

研究報告書

「遺伝子発現の光制御と光計測による生体分子の動的機能の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 12 月～2019 年 3 月

研究者: 磯村 彰宏

1. 研究のねらい

光科学技術の発展は、制御と計測に基づく精密実験科学の実践を広範な分野で牽引してきた。しかし、細胞レベルの生命現象の最も基本的なプロセスである遺伝子発現については、その制御・計測技術の精度不足が課題となっていた。

計測技術については、蛍光イメージングなどの光計測技術の発展によって、遺伝子発現の On/Off 制御に関与する細胞内の生体分子ネットワークの動的描像が明らかとなった。その結果、哺乳動物細胞の様々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た。これは、“min～hour”の特徴的な時間スケールを有した「生体分子(RNA 及びタンパク質)の個数の増減ダイナミクス」である。この振動現象は細胞増殖、発生・分化、DNA 修復、免疫応答、などの生命現象で発見され、幹細胞・ガン細胞・免疫細胞などにおける重要性が明らかになりつつある。

しかし、遺伝子発現ダイナミクスがどのようにして多様な生命現象を誘起しているのか、すなわち「生体分子の個数増減の周波数情報に隠された生物学的機能」は未だ解明されていない。その原因は、多くの研究が必須遺伝子(必要条件)の同定を目的とした現象の観察・計測実験に留まっており、遺伝子発現の人工制御による動的機能(十分条件)の検証が行われて来なかった為である。よって、この問題を解決するためには、生体分子数の動的ダイナミクスを自在に制御すると同時に細胞の内部状態を計測する技術確立が必要がある。

そこで本研究では、光による遺伝子発現ダイナミクスの制御と計測を同時に実現する技術確立することを目指した。そしてその技術を活用し、「いつ、どこで、どの生体分子が、どれくらいの周期で増減することで細胞の生体情報を制御しているのか」といった問いに答えることで、生体分子の動的機能を明らかにすることを目的とした研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、哺乳動物細胞における転写発現の振動現象に着目し、個々の細胞が転写活性の動的パターンをどのように情報処理しているのかを明らかにするための研究を行った。そのために、光遺伝学技術によって転写活性を人工制御すると同時に、発光・蛍光イメージングによって1細胞レベルの動的応答の精密計測を可能にする融合的な技術基盤を確立した。さらにそれを応用して、細胞が転写活性の動的情報を送受信する過程を光によって再構成し、その動的パターンを精密定量計測した。その結果、動的情報処理における数学的ルール(位相応答曲線に基づく確率的位相ダイナミクス)の検証、動的情報送信を実現するのに十分な生体分子の同定、さらに情報送信過程の時定数(送信速度)の精密測定に成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「遺伝子発現ダイナミクスの高精度光制御」

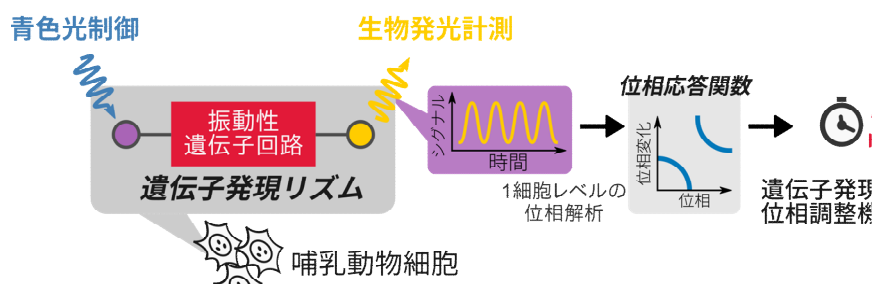
本研究ではまず、転写活性の光制御を高精度の時間分解能で実現する基盤技術の確立に取り組んだ。具体的には、青色光誘導性の転写活性化システムである LightOn システム(Wang et al. Nat. Meth. (2012).)の応答を更に加速化させることを試みた。LightOn システムは、光応答性の人工転写因子 GAVPO と、UAS プロモーターの発現力セットから構成されている。それら構成要素について遺伝子改変を検討した結果、特に UAS プロモーター下流の 3' UTR 配列を IL-2 遺伝子由来のものに置換した場合、1.5 時間で速やかにリセットされるパルス的な応答パターンを光誘導できることがわかった。一方で、Hes1 3' UTR に置換した場合も、約 3 時間でリセットされるパルス応答が観察され、2 時間周期の転写発現リズムを光誘導できること、光誘導される正味の発現量は IL-2 3' UTR よりも大きいことがわかった。

研究テーマ B 「光摂動実験による遺伝子発現リズムの動的応答特性の 1 細胞定量解析」

次に、応答を加速化した改変型 LightOn システムを用いて、Hes1 短周期リズムに様々な周期・強度の光摂動を与え、動的応答特性を定量計測した。まず、Notch シグナルの不活性化因子の Hes1 を周期的に光誘導すると同時に、短周期リズムのダイナミクスを Hes1 転写活性の生物発光レポーターによって 1 細胞レベルで可視化できる細胞株(筋芽細胞株 C2C12 を使用)を樹立し、動的応答を定量計測した。

その結果、内在性短周期リズムを外部からの光摂動の周期に引きこみ同調させることに成功した。また、引き込み可能な摂動周期の帯域は、約 1.5~5.5 時間と非常に幅広いことが分かった。そこで、どの周期が最も効率よく引き込み同調できる条件なのかを明らかにするため、1 細胞レベルの転写活性の周期的ダイナミクスの位相分布を解析し、その集団同期の度合いをエントロピーに基づいた統計量によって定量した。その結果、2.75 時間と 5.5 時間周期の光摂動条件でピークが観察され、非線形振動子に特徴的な引き込み同調が起きていることがわかった。また、光摂動の前後における位相シフト量をプロットして移動平均を取った結果、位相応答曲線が可視化できた。これは、振動子に摂動が加わった際に位相(時計の時刻)をどの程度前進または後退させるべきかを規定するための定量的な動的応答のルールが存在を示すものである。さらに、振動子の自然周期、周期の分布関数、位相応答関数といった 3 つの測定パラメータを元に確率的位相振動子モデルの発展方程式を数値シミュレーションしたところ、引き込み同調過程がよく再現された。以上の結果から、Hes1 の転写活性ダイナミクスは 1 細胞レベルで周期を維持し

遺伝子発現リズムが外部入力に同調するメカニズムの定量的理解



つつ外部刺激に同調も可能な非線形振動であり、そのダイナミクスが確率的位相振動子モデルでよく説明できることが明らかとなった。

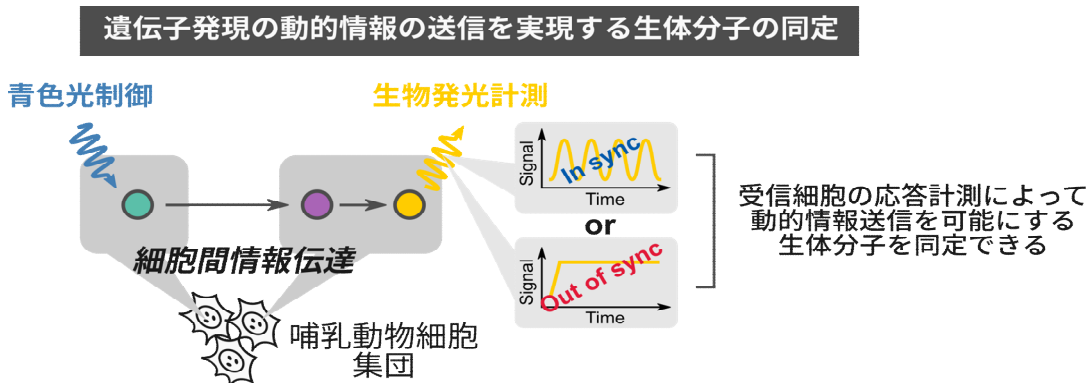
研究テーマ C 「細胞間の動的情報伝達を可能にする生体分子群の解明」

多細胞生物において遺伝子発現の細胞間相互作用はリガンド及びレセプター(受容体)と呼ばれる送受信機能を担う生体分子によって実現される。しかし、細胞がパルス振動などの動的状態を自分以外の細胞にどのように伝達しているのかは十分に明らかになっていない。例えばマウスの発生期の体節形成過程では Notch シグナルが 2~3 時間周期で振動して細胞集団レベルで位相が同期していることが知られている。この同期現象の存在は、細胞が振動情報の送受信機能を備えており、細胞同士がお互いの位相情報を交換して自分の位相を合わせていることを示唆している。しかし、細胞がどの生体分子を使って実際に動的情報を隣接細胞に伝達し、さらに周期や位相などの時間情報を解読できるのかどうかは明らかではなかった。

そこで、遺伝子発現リズムの周期・位相といった動的情報の細胞間伝達を可能にする最小要素を同定するため、Notch シグナルを介した遺伝子発現リズムの細胞間位相同期現象を光遺伝学技術によって再構成することを試みた。具体的には、Notch シグナルの制御に関わる生体分子の振動ダイナミクスを光遺伝学技術によって人工的に誘導・再構築した。それと同時に、遺伝子活性の生細胞観察を可能にする生物発光レポーターを用いることで、光振動に対する受信細胞の動的応答を 1 細胞経時イメージングによって定量計測した。

その結果、リガンド分子の Dll1 の発現を光制御可能な送信細胞と、隣接細胞の Dll1 からの刺激に伴う応答を発光によって光計測可能な受信細胞の 2 種類の細胞を混在させて培養して周期的光刺激を与えた結果、受信細胞の周期的な応答が観察できた。この動的情報伝達の再構成実験の結果は、リガンド分子の Dll1 の発現ダイナミクスが周期・位相の動的情報の細胞間伝達を実現するのに十分であることを示している。さらに、受信細胞を直接光刺激した場合と、送信細胞を介して光刺激した場合の時間差を計測することで、細胞間の情報伝達に必要な時間が 50.9 ± 4.3 分であることを見出した。

以上の結果から、光遺伝学による制御技術と生細胞イメージングの計測技術を組み合わせることによって、遺伝子発現の動的情報が細胞間で送信・解読されるための情報処理機構を解明できることがわかった。



3. 今後の展開

本研究によって、哺乳動物細胞における遺伝子発現ダイナミクスの光制御と光計測の基盤技術が整備された。そして、細胞が転写活性の動的情報を送受信する過程を、光で再構成しながら光で精密に定量計測できるようになった。転写活性の動的情報は、胚発生における規則的な組織構造を形成する局面で特に重要であると考えられている。一方で、本研究はその一面を切り取って再構成したに過ぎない。今後は、光制御と光計測の融合的技術を動的な時空間パターンが自発的に生成する培養細胞集団に適用することが必要である。特に幹細胞工学によって得られるオルガノイドなどの培養系に出現する精緻な組織構造を本手法で調べることで、生命現象における自己組織化の原理が明らかになることが期待される。

4. 自己評価

本研究の提案時に掲げた、遺伝子発現ダイナミクスにおける計測と制御の融合については、細胞間情報通信の定量解析といった具体例で実証できた。特に、これまで定性的な機能評価に限定されてきた送信機能を担うとされる Notch シグナルのリガンド分子の動的特性について、具体的な数値で相互に比較可能な手法を確立できた。本手法は、Notch シグナル伝達経路に限らない様々なシグナル伝達経路における細胞間の情報通信プロセスに適用可能であり、応用範囲の拡大を期待している。一方で、細胞間通信以外を担う生体分子の動的機能については課題が残っており、今後の研究を通して解決していきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- 1.*H. Shimojo, A. Isomura, T. Ohtsuka, H. Kori, H. Miyachi, *R. Kageyama, "Oscillatory control of Delta-like1 in cell interactions regulates dynamic gene expression and tissue morphogenesis", *Genes Dev.* **30**, 102-116 (2016).
2. *A. Isomura, F. Ogushi, H. Kori, *R. Kageyama, "Optogenetic perturbation and bioluminescence imaging to analyze cell-to-cell transfer of oscillatory information", *Genes Dev.* **31**, 524-535 (2017).
3. M. Matsumiya, T. Tomita, K. Y.-Kobayashi, A. Isomura, *R. Kageyama, "ES cell-derived presomitic mesoderm-like tissues for analysis of synchronized oscillations in the segmentation clock", *Development* **145**, dev156836 (2018).

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【国際会議・招待講演】

1. "Illuminating information transfer in genetic oscillators by optogenetics" ,iCeM24th International Symposium "Emerging Science for Unlocking Cell's Secrets", Sep.. 3rd, 2018 (iCeMS, Kyoto Univ.).

2. “Illuminating information transfer in genetic oscillators by optogenetics”, Joint Annual Meeting of 70th JSCB and 51st JSDB S10 “Optical Visualization and Manipulation of Cellular Function in Cell and Developmental Biology”, Jun. 8th, 2018 (Tower-hall Funahori, Tokyo).
3. “Illuminating gene expression dynamics by optogenetics”, The 4th Biomedical Imaging and Sensing Conference 2018 (BISC2018) “BISC3: Optical Imaging of Multimodal and Biomedical Information”, Apr. 26th, 2018 (Pacifico Yokohama).

【解説・総説】

1. 磯村 彰宏「遺伝子発現ダイナミクスの人工光制御とその応用」 生物工学, **94**, 194–197 (2016).
2. “Illuminating information transfer in signaling dynamics by optogenetics”,
*A. Isomura, *R. Kageyama, Curr. Opin. Cell Biol. **49**, 9–15 (2017).
3. “An Optogenetic Method to Control and Analyze Gene Expression Patterns in Cell-to-cell Interactions.”, *A. Isomura, *R. Kageyama J. Vis. Exp. 57149 (2018).