



2 色の光で遺伝子発現の開始と停止を正確に操作する技術を 開発

研究成果のポイント

- ・ 光の照射により遺伝子の発現期間を正確に操作できる「光遺伝子操作」技術を開発。
- ・ 遺伝子組み換え^{※1}をせずに遺伝子発現^{※2}を操作できる。
- ・ 初期の受精卵でも使えるため、発生生物学^{※3}への応用が期待できる。

研究成果の概要

光遺伝子操作技術は光を用いて遺伝子発現を制御する技術です。これまでの方法では、光照射からタンパク質の生産開始や生産停止まで数時間のタイムラグがあるために、短時間で起こる生命活動における遺伝子の機能をこの技術で調べることは困難でした。本研究で開発した技術により、そのタイムラグをほとんど無くするとともに、操作時間を数分へと飛躍的に短縮することに成功しました。また、この技術は遺伝子発現の際に生成されるメッセンジャーRNA (mRNA)^{※4}に作用するため、遺伝子組み換えを行う必要がありません。さらに、初期の受精卵のように DNA からの転写^{※5}が行われない環境でも遺伝子発現を操作できるというメリットもあります。今回、ゼブラフィッシュを用いて、その体の軸を作る遺伝子の発現を光で操作することで、遺伝子発現のタイミングだけでなく、発現の持続期間が頭部形成に重要な意味を持つことを初めて実証しました。本技術をマウスなどの高等モデル生物に応用することで、これまでに困難であった、生物の発生メカニズムや、様々な疾患における各遺伝子の役割の解明が期待されます。

論文発表の概要

研究論文名：Duration Control of Protein Expression In Vivo by Light-Mediated Reversible Activation of Translation（生体内で光を使ってタンパク質の発現期間を操作）

著者：小笠原慎治（北海道大学創成研究機構）

公表雑誌：ACS Chemical Biology

公表日：米国東部時間 2017 年 1 月 4 日（水）（オンライン公開）

研究成果の概要

（背景）

従来の遺伝子操作技術は生物に備わっている遺伝子調節機構に依存しているため、遺伝子の発現タイミングや発現を持続させる時間を自在に操作することは困難でした。近年、遺伝子の発現を光でオン/オフ制御する技術が開発されていますが、光を照射して DNA の転写をオンもしくはオフにしたらタンパク質の生産に反映されるまでに数時間のタイムラグがありました（図 1）。このため、遺伝子を発現させるタイミングや発現の持続時間を正確に操作することができず、短い時間で起こる遺伝子発現の生命活動への影響を調べることは困難でした。また、従来技術では外来の DNA を組み込んだ遺伝子組み換え生物を作製する必要があったため、作製には時間がかかり、操作が煩雑で取扱上の制約（カルタヘナ条約）がありました。さらに DNA の転写が起こらない発生初期の受精卵では遺伝子発現の操作をすることができませんでした。

（研究手法）

本研究では、光を照射してからタンパク質の生産へ反映されるまでのタイムラグを短縮するため、従来用いられていた DNA から mRNA への転写過程ではなく、mRNA からタンパク質への翻訳過程^{※6}の制御に着目しました。mRNA を利用することで遺伝子組み換え生物を作る必要がなく、操作が簡便になります。さらに mRNA は生物のゲノム DNA に取り込まれることがなく、生体に注入しても 1 週間程度で完全に分解されるため、生体内に外来の遺伝子産物が残らないという利点もあります。mRNA の翻訳は、mRNA の先端に付いているキャップ構造^{※7}に翻訳開始因子（eIF4E）が結合することを合図に始まります。これに着目し、キャップ構造と翻訳開始因子の結合を光で制御する方法を考案し、光に応答して 2 パターンの形態に変形するようキャップ構造を化学的に改変しました（図 2）。改変したキャップ構造に紫外光を当てると翻訳開始因子と結合し、翻訳が始まってタンパク質が生産されます。一方、紫色の光を当てると翻訳開始因子と結合しなくなるため翻訳は停止してタンパク質の生産は止まります。このように化学的に改変したキャップ構造を持つ mRNA を生体に注入し、紫外光と紫色光の 2 色の光を当てることで mRNA の翻訳のオン/オフを制御できるようにしました。

（研究成果）

今回の研究ではゼブラフィッシュという熱帯魚の受精卵を使いました。ゼブラフィッシュの受精卵は透明で光を通しやすく、母親の体外で細胞分裂が進行して体ができるため、操作や観察がしやすいという特長があります。最初に、開発した光遺伝子操作技術の性能を調べました。蛍光タンパク質の mRNA に、改変したキャップ構造を付加して受精卵に注入し、一方の受精卵には紫色の光を、もう一方の受精卵には紫外光を当て、経過を蛍光顕微鏡で観察しました。24 時間後、生育したゼブラフィッシュにおいて紫外光を照射した方は強い蛍光を発しましたが、紫色の光を当てた方は蛍光を発しませんでした（図 3）。つまり、紫外光を照射すると mRNA が翻訳されて蛍光タンパク質が生産されますが、紫色の光を照射すると mRNA は翻訳されず、蛍光タンパク質は生産されないことが実証できました。また、紫外光を照射してから数分後にはタンパク質の生産が始まり、紫色の光を照射してから数十分以内には止まるという結果も得られました（図 4 の赤色の実線）。このように、光照射からタンパク質の生産へ反映されるまでのタイムラグを数時間から数十分に飛躍的に短縮することに成功しました。

mRNA に作用する本技術は、DNA からの転写が起きない環境、例えば、発生初期の受精卵でも使えます。今回は体の軸を作る遺伝子（squint 遺伝子）の発現を操作しました。この遺伝子は受精卵が 8 個まで細胞分裂した時から 4 時間半の間、端にある細胞だけで発現していることが分かっています。し

かし、従来の遺伝子操作技術では遺伝子発現期間を正確に操作できなかったために発現期間の重要性を調べることができませんでした。そこで、今回開発した技術を使ってこの遺伝子の発現期間が体の形成に及ぼす影響を調べたところ、4時間半発現させると完全な頭部をもつ体になりますが、それ以上の期間発現させると頭部の形成を妨げてしまうことが示されました（図5）。

（今後への期待）

この技術は、発生生物学などの生命科学へ応用できます。受精卵から体ができるまでの過程で「いつ・どの細胞で・どのくらいの期間・どの遺伝子が」発現しているのか、という遺伝子発現プログラムを生きた生物の中での実験から解明することができると期待されます。今回は操作や観察がしやすいゼブラフィッシュを用いましたが、本技術をマウスなど他の高等なモデル生物に応用することができれば、様々な疾患における遺伝子の機能の解明が期待されます。

なお、本研究は、科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 個人型研究（さがけ）「光の極限制御・積極利用と新分野開拓」の研究課題「光で細胞内現象を完全再現する超精密タンパク質発現操作技術の開発と応用」（北海道大学創成研究機構 小笠原慎治，研究期間：平成27～30年度）の一環で実施されました。

お問い合わせ先

北海道大学創成研究機構 特任助教 小笠原 慎治（おがさわら しんじ）

TEL：011-706-9182 E-mail：shinzi@cris.hokudai.ac.jp

ホームページ：<http://www.cris.hokudai.ac.jp/ogasawara/>

【用語解説】

- ※1 遺伝子組み換え：生物がもつDNA（ゲノムDNA）の一部を削除したり、外来のDNAを挿入したりして改変すること。それによって作られた生物はカルタヘナ法に則った取扱上の規制がある。
- ※2 遺伝子発現：DNAに書かれた遺伝子情報をもとに転写過程・翻訳過程を経てタンパク質が生産されること。
- ※3 発生生物学：受精卵から体ができるまでの過程を研究する生物学の一分野。
- ※4 メッセンジャーRNA（mRNA）：DNAから遺伝子情報を写し取ったDNAに似た分子。
- ※5 転写：DNAの遺伝子情報がmRNAに写されること。
- ※6 翻訳：mRNAの遺伝子情報からタンパク質が生産されること。
- ※7 キャップ構造：mRNAの先端に付加されている7-メチルグアノシンと呼ばれる化学物質。

【参考図】

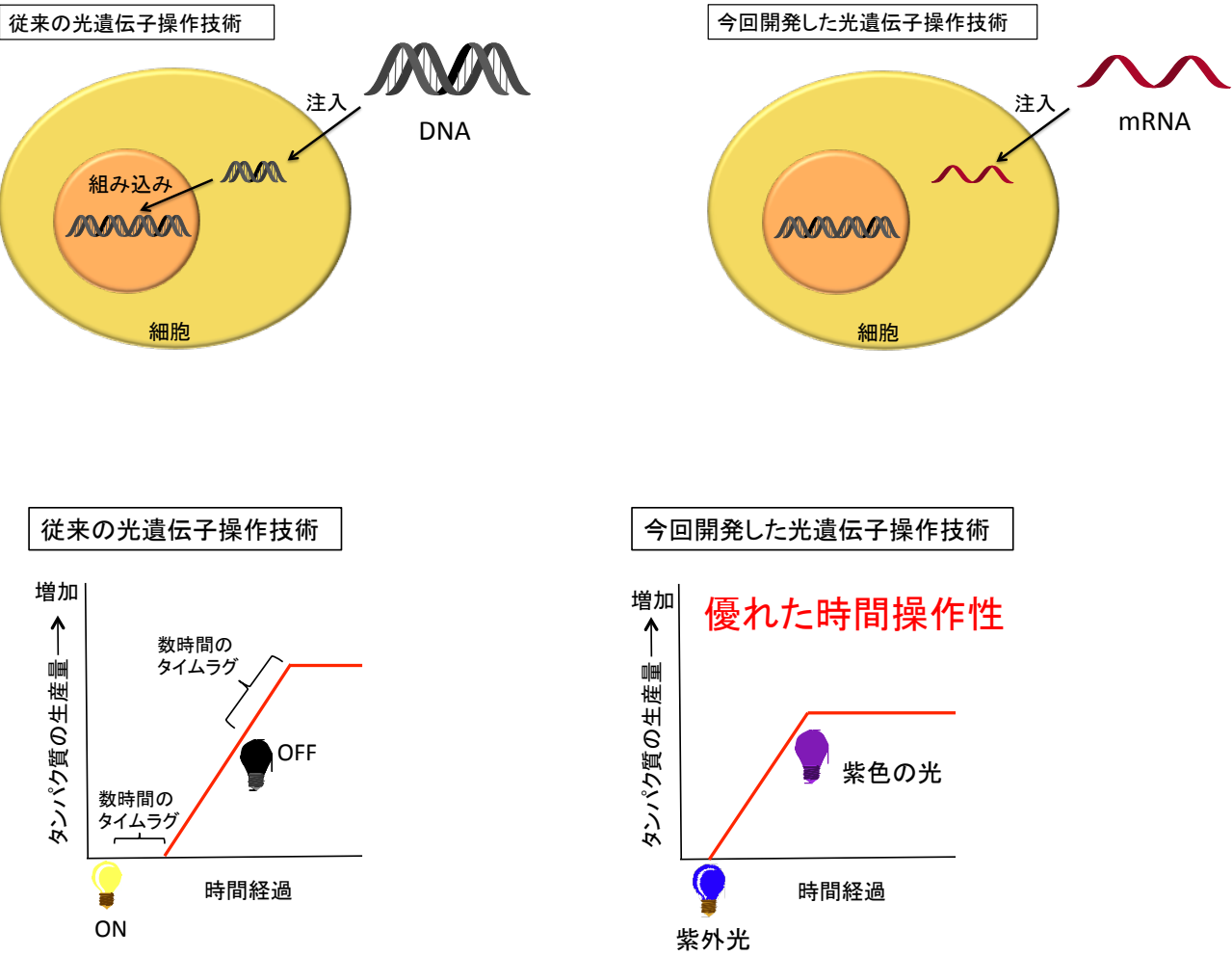


図 1 従来（従来）の光遺伝子操作技術との比較

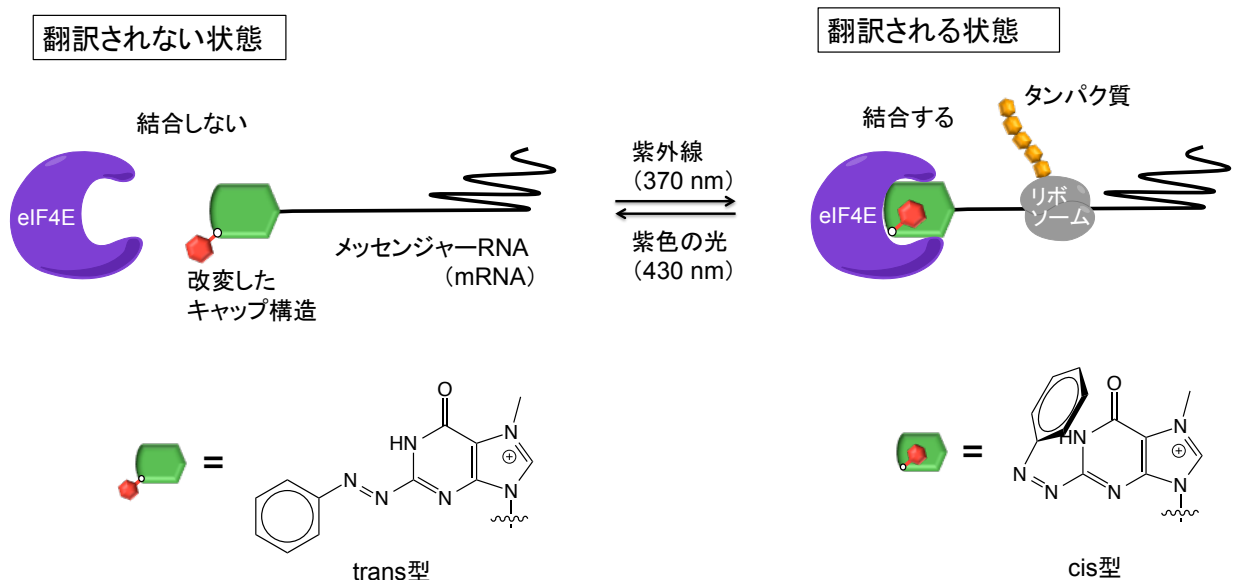


図2 今回開発した光遺伝子操作の概略図

改変したキャップ構造に光を当てると構造が変化する（紫色の光を当てると trans 型，紫外光を当てると cis 型）。trans 型（左）の時は翻訳開始因子（eIF4E）と結合せず，mRNA からのタンパク質生産がオフになる。一方，cis 型（右）の時は翻訳開始因子と結合し，mRNA からのタンパク質生産がオンになる。このように，紫外光，紫色光の2色の光を使い，mRNA からタンパク質への翻訳のオン/オフが正確に制御できる。

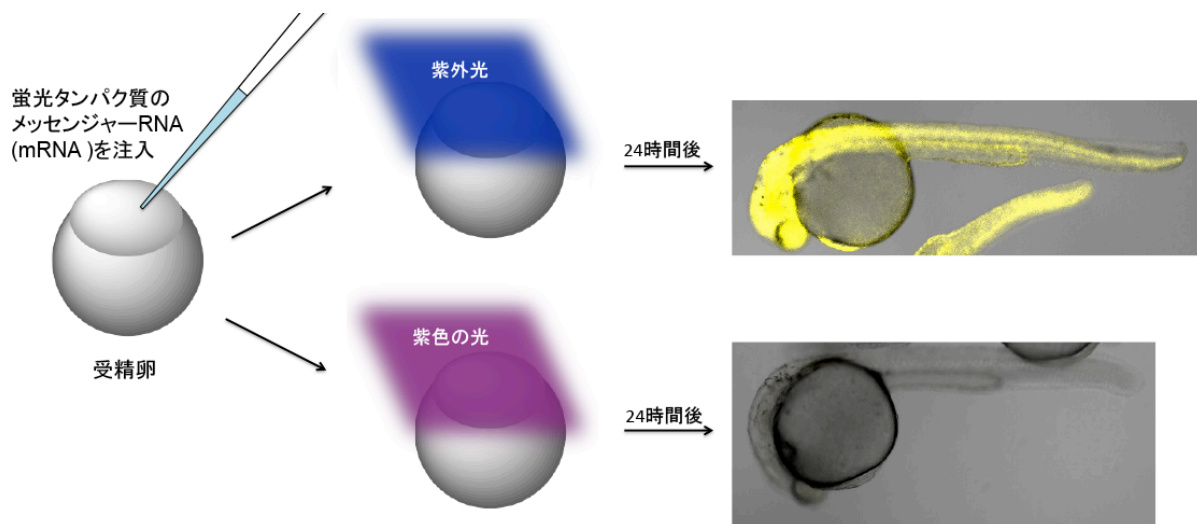


図3 今回開発した光遺伝子操作の性能評価

ゼブラフィッシュの受精卵に，化学的に改変したキャップ構造を末端に付加した蛍光タンパク質の mRNA を注入し，一方の受精卵には紫外光を，もう一方の受精卵には紫色の光を照射した。24 時間後，紫外光を照射した受精卵から成長したゼブラフィッシュでは強い黄色の蛍光が観測されたが，紫色の光を照射した受精卵から成長したゼブラフィッシュでは蛍光が観測されなかった。これは，紫外光を照射すると mRNA からタンパク質への翻訳が起こり，紫色の光を照射すると翻訳が起こらないことを示している。

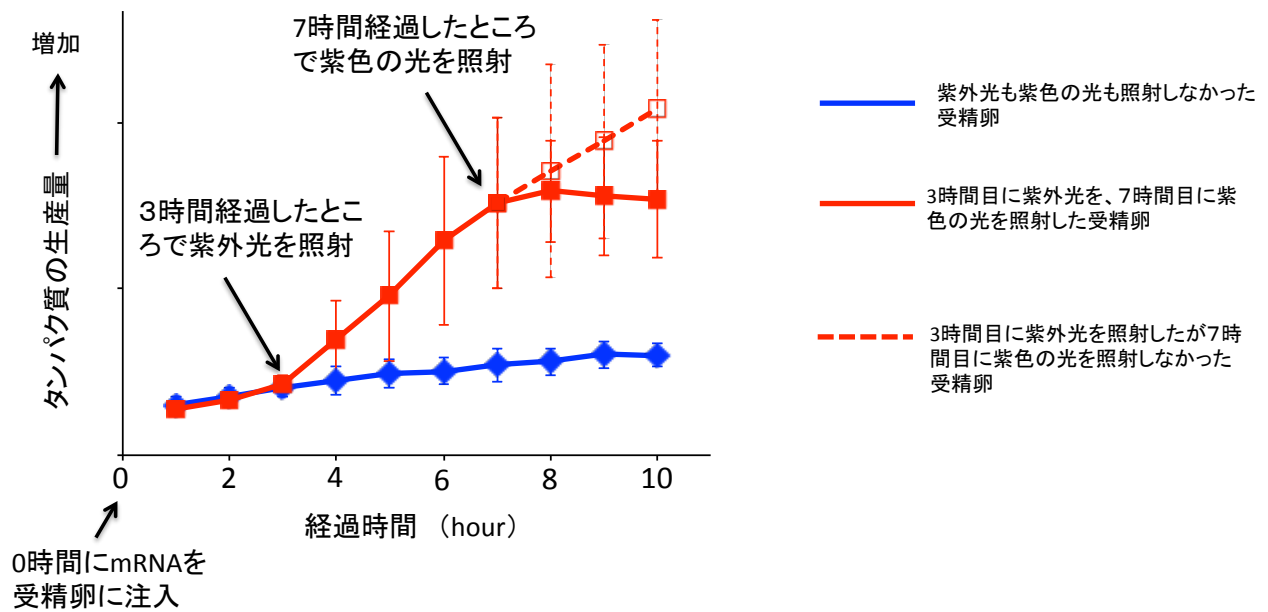


図4 mRNAの翻訳のオン/オフ制御の性能評価

ゼブラフィッシュの受精卵に、化学的に改変したキャップ構造を末端に付加した蛍光タンパク質のmRNAを注入し、光照射でmRNAの翻訳をオン/オフ制御した結果。(青色の実線)光をまったく照射しなかった受精卵。(赤色の実線)mRNAを注入してから3時間後に紫外光を照射し、7時間後に紫色の光を照射した受精卵。紫外光を照射した直後からmRNAが翻訳され始め、タンパク質の生産量が増加している。また、紫色の光を照射した後、数十分以内にmRNAの翻訳が止まりタンパク質の生産も停止したことが分かる。(赤色の破線)mRNAを注入してから3時間後に紫外光を照射したが、7時間後に紫色の光を照射しなかった受精卵。紫色の光を照射しなかったためmRNAの翻訳が止まらずタンパク質の生産量が増加し続けている。

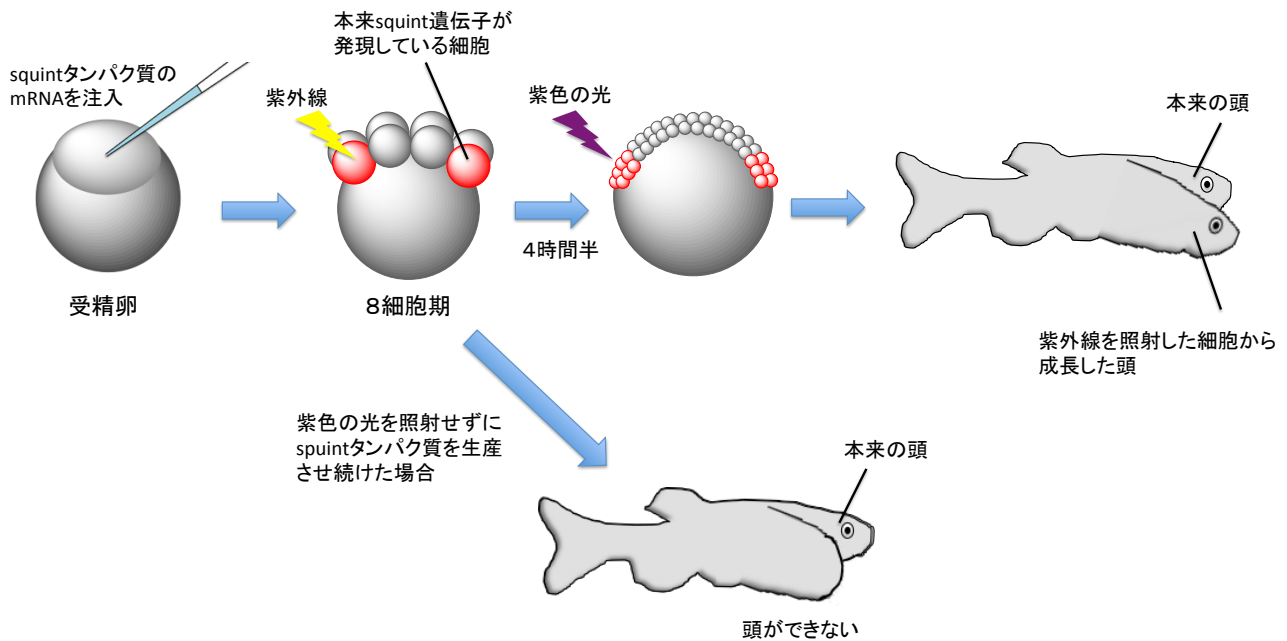


図 5 ゼブラフィッシュの受精卵で体の軸を作る遺伝子（squint 遺伝子）の mRNA の翻訳を操作した時の手順及び結果

まず、キャップ構造を付加した mRNA に紫色の光を照射して翻訳が生じない状態にする。その mRNA をゼブラフィッシュの受精卵に注入し、8細胞にまで分裂した段階で、本来体の軸を作る遺伝子が発現している細胞とは反対側の端の細胞に、紫外光を照射した。4時間半後に紫色の光を照射し、注入した mRNA の翻訳を停止させると、紫外光を照射した細胞が完全な頭部に成長し、本来の頭と合わせて頭が2つあるゼブラフィッシュが誕生した。一方、紫色の光を照射せずに4時間半以上 mRNA の翻訳を続けると、2つ目の頭部は不完全な状態となった。

（参考資料）

