

遺伝子発現ダイナミクスの人工光制御とその応用

磯村 彰宏

近年、光遺伝学（オプトジェネティクス）と呼ばれる、光応答性のタンパク質を利用した細胞機能の人工光制御技術が急速に発展してきている。当初は神経細胞の電気活動を介した動物個体の行動制御が主な応用対象であったが、技術進展に伴って多様な生化学的イベントを非常に高い時空間分解能で操作できることが相次いで報告された。その結果、細胞活動における転写因子や酵素分子の動的機能について、そのダイナミクスが担う生物学的意義を単なる相関関係を越えて構成的に検証することが可能となりつつある。本稿では、遺伝子発現活性や生体分子の酵素活性を対象とした光遺伝学技術を概観するとともに、哺乳動物細胞における遺伝子発現ダイナミクスを題材とした応用例を紹介したい。

遺伝子発現ネットワークの動的側面

遺伝子発現のOn/Off制御は細胞におけるもっとも基本的な生化学的イベントである。ゲノム解読技術の革新などによって、遺伝子および生体分子間の相互作用ネットワーク（遺伝子発現ネットワーク）の網羅的な情報が手に入るようになった。細胞内の生体分子群は正と負の制御の組合せに基づいた無数のフィードバック回路網を形成しており、その複雑な制御ネットワークの詳細な全体像が大腸菌からヒトに至るさまざまな生物種で明らかとなりつつある。

さらに、GFPに代表される蛍光タンパク質をはじめとする生細胞イメージング技術が発展し、細胞内部の動的ダイナミクスを1細胞レベルで非侵襲的かつ経時的に生きたままの状態を追跡することが可能となった。たとえば、関心のある遺伝子のプロモーターの下流に蛍光タンパク質を融合させたレポーター遺伝子を細胞内に導入することによって、個々の細胞の遺伝子発現活性を蛍光顕微鏡観察によって生きたまま経時的にモニターできる。また、特定の酵素と相互作用するタンパク質から、酵素活性に応じて分子構造や細胞内局在に変化が生じるような機能ドメインを切り出して蛍光タンパク質と融合することで、多様な酵素活性を1細胞レベルでモニターすることが可能となった。

これらの背景から、遺伝子発現のOn/Off制御に関与する細胞内の転写因子ネットワークの動的描像が明らか

となり、さまざまな生命現象においてパルス振動や双安定スイッチなどの動的現象が創発していることが認識されるようになった。重要なことに、これらのダイナミクスの背景には負のフィードバックループ、正のフィードバックループといったネットワークのモチーフ構造が必ず存在し、これは生物種や分子種を問わない普遍的な設計原理である¹⁾。このことは、ネットワークモチーフを使った人工遺伝子回路を基盤とする振動発振やトグルスイッチの構築実験によって鮮やかに示された²⁻³⁾。

哺乳動物細胞における遺伝子発現ダイナミクス

このように細胞内部のネットワーク構造の理解が進んできた中、ここ10年の間で、哺乳動物細胞のさまざまなシグナル伝達経路において2~3時間の周期的ダイナミクス（遺伝子発現リズム、短周期生物時計）の存在が明らかになってきた。これは、化学分野でよく知られているピコ秒以下の時間スケールの分子化学反応や分子振動とはまったく異なり、“min~hour”の特徴的な時間スケールを有した「生体分子(RNAおよびタンパク質)の個数の増減ダイナミクス」である。これらの振動は、細胞増殖、発生・分化、DNA修復、免疫応答、などのさまざまな生命現象で発見され、重要性が明らかになりつつある⁴⁻⁶⁾。

たとえば、Notchシグナルの下流のエフェクター因子である転写因子Hes1やHes7は、神経発生・体節形成において2~3時間周期で振動している¹¹⁻¹²⁾。活発に分裂を続けている神経幹細胞ではHes1の転写活性が振動しているが、Hes1を持続的に発現させると増殖が抑制される(図1A)。また、マウス線維芽細胞に腫瘍壊死因子(TNF)を添加すると、炎症反応に関連する遺伝子群が誘導される。このとき、NF- κ Bの局在が核-細胞質間を約90分の周期で振動する(図1B)⁹⁾。一方で、LPSを添加すると振動が起らず持続的な活性化が起こり、免疫応答に関連する遺伝子群が活性化される¹⁰⁾。また、ヒト上皮細胞に γ 線照射によってDNA二重鎖の損傷を与えると、細胞周期が停止してDNA修復経路が作動する(図1C)。このとき、p53の個数が4時間周期で振動する⁷⁾。しかしUV光照射によって損傷が与えられた場合は振動は起らず、p53の持続的な活性化が起こる⁸⁾。また、

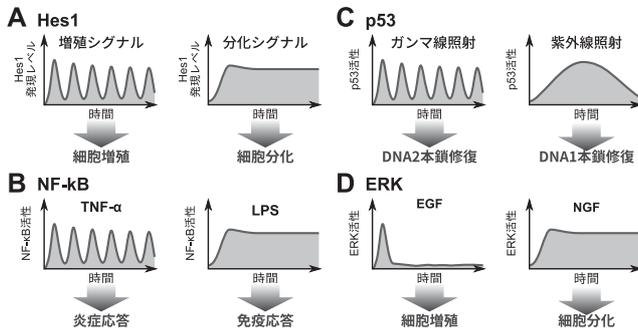


図1. 哺乳動物細胞における短時間スケールの遺伝子発現ダイナミクス. Isomura, A. and Kageyama, R.: *Development*, **141**, 3627 (2014). より改変.

MAPK経路の下流因子のERKはEGFまたはNGFによって活性化される。ラット副腎褐色細胞種由来のPC12細胞の場合、EGF添加ではERKの活性はパルス的に応答して細胞増殖が継続するが、NGFを添加するとERKが持続的に活性化され、神経分化が起こる(図1D)¹³⁻¹⁵⁾。

以上の例から、生体分子のダイナミクス(振動か持続的か)と、細胞機能の出力(分裂・増殖を続けるか、分化するか)の間に関連性があることがわかった。このことは、特定の生体分子の有無と細胞機能が1対1に対応しているというような従来の描像とは異なる制御様式が存在を示唆している。すなわち、一つの生体分子がダイナミクスに情報をコーディングすることが可能であり、その結果として一つの生体分子であるにも関わらず複数の細胞機能の出力を制御・誘導できるという可能性が認識されるようになった。

光遺伝学的手法による生体分子のダイナミクス制御

上記の知見は、いずれも1細胞イメージングによる現象の観察・計測によって得られたものであり、そこから導ける結論はダイナミクスと生物学的出力との間にある相関関係に留まっている。そのため、ダイナミクスが生物学的出力にとっての「必要条件」であることは主張できるが、ダイナミクスが生物学的出力を誘導できるような「十分条件」であるかどうかは分からない。すなわち、生体分子の動的ダイナミクスが本当にさまざまな生命現象を誘導・制御しているのかどうかは明らかではない。

このような問いに答えるためには、興味がある生体分子のダイナミクスを細胞内で人工的に再構成し、それに伴う生物学的出力を観察する必要がある。そのためには、生体分子の活性を高い時間分解能で人工的に制御可能な新しい技術が必要である。光はタイミング、強度、照射範囲などを制御することが容易であると同時に、細胞にとって非侵襲的であるため、細胞機能の光操作技術は制

御手法としてきわめて有用であると考えられる。

2005年に、遺伝子上にコードされた光応答性タンパク質をショウジョウバエの神経細胞に発現させることで神経発火を光誘導し、動物個体の行動を光によって制御できることが示された¹⁶⁾。さらに、哺乳類の神経細胞だけでなく自由行動下のマウス個体の神経活動を制御可能であることが実証され、光遺伝学(オプトジェネティクス)と名付けられた。光応答物質を遺伝子上にコードできるということはすなわち、プラスミドやウイルスなどのベクターさえ準備できれば任意の光応答性タンパク質を細胞・組織内に導入できるということであり、これまで蓄積されてきた遺伝子工学の技術がそのまま応用できることを意味する。この光遺伝学技術はこの10年で爆発的に普及し、今では神経科学分野で必須のツールとして定着している¹⁷⁾。

一方で、神経活動以外の生命現象の光制御技術は比較的ゆるやかに発展してきた。2003年にシロイヌナズナ由来のPhyB-PIFの系を酵母に導入することによって、赤色光/遠赤外光によって遺伝子発現活性のOn/Off制御が可能なが初めて実証された¹⁸⁾。それ以降、植物から細菌に至るまでのさまざまな生物種で発見された光応答タンパク質の光感受性ドメインを使った人工キメラタンパク質を作ることによって、多様な生化学活性を自在に光制御できることがわかってきた¹⁹⁻²²⁾。その中でも、青色光に反応するフラビントタンパク質を使った光遺伝学ツールがここ5年程度の間数多く報告されており、そのバリエーションも多彩である。

フラビントタンパク質はFADやFMNなどのリボフラビンの誘導体と結合することで青色光に反応することができる。重要なことは、FADやFMNは動物細胞内においても自然に生産されているという点である。前述のPhyB-PIF系の場合、植物系の細胞以外では生産されていない発色団PCBの添加を必要とするため、動物個体などでの応用事例では不利となる可能性がある。また、青色光で活性化されたタンパク質は、暗条件に置いておくとも活性化状態が不活化して元の状態に戻る(dark reversion)。そのため、青色光を繰り返し照射するだけで、望みの生化学イベントを周期的に誘導できる利点がある。

現在までに報告されている青色光応答性のフラビントタンパク質を使った光制御系は、大別して(1)単独のタンパク質で構成される系、(2)2種のタンパク質で構成される系、の二通りに分けることができる。

まず、単独のタンパク質で構成される系においては、光照射によって誘導された構造変化によって機能ドメイ

ンが活性化する。このとき、機能ドメインは酵素活性・2量体化・多量体化・分解などの生化学的イベントを担う機能ドメインを選択する。たとえば、Wuらはエンバクのフォトトロピン1由来のLOVドメインを青色光感受部位として、GTPaseのRac1と融合することで細胞走性の青色光照射による誘導に成功している²³⁾。また、Wangらは、アカパンカビ由来のLOVドメインをGal4由来のDNA結合部位とp65転写活性化領域と融合させた人工転写因子GAVPOを作製し、哺乳動物細胞における青色光誘導性の転写活性化システムを作製し、LightOnシステムと名付けた²⁴⁾。GAVPOは、暗条件では単量体として存在するが、青色光照射によって2量体化する。すると、Gal4由来DNA結合がDNA結合能を獲得し、UASプロモーターに結合して任意の遺伝子の転写を活性化できる。

次に、2種のタンパク質X、Yから構成され、光照射によってヘテロダイマーの形成（物理的なタンパク質間相互作用）を誘導できる系があげられる。たとえばタンパク質の中には、細胞膜近傍に局在化することで酵素活性が上昇するものがある。そのような酵素活性部位をタンパク質Xに融合し、タンパク質Yに細胞膜局在化シグナルを融合することで、光誘導的に酵素活性を誘導できる。Yazawaらは、シロイヌナズナ由来のGigantea-FKF1のペアを使って、青色光誘導的にRac1を細胞膜近傍にリクルートすることで、膜上突起の形成を局所的に誘導できることを示した²⁵⁾。他の組合せの例としては、タンパク質XをDNA結合タンパク質と融合し、タンパク質Yを転写活性化ドメインと融合することで、遺伝子発現を光活性化することができる。最近では、DNA結合タンパク質としてCRISPR-Cas9システムのヌクレアーゼ活性部位を不活化したdCas9を使うことで、ゲノム上の任意の遺伝子座の転写活性を光誘導することも可能となった^{26,27)}。

生体分子活性の光誘導による細胞機能の人工制御

以上の背景から、生体分子のダイナミクスを細胞内で人工的に光誘導し、それに伴う細胞の応答を観察するという実験系を構築することが可能となってきた。

筆者らはLightOnシステムを使って短時間(2~3時間)周期でOn/Off可能な人工的な転写発現リズムを創成できることを見いだした。そして、この光制御技術を神経幹細胞における短周期リズムの機能的意義の解明に応用した²⁸⁾。神経幹細胞では、1細胞ライブイメージングによる結果から、転写因子Hes1の下流因子である転写因子Ascl1もまたタンパク質レベルの発現が振動している

ことが分かった。また、神経幹細胞が増殖を止めてニューロンに分化する過程では、Ascl1の発現ダイナミクスが振動的な状態から持続的な状態にスイッチすることが分かっていた。そこで、Ascl1の発現ダイナミクスが増殖・分化といった幹細胞の運命決定を誘導するための十分条件かどうかを確認するため、Ascl1欠損神経幹細胞にAscl1を光誘導可能にするLightOnシステムを導入し、振動的または持続的な光照射を与えて細胞の応答を観察した。その結果、Ascl1の持続的な発現がニューロンへの分化を誘導するのに対し、Ascl1の3時間周期の振動が神経幹細胞の増殖を促進することが分かった(図2A)。このことから、Ascl1は発現ダイナミクスを制御することによって増殖又は分化の方向性を決定できるということが示された。

またAokiらは、シロイヌナズナ由来のCRY2-CIB1を使って、青色光誘導的にRafを活性化できるシステムを構築した²⁹⁾。このシステムでは、CIB1を細胞膜上に局在させると同時に、CRY2と融合したcRafを発現させることで、青色光誘導的にRafを細胞膜近傍にリクルートすることができ、その結果、下流のMEK、ERKの活性化を誘導できる。これを応用して、Rafの下流に位置するERKのダイナミクスの生物学的意義を調べた結果、振動的にERKのダイナミクスを誘導すると増殖が亢進したが、持続的な誘導では亢進しないことが分かった(図2B)。さらに、RNA-seqによる網羅的解析から、振動条件と持続条件において誘導されてくる遺伝子群に違いがあることも分かった。このことから、細胞増殖におけるERKのダイナミクスの生物学的意義が構成的に明らかにされた。

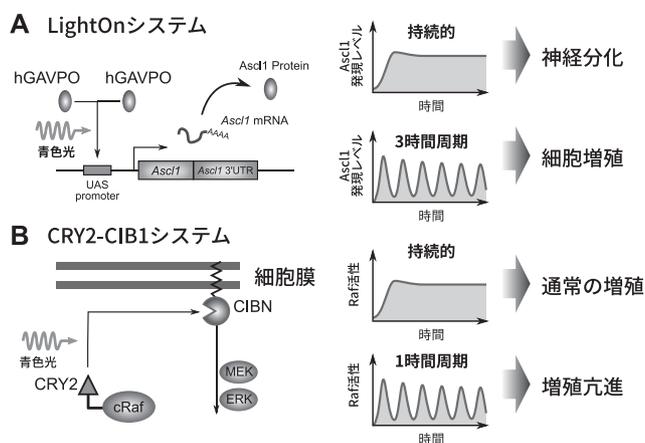


図2. 生体分子活性の光誘導による細胞機能の人工制御。Isomura, A. and Kageyama, R.: *Development*, **141**, 3627 (2014). より改変。

光を眺める生物学から光を利用する生物学へ

計測と制御は実験科学全般に共通のもっとも重要な手続きである。遺伝子発現の短時間スケールのダイナミクスの研究分野においては、1細胞イメージングによる計測手法はある程度確立されてきた。一方で、制御手法は従来のTetシステムなどの化合物による誘導系は必ずしも時間精度が十分とは言い難く、人工的制御による仮説の検証が困難な状況にあった。本稿で紹介した光遺伝学技術は、これまで不可能であった生体分子の動的機能を構成的に明らかにするための不可欠な技術として発展していくと考えられる。さらに、合成生物学が指向する、「細胞機能の人工制御によるシステム特性の解明」といった目標を実践・促進するための基盤技術としても貢献していくものと期待される。

文 献

- 1) Alon, U.: *Nat. Rev. Genet.*, **8**, 450 (2007).
- 2) Elowitz, M. B. and Leibler, S.: *Nature*, **403**, 335 (2000).
- 3) Gardner, T. S. *et al.*: *Nature*, **403**, 339 (2000).
- 4) Purvis, J. E. and Lahav, G.: *Cell*, **152**, 945 (2013).
- 5) Levine, J. H. *et al.*: *Science*, **342**, 1193 (2013).
- 6) Isomura, A. and Kageyama, R.: *Development*, **141**, 3627 (2014).
- 7) Lahav, G. *et al.*: *Nat. Genet.*, **36**, 147 (2004).
- 8) Batchelor, E. *et al.*: *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 488 (2011).
- 9) Nelson, D. E. *et al.*: *Science*, **306**, 704 (2004).
- 10) Hoffmann, A. *et al.*: *Science*, **298**, 1241 (2002).
- 11) Hirata, H. *et al.*: *Science*, **298**, 840 (2002).
- 12) Shimojo, H. *et al.*: *Neuron*, **58**, 52 (2008).
- 13) Marshall, C.: *Cell*, **80**, 179 (1995).
- 14) Sasagawa, S. *et al.*: *Nat. Cell Biol.*, **7**, 365 (2005).
- 15) Santos, K. S. *et al.*: *Nat. Cell Biol.*, **9**, 324 (2007).
- 16) Lima, S. Q. *et al.*: *Cell*, **121**, 141 (2005).
- 17) Deisseroth, K.: *Nat. Meth.*, **8**, 26 (2011).
- 18) Shimizu-Sato, S. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1041 (2002).
- 19) Gautier, A. *et al.*: *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 533 (2014).
- 20) Conrad, K. S. *et al.*: *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 801 (2014).
- 21) Tischer, D. and Weiner, O. D.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 551 (2014).
- 22) Pudasaini, A. *et al.*: *Front. Mol. Biosci.*, **2**, 1 (2015).
- 23) Wu, S. *et al.*: *Nature*, **461**, 104 (2009).
- 24) Wang, X. *et al.*: *Nat. Meth.*, **9**, 266 (2012).
- 25) Yazawa, M. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **27**, 941 (2009).
- 26) Nihongaki, Y. *et al.*: *Chem. Biol.*, **22**, 169 (2015).
- 27) Polstein, L. R. *et al.*: *Nat. Chem. Biol.*, **11**, 198 (2015).
- 28) Imayoshi, I. *et al.*: *Science*, **342**, 1203 (2013).
- 29) Aoki, K. *et al.*: *Mol. Cell*, **52**, 529 (2013).