

研究課題名 新規遺伝子発現制御系・光スイッチの開発
所属研究機関名 独立行政法人 産業技術総合研究所
研究者氏名 中島芳浩

・研究計画の概要

研究の趣旨・目的

日常的な実験室レベルでの基礎生命科学実験から遺伝子治療等の臨床に渡る広範な分野において、目的とする遺伝子を細胞内に導入し、発現を制御する手段は極めて重要且つ必須である。これまで遺伝子導入系については詳細な研究が行われ、種々の実用的な手法が確立しているが、遺伝子発現制御に関する方法については開発が遅れ、実用的な手法は極めて僅かであり、細胞内プロテオームを攪乱することなく、遺伝子発現制御可能な手法の確立が待たれている。現在用いられている遺伝子発現制御法として、薬剤や熱処理による発現誘導法が挙げられる。しかしこれらの手法では(1)空間的な発現制御が不可能、(2)複数遺伝子の発現制御が不可能、(3)細胞に物理的ストレス或いは薬剤による二次的影響がかかる等の問題があるため、有効な方法とは言えない。遺伝子発現制御法の流れは、複数の遺伝子を発現させたい部位とタイミングでコントロール可能な、より高度な発現制御化に向かいつつあり、上記の問題を克服した手法の確立が必要とされている。本申請課題で提案する「光スイッチシステム」は、今までの遺伝子発現制御法の概念に無かった「光」を導入することにより、上記問題を克服できる手法である。即ち、可視光領域の光情報を特異的に受け取る光受容蛋白質と、光受容蛋白質から情報を受け、遺伝子の発現調節を行う転写因子を同時に動物細胞に導入したシステムを創製することによって、目的とする任意の遺伝子発現の ON/OFF を光照射によって制御出来る「光スイッチシステム」の技術開発を行う。

研究計画の概要

微生物からヒトまで、多くの生物は外界の光情報を受け取り、生命維持に必要なエネルギー生産や体内時計の調節等を行っている。光環境からの情報を受け取り、生体シグナルに変換する役者は総称して「光受容体」と呼ばれ、受容する光の色、遺伝子構造、信号伝達経路は多岐に渡っている。本研究では、この光環境センサーである光受容体を最大限に利用することで、哺乳類細胞内での遺伝子発現制御を光照射により行う「光スイッチシステム」の構築を試みている。システム構築のため、下記の項目について研究を行っている。

(1)光照射および遺伝子発現モニターシステムの構築

哺乳類細胞に物理的負荷をかけずに、任意の光強度・波長を照射可能な既存の細胞培養装置が存在しないため、新規に光照射システムの構築を行う。また、光照射に伴い変化する遺伝子発現を、定量的・高感度・簡便にモニターするシステムを、発光タンパク質ルシフェラーゼを用いて構築する。

(2)光受容・信号伝達コンポーネントの単離

現在、種々の生物の光受容体遺伝子が単離・解析されているが、光受容体から遺伝子の転写に至るまでの転写因子、転写因子結合配列については殆ど不明であるため、これらの信号伝達系に関わるコンポーネントを解析、単離する。

(3)一遺伝子発現制御系の確立

(2)で単離した光受容・信号伝達コンポーネントを哺乳類細胞に導入し、光照射により遺伝子発現制御が可能か検討するためのモデルシステムを構築する。

(4)複数遺伝子発現制御系の確立

複数の光受容・信号伝達コンポーネントを哺乳類細胞に導入し、異なる色の光による複数遺伝子発現の制御系を確立する。

研究計画の詳細報告

(単位:百万円)

研究項目	所要経費					
	13年度	14年度	15年度	16年度	17年度	合計
1. 照射型光スイッチシステムの確立	19.5	7	5			31.5
(1) 光照射培養システムの構築	← 8.5 →					8.5
(2) 遺伝子発現モニターシステムの構築	← 6 →	3	5	→		14
(3) 光受容・信号伝達コンポーネントの解析・単離についての予備実験	← 5 →	4				9
2. 複合型光スイッチシステムの確立		12.5	10.5			23
(1) 一遺伝子発現制御系についての予備実験		← 6 →	4	→		10
(2) 遺伝子導入発現系の最適化		← 2 →	3.5	→		5.5
(3) 光照射条件の最適化		← 4.5 →	3	→		7.5
3. 細胞内照射型光スイッチの確立			4			4
(1) 一遺伝子制御系の検証				← →		
(2) 光受容・信号伝達コンポーネントの検証			← 4 →		→	4
(3) 複数遺伝子発現制御系の確立					← →	
所要経費(合計) (間接経費を含む)	19.5	19.5	19.5			58.5

研究成果の概要

研究成果の概要

(1) 光照射および遺伝子発現モニターシステムの構築

本研究課題である光スイッチシステムでは、光受容体遺伝子(および転写因子)、転写因子結合配列から構成される光受容・信号伝達コンポーネントを哺乳類細胞に導入し、光受容体の特異的に活性化する波長の可視光照射により、任意の遺伝子発現を制御することを目的としている。しかし、細胞に熱、UV等の物理的負荷をかけずに、任意の波長・強度の光を照射出来る培養装置は存在しない。そこで、ハロゲン光源を培養装置の外部に設置、ハロゲン光源と光ファイバー間に紫外光遮断フィルターおよび熱遮断フィルターを組み込み、光ファイバーを通して光照射可能なシステムを構築した。また本装置では、任意の波長・強度の光照射を行うためのバンドパスフィルターと照度調整システムについても導入し、既存しない新規の光照射型培養システムの構築に成功した。続いて、光照射によって起こる微小な遺伝子発現量の変化を連続的に検出するための、新規遺伝子発現モニターシステムの構築を行った。発光タンパク質ルシフェラーゼは、ノーザン解析や他のレポーターアッセイ系と比較して、感度・定量性・簡便さに優れている事から、最も頻繁に用いられているレポーター遺伝子である。本研究では、海洋性ウミホタルから新規分泌型ルシフェラーゼを単離し、これを用いて概日時計遺伝子プロモーターをモデルに、哺乳類細胞における転写活性の変化を、連続的に数日間渡って測定可能なシステム構築に成功した。また、既知ホタルルシフェラーゼを改良、これを用いた連続測定システムの構築にも成功した。

(2) 光受容・信号伝達コンポーネントの単離

これまで知られている殆どの光受容体においては、光受容体から遺伝子の転写に至るまでの転写因子、転写因子結合配列については殆ど不明である。そこで、光スイッチシステムに使用可能な光受容・信号伝達系に関わるコンポーネントの解析・単離を試みた。ヒト網膜芽細胞において、光照射により早期に誘導がかかることとされている c-fos、hPer1 遺伝子の存在について確認し、これらの遺伝子をマーカーに、光受容・信号伝達コンポーネントの単離を現在行っている。

(3) 一遺伝子発現制御系の確立

アカパンカビ由来青色光受容体 WC1、WC2 は、カロテノイド合成、概日時計の光制御に関わる青色光受容体である。近年、WC1・WC2 複合体が、青色光照射依存的に概日時計遺伝子のプロモーター領域(光応答エレメント)に結合し、転写を誘導することが報告された。そこで本研究では、WC1、WC2 光受容体および光応答エレメントを用い、光スイッチシステムのモデル系として、光照射による遺伝子発現制御が可能かを検討した。光応答性エレメントと改良ホタルルシフェラーゼを連結したレポーターベクターおよび WC1,2 を哺乳類細胞に導入し、光照射下および恒暗下で培養し、ルシフェラーゼ活性を経時的に測定したところ、光照射に伴う転写活性の低下がみられた。またこの低下は、レポーターベクターと WC1 のみでは認められなかった。この結果、WC1、WC2 により光照射依存的な遺伝子発現の抑制が起こることが示唆され、WC 光受容体および光応答性エレメントを用いることにより、一遺伝子発現制御が可能であることが示唆された。

波及効果、発展方向、改善点等

これまでの細胞内遺伝子の発現制御法として、IPTG 等による薬剤処理や、熱による物理的処理が中心的役割を果たしてきた。しかし遺伝子発現制御法の流れは、複数の遺伝子を同時に、しかも発現させたい部位とタイミングでコントロールする、より高度な発現制御化の時代に向かいつつある。従来の制御法では細胞全体で遺伝子発現が誘導されたり、一つの遺伝子だけしか制御できないといった問題が挙げられる。我々はこの問題を光スイッチシステムの導入によって克服し、簡便且つ高精度に遺伝子発現の制御が可能なシステムを構築する。そしてシステムが完成すれば、極めて汎用性の高い基礎技術としてライフサイエンス分野に広く普及すると考えている。更に、動物個体への応用が成功すれば、新たな癌治療や遺伝子治療といった医療

分野へのニーズも広がり経済的・社会的発展も見込まれる。

. 研究成果発表等の状況

(1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合 計
国 内	1 件 (投稿中)	0 件	2 件	3 件
国 際	0 件	0 件	2 件	2 件
合 計	1 件	0 件	4 件	5 件

(2) 特許等出願件数

合計 0 件 (うち国内 0 件、国外 0 件)

(3) 受賞等

0 件 (うち国内 0 件、国外 0 件)

(4) 主な原著論文による発表の内訳

国内誌 (国内英文誌を含む)

1 Y. Nakajima, K. Kobayashi , K. Yamagishi, T. Enomoto and Y. Ohmiya 「cDNA cloning and characterization of secreted luciferase from the luminous Japanese ostracod *Cypridina noctiluca*」 Biosci. Biotech. Biochem. 投稿中

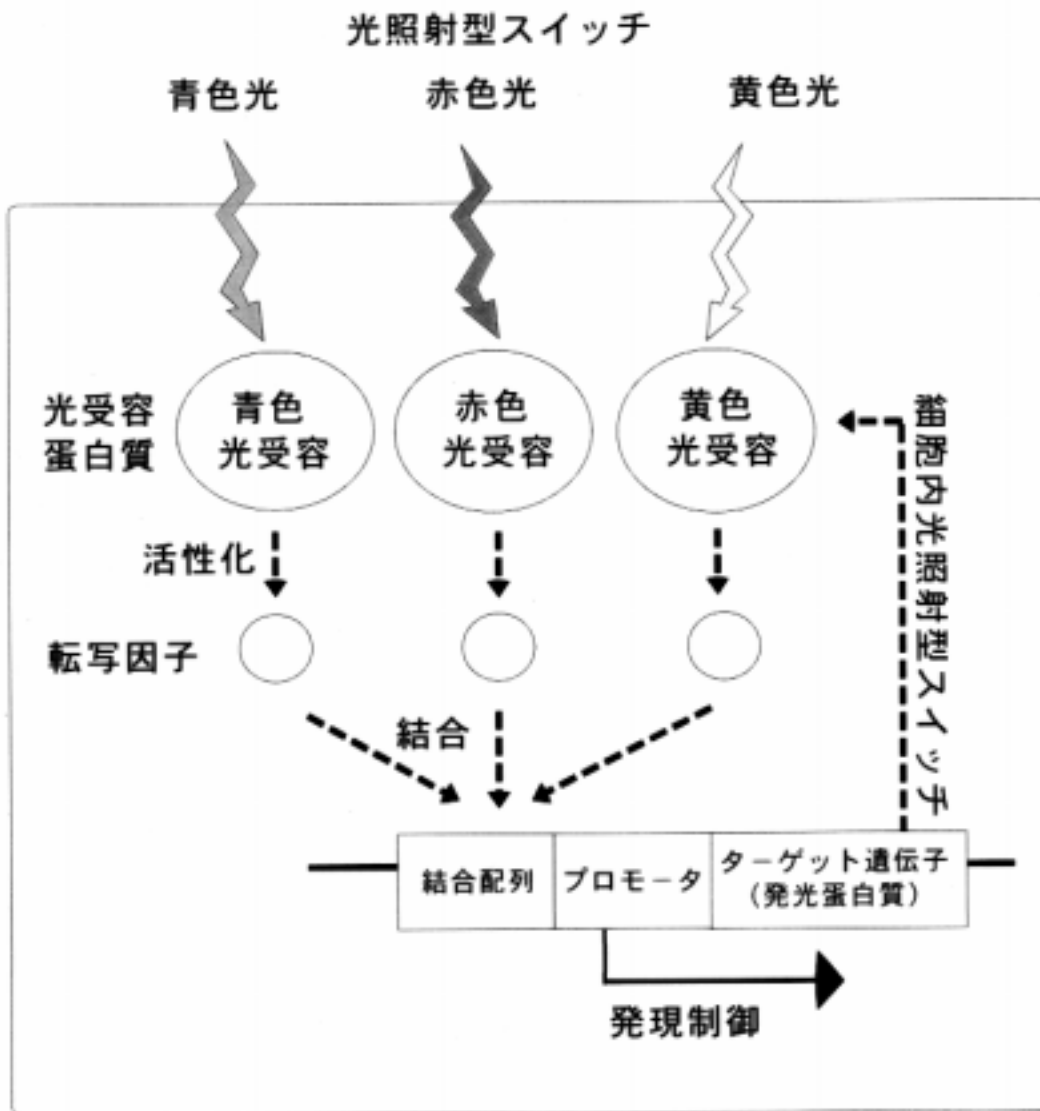
2 Y. Nakajima, T. Kimura, C. Suzuki and Y. Ohmiya 「Improved Expression of Novel Red- and Green-Emitting Luciferases of *Phrixothrix* Railroad Worms in Mammalian Cells」 Biosci. Biotech. Biochem. 投稿中

国外誌

0 件

(5) 主要雑誌への研究成果発表

Journal	Impact Factor
Biosci. Biotech. Biochem	1.1



光スイッチシステムの概念図