

論文の内容の要旨

論文題目 Photoactivatable CRISPR-Cas9 systems for
optogenetic genome engineering

(ゲノムの光操作を実現する光活性化型 CRISPR-Cas9 システムの開発)

氏名 二本垣 裕太

■研究の背景と目的

生命現象における個々の遺伝子の役割を明らかにするには、研究対象とする遺伝子の配列や発現を狙った細胞とタイミングで制御する技術が必須である。近年、細菌や古細菌が持つ CRISPR 獲得免疫システムを構成するタンパク質である Cas9 を応用する事で、遺伝子配列の改変を簡便に行えるようになった。Cas9 は、ガイド RNA と複合体を形成し、ガイド RNA の 5'末端に相補的な DNA 配列をゲノム上から検索し切断する(図 1A)。この DNA の二本鎖切断が、細胞内で修復される事を利用して、遺伝子機能の破壊、変異導入や外来遺伝子の挿入などが行える(図 1B)。更に、DNA 切断酵素活性を失った Cas9 (dCas9)の開発により、対象遺伝子の発現制御も可能になった。本研究では、この標的遺伝子の配列や発現を変えられる Cas9, dCas9 と、光受容タンパク質を組み合わせ、光で狙った時と空間でのみ、標的遺伝子の配列改変・発現制御を行う光活性化型 CRISPR-Cas9 技術を開発

した。本技術は、ゲノム編集の光遺伝学的操作を実現した世界初の例であり、遺伝子機能解析における強力なツールとなる事だけでなく、光による遺伝性疾患の治療等の新しい医療技術としての応用も期待される。

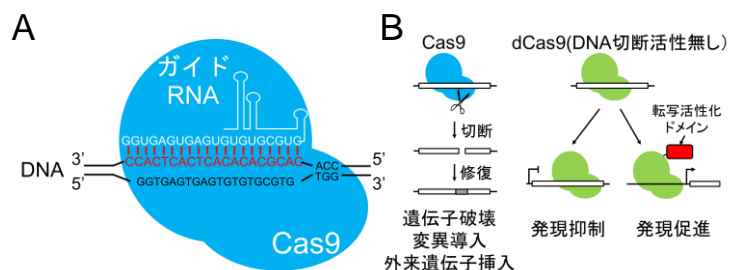


図 1:(A) ガイド RNA によって標的遺伝子に結合・切断する Cas9

(B)遺伝子配列の改変操作を行う Cas9 と遺伝子発現制御を行う dCas9

■研究①「遺伝子配列の改変及び発現抑制を光制御する光活性化型 Cas9 の開発」

本研究では、Cas9 分割体と光受容タンパク質 pMag, nMag を用いて、標的遺伝子の改変と転写抑制化を光制御するシステムの開発に取り組んだ(学位論文, Chapter 2)。Cas9 を N 末端断片と C 末端断片に分割し、それぞれに pMag と nMag を連結した(図 2)。この pMag と nMag も、青色光照射依存的に結合・解離する性質を持つ。暗所では、分割体は離れており Cas9 としての活性を持たないが、青色光が照射されると、pMag と nMag が結合する事に伴い、Cas9 断片同士が近接・再構成され Cas9 の活性が生じる。本システムが導入されたヒト細胞において、光依存的に効率よく標的配列を改変できる事が確認できた。また、光照射領域を限定することで狙った領域における遺伝子改変が可能であり、光照射の中止で Cas9 活性を止められる事を示した。更に、酵素活性を失わせた光活性化型 dCas9 を使い、標的遺伝子の転写抑制化を光制御する事に成功した。

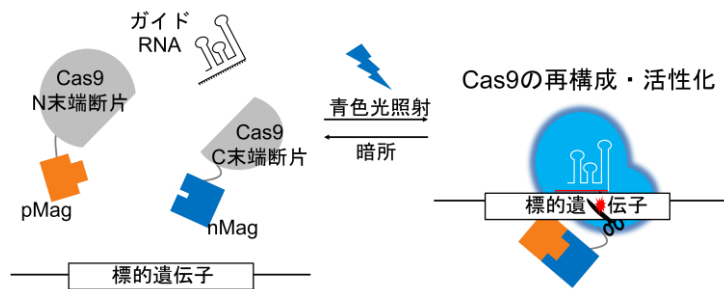


図 2: 研究②で開発する遺伝子配列の改変を可能にする光活性化型 Cas9.

遺伝子を切断し、塩基の欠失や挿入を誘発する事で、遺伝子配列を改変する。

■研究②「ゲノム上の内在性遺伝子発現を直接光制御可能なシステムの開発」

次に、dCas9 と植物由来の光受容タンパク質 CRY2 と CIB1 を用いて、内在性遺伝子の発現を光照射によって誘導するシステムの開発に取り組んだ(学位論文, Chapter 3)。本システムは、2つのタンパク質とガイド RNA から成る(図 3)。1つは、dCas9 と CIB1 を連結した融合タンパク質である。dCas9 はガイド RNA と結合し、ガイド RNA と相補的なゲノム DNA に結合する。この際、標的遺伝子の転写開始点の上流配列に結合するように、ガイド RNA の 5' 末端を設計する。もう一方のタンパク質は、CRY2 と転写活性化ドメインで構成される。CRY2 と CIB1 は、青色光の照射により結合し、暗所に置く事で解離する性質を持つ。そのため、暗所では2つの融合タンパ

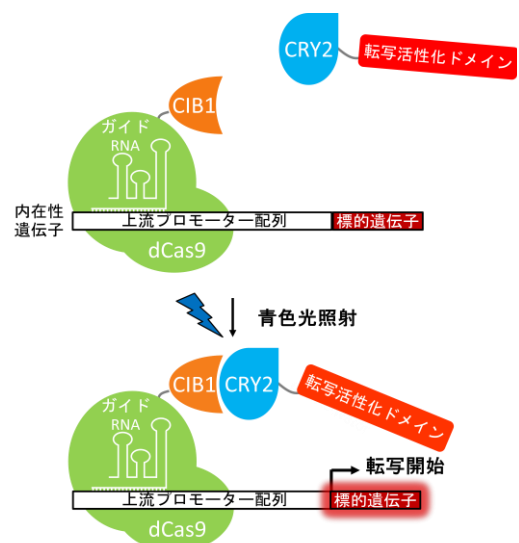


図 3: 内在性遺伝子発現光制御システム

ク質は離れているが、青色光を照射すると、CRY2 と CIB1 が結合し、それに応じて転写活性化ドメインが標的遺伝子に近接する事で標的遺伝子の転写が活性化する。光照射を止めると、CRY2 と CIB1 は離れ、転写は停止する。ASCL1 遺伝子を標的とした本システムをヒト細胞に遺伝子導入し、青色光を照射すると ASCL1 mRNA の増加が確認された。更に、光照射を停止すると ASCL1 mRNA が減少し、再び光を照射すると ASCL1 の発現が再度増加した。また、スリット状に光を当てると、光があたった領域でのみ標的遺伝子の発現が見られた。

■研究③「効率の高い内在性遺伝子発現光制御システムの開発」

②で開発した内在性遺伝子発現光制御システムは、光により誘導される転写活性が低いという欠点があり、広範な生命現象を光操作するためには、より強力な遺伝子発現光制御システムが必要であった(学位論文, Chapter 4)。そこで、研究③で開発した光活性化型 dCas9 を用いて、標的遺伝子に対して同時に複数種類の転写活性化ドメインを光依存的に近接させるシステムを開発した。本システムは、転写活性化ドメイン VP64 を連結した光活性化型 dCas9、MS2 結合 RNA 配列を挿入したガイド RNA、転写活性化ドメイン p65 と HSF1 を連結した MS2 タンパク質から構成される(図 4)。

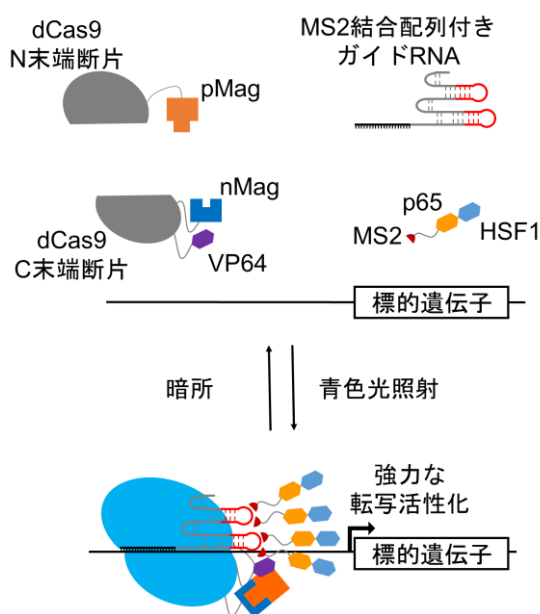


図 4: 研究③で開発する高効率型遺伝子発現制御システム

MS2 タンパク質は、MS2 結合 RNA 配列を認識し結合する。そのため、光が照射されると dCas9 が再構成され、ガイド RNA が結合した標的遺伝子と同時に VP64 と p65 と HSF1 が近接する。HEK293T 細胞において ILIRN 遺伝子を光活性化すると、①で開発したシステムと比較して、本システムでは 100 倍多く ILIRN mRNA の転写が活性化された。更に、本システムを応用し、NEUROD1 遺伝子の発現を光によって誘導することでヒト iPS 細胞の神経分化制御を行えるか検証した。電気穿孔法により本システムを導入したヒト iPS 細胞は、光照射に反応して NEUROD1 遺伝子の発現を上昇させ、4日間の光照射で神経細胞へと分化する事が神経細胞マーカー β チューブリンクラス III の免疫蛍光染色により確認された。

■まとめ

これらの新規技術により、遺伝子の発現や塩基配列の改変操作を光によって精密に制御する事が可能になった。本技術は、基礎研究の領域のみでなく、厳密かつ複雑な遺伝子の制御が必要とされる遺伝子治療といった分野においても、安全性の向上に大きく貢献する事が期待できる。