学に革新をもたらした。しかし一方で、神経生物学の枠組みを超えて生命機能を操作する普遍的な光技術の開発には未だに至っておらず、その実現が待望されている。そこで本研究では、既存の枠組みを超えて生命科学の全分野に応用可能な新規オプトジェネティクス技術を創出し、生体内のあらゆるタンパク質機能を光によって操作する新規手法の開発に取り組むこととした。

### 2. 研究の目的

我々はこれまで、エンハンサーと呼ばれる非コード DNA 領域がどのように標的遺伝子の転写活性を制御しているのかという基本原理の解明に一貫して取り組んできた。これまでの転写研究で主流であった ChIP-Seq や RNA-Seq などの網羅的手法では、1) 必ずしも均一ではない培養細胞の 2) 集団で平均化された全体の挙動を 3) ある特定の時間でスナップショット的に解析することしかできないという大きな技術的制約が存在した。我々は既存技術の限界を突破するために、ショウジョウバエ初期胚を用いて一細胞解像度で転写活性を経時測定するライブイメージング技術を独自に構築し、かつてない時空間解像度で個体発生を司る転写制御機構を理解することを可能にしてきた。本計画によって新たに光誘導型デグロン技術を開発し、個別の転写因子やエピジェネティック因子の細胞内機能の光操作を実現することで、より詳細なエンハンサー作用機序の理解が実現するものと期待される。特に光操作技術と転写ライブイメージング技術を組み合わせることにより、転写動態制御における個別の因子の働きを 1 細胞レベルかつ高時間解像度で理解することが可能となる。その実現のためには光によって迅速かつ特異的に標的タンパク質の働きを操作する新規手法の確立が喫緊の課題であることから、本研究構想の立案に至った。本研究ではショウジョウバエ個体における発生運命の光制御を実現することにより、個体レベルで真に応用可能な汎用的光操作技術の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 光依存的に標的タンパク質をユビキチン化し、プロテアソーム系を介した分解を誘導するために、iLID システム (Guntas *et al.*, *PNAS* 2014) と呼ばれる光制御可能なタンパク質相互作用をショウジョウバエ初期胚へ導入した。本システムを用いることで、*Avena sativa* 由来の LOV2 ドメインと *ssrA* の融合タンパク質 (iLID) と *SspB* タンパク質との特異的な相互作用を、青色光を用いることで任意に制御可能であることが報告されている。そこで、ゲノム編集により分解の標的とするタンパク質の C 末端に iLID を付与した新規ショウジョウバエシステムを新たに作製した。標的タンパク質として、高次ゲノム構造の形成に重要な役割を果たす CTCF や Nipbl、Walp などの因子にタグ付けを行った。さらに iLID を介したタンパク質分解を誘導するため、*Oryza sativa* 由来の F-box タンパク質である TIR1 と *SspB* の融合タンパク質を発現する新規ショウジョウバエシステムを作製した。それらを掛け合わせ、得られた初期胚に青色光 LED を一定時間照射したのち、ウエスタンブロッティングなどによってタンパク質分解が光誘導可能かについて評価を行った。

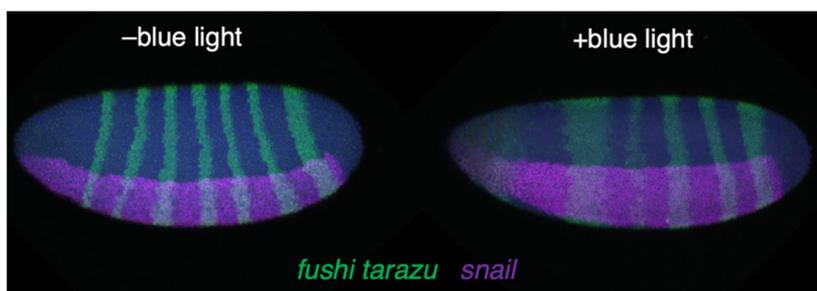
(2) iLID システム以外にも青色光の照射によって制御可能なタンパク質間相互作用として、*Arabidopsis thaliana* 由来の cryptochrome 2 (Cry2) と CIB1 が既に報告されている (Kennedy *et al.*, *Nature Methods* 2010)。加えて、CRY2 自身はそれ単体でオリゴマーを形成する活性を持つことから、標的タンパク質の異常凝集を誘導することで、生体内における機能をユビキチン/プロテアソーム系非依存的に標的因子の阻害することができる可能性も考えられる。iLID-SspB 相互作用に加えて、これらのシステムをショウジョウバエ初期胚に導入することで、光制御システムの実用化に向けた実験系の最適化を行った。ゲノム編集により標的とするタンパク質の C 末端に CRY2 を付与した新規ショウジョウバエシステムを新たに作製した。標的タンパク質として、高次ゲノム構造の形成に重要な役割を果たす CTCF や、前後軸の形成に必須の機能を果たすモルフォゲンである Bicoid などの因子を用いて実験的検証を進めた。

(3) 光依存的なタンパク質分解や、オリゴマー形成を介した異常凝集に加えて、第三のアプローチとして光依存的な局在制御によるタンパク質機能の阻害について検証を行った。具体的には LOV2 と NES の融合タンパク質からなる LINX や LEXY と呼ばれるアミノ酸配列を融合させることにより、核内タンパク質を光依存的に細胞質へ強制排除し、その機能阻害を試みた。ゲノム編集により標的とするタンパク質の C 末端に LINX や LEXY タグを付与した新規ショウジョウバエシステムを新たに作製した。標的タンパク質として、高次ゲノム構造の形成に重要な役割を果たす CTCF や、前後軸の形成に必須の機能を果たすモルフォゲンである Bicoid などの因子にタグ付けを行った。

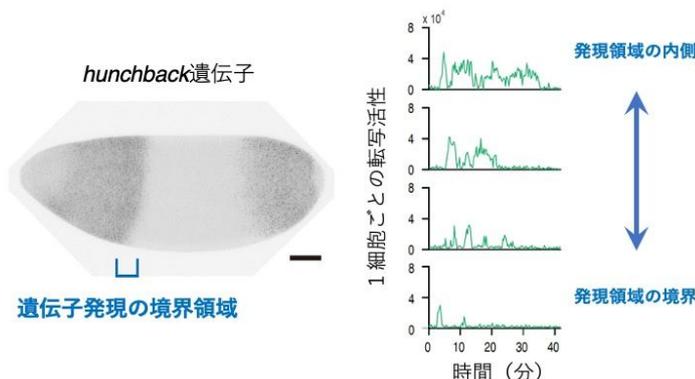
### 4. 研究成果

(1) C 末端に iLID タグを持つゲノム編集ショウジョウバエ系統を新規作製し、OsTIR1-SspB 発現ショウジョウバエと掛け合わせることで、標的タンパク質の光依存的な分解が誘導可能か検証を行ったが、顕著な差は検出されなかった。分解のトリガーとなる OsTIR1-SspB の発現量を上昇させるために、*αTub67C* などの強力なプロモーター配列を用いて同様の解析を行ったが、標的タンパク質の分解は見られなかった。そこで、OsTIR1 の代わりに、NSImb と呼ばれるショウジョウバエ由来の F-box タンパク質の N 末端領域と SspB の融合タンパク質を発現するショウジョウバエ系統を作製し、解析を行った。しかしながら CTCF や Nipbl、Wapl などの標的タンパク質の分解をウエスタンブロッティングレベルで検出することはできなかった。以上の結果から、iLID-SspB システムを用いて高次ゲノム構造を制御する因子の機能解析を行うことは、ショウジョウバエ初期胚では技術的に困難であることが示唆された。そこで代わりに、CRISPR/Cas9 を用いて内在ゲノムの特定領域から CTCF 結合部位を欠損させたショウジョウバエ系統を作製し、転写制御に及ぼす影響を解析することとした。その結果、ホメオティック遺伝子である *Sexcombs reduced* の初期胚における転写活性化には、SF1 と呼ばれる CTCF 結合部位が必須の役割を果たしていることを明らかにした (Yokoshi *et al.*, *Molecular Cell* 2020)。

(2) プロテアソーム系を介した標的タンパク質の分解について、CRY2/CIB1 を用いて (1) と同様の解析を行ったが、ショウジョウバエ初期胚における光依存性なタンパク質分解は観察されなかった。そこで代わりに CRY2 自身のオリゴマー形成を介した標的タンパク質の機能阻害について検証を行った。Bicoid の C 末端に CRY2 を付与したショウジョウバエ系統を新規作製し、得られた初期胚に青色光 LED を照射したのち、Fluorescence in situ hybridization 解析を行った。その結果、Bicoid の標的遺伝子である *fushi tarazu* 遺伝子の anterior 側における発現が光依存的に顕著に阻害される様子が観察された。さらに、光刺激を与えた初期胚は cephalic furrow が正常に起こらないなどの重篤な発生異常を生じることが明らかとなった。次に CRY2 システムを用いて CTCF などのゲノム構造化因子の機能阻害を試みた。これらの因子は生育に必須であることが既に知られているが、光刺激を与えたショウジョウバエにおいて遺伝子の発現異常や発生不全は観察されなかった。このことから、CRY2 システムを用いた標的タンパク質の機能阻害は、ある特定の標的因子との組み合わせでしか働かないことが示唆された。最後に LINX、および LEXY を Bicoid や CTCF の C 末端領域に融合させたゲノム編集系統を新規作製し、光依存的な核内排出を介した機能阻害が誘導可能かについて検証を行った。しかしながら本手法についても明確な表現型の変化は観察されなかった。以上の結果から、ショウジョウバエ個体レベルでの光操作技術の確立には、個別の因子の特性に応じた条件検討と最適化が必要であることが強く示唆された。



(3) 本研究において確立されたショウジョウバエ個体レベルでのゲノム編集技術を応用し、内在遺伝子の 3'UTR へ MS2 配列を付与した新規系統をシステムティックに作製した。MS2/MCP ライブイメージングによって転写活性の時空間動態を定量解析した結果、転写バーストの連続性が初期胚内の相対的な位置に応じて柔軟に変化することにより、遺伝子発現の空間的なパターンが形成されていることが明らかとなった (Fukaya, *Current Biology* 2021)。



(4) ショウジョウバエ初期胚における転写バーストの制御におけるコアプロモーター領域の機能を明らかにした。特に TATA-box はバーストの振幅と頻度の制御に寄与しているのに対し、Initiator、MTE、DPE は頻度の制御にのみ働いているという機能的な違いが存在することを世界に先駆けて明らかとした (Yokoshi and Kawasaki *et al.*, *Nucleic Acids Research* 2022)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokoshi Moe, Kawasaki Koji, Cambon Manuel, Fukaya Takashi	4. 巻 50
2. 論文標題 Dynamic modulation of enhancer responsiveness by core promoter elements in living Drosophila embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 92 ~ 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab1177	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 Eritano Anthony S., Bromley Claire L., Bolea Alberio Antonio, Schutz Lucas, Wen Fu-Lai, Takeda Michiko, Fukaya Takashi, Sami Mustafa M., Shibata Tatsuo, Lemke Steffen, Wang Yu-Chiun	4. 巻 53
2. 論文標題 Tissue-Scale Mechanical Coupling Reduces Morphogenetic Noise to Ensure Precision during Epithelial Folding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 212 ~ 228.e12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2020.02.012	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 Hamamoto Kota, Fukaya Takashi	4. 巻 74
2. 論文標題 Molecular architecture of enhancer-promoter interaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 62 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cceb.2022.01.003	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 Fukaya Takashi	4. 巻 未定
2. 論文標題 Dynamic regulation of anterior-posterior patterning genes in living Drosophila embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.02.050	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 Moe Yokoshi, Kazuma Segawa, Takashi Fukaya	4. 巻 VOLUME 78, ISSUE 2
2. 論文標題 Visualizing the Role of Boundary Elements in Enhancer-Promoter Communication	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 224-235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2020.02.007	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5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Takashi Fukaya
2. 発表標題 Transcription dynamics in living Drosophila embryos
3. 学会等名 JSDB/APDBN Symposium RNA, Stem Cells, Technology in Development (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Fukaya
2. 発表標題 Transcription dynamics in living Drosophila embryos
3. 学会等名 The 1st ASHBi SignAC workshop (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Fukaya
2. 発表標題 Regulation of transcriptional bursting in living Drosophila embryos
3. 学会等名 日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Fukaya
2. 発表標題 Regulation of transcriptional bursting in living Drosophila embryos
3. 学会等名 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Fukaya
2. 発表標題 Regulation of transcriptional bursting in living Drosophila embryos
3. 学会等名 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020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

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