

光刺激で iPS 細胞を神経細胞に分化させる技術を開発 ～CRISPR-Cas9 の新たな応用の開拓～

1. 発表者:

二本垣 裕太 (東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 大学院生(研究当時)/
現:ジョンスホプキンス大学 医学部 細胞生物学科 博士研究員)
古旗 祐一 (東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻 博士課程3年生)
小田部 堯広 (東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 特任研究員)
長谷川 早紀 (東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 修士課程1年生)
吉本 敬太郎 (東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 准教授)
佐藤 守俊 (東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 教授)

2. 発表のポイント:

- ◆CRISPR-Cas9 システム(注1)を用いてゲノムにコードされた遺伝子(注2)の発現を強力的に光操作する技術を開発しました。
- ◆iPS 細胞から神経細胞への分化を光操作することに成功しました。
- ◆様々な細胞機能や生命現象の光操作への応用が期待されます。

3. 発表概要:

東京大学大学院総合文化研究科の二本垣裕太大学院生(現ジョンスホプキンス大学 医学部 細胞生物学科 博士研究員)、古旗祐一大学院生、小田部堯広特任研究員、長谷川早紀大学院生、吉本敬太郎准教授、佐藤守俊教授らの共同研究グループは、CRISPR-Cas9 システムを用いてゲノムにコードされた遺伝子の発現を強力的に光操作する技術を開発することで、iPS 細胞を神経細胞へ光刺激で分化誘導することに成功しました。従来の光操作技術では転写活性化の効率が低いため、増殖や分化といった細胞機能を光で制御する応用への妨げとなっていました。この新技術により、iPS 細胞から神経細胞への分化だけでなく、様々な細胞機能や生命現象の光操作に関する応用が大きく広がることを期待されます。

本研究結果は、米国科学誌「Nature Methods」(電子版:英国時間9月11日(月))に掲載されます。

本研究結果は、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)の大学発新産業創出プログラム(START, 注7)「CRISPR-Cas9 システムを光制御するゲノムエンジニアリングツール」(研究代表者:佐藤守俊 教授)および同戦略的創造研究推進事業(CREST, 注8)「光の特性を利用した生命機能の時空間制御技術の開発と応用」(研究総括:影山龍一郎 京都大学ウイルス・再生医科学研究所教授)における「ゲノムの光操作技術の開発と生命現象解明への応用」(研究代表者:佐藤守俊 教授)の一環として得られました。

4. 発表内容:

研究背景

CRISPR-Cas9 システムに基づくゲノム編集技術の登場以降、同技術は世界中の研究室に普及し、利用されています。この CRISPR-Cas9 システムを応用することで、ゲノム編集だけでなく、ゲノムにコードされた遺伝子の発現を制御することも可能になりました。現在、この遺伝子発現の制御技術は、遺伝子を破壊することなくその機能を調べられるため、生命機能を解明する上で重要なリサーチツールの一つとなっています。近年、光や化合物などの外部刺激を用いることで、遺伝子発現を時空間的に

制御する技術に興味が持たれています。既に我々のグループは、CRISPR-Cas9 システムを用いて、光刺激でゲノム遺伝子の発現を操作するツールの開発に成功しています。しかし、この従来技術では、細胞の分化のような生命現象を光操作するには遺伝子発現の効率が不十分だったため、より強力にゲノムにコードされた遺伝子の発現を活性化できる技術の開発が強く求められていました。

研究内容

本研究グループは、DNA 切断活性を欠失させた Cas9 (dCas9) (注3)とガイド RNA、光スイッチタンパク質(注4)、転写活性化因子(注5)を用いることで、ゲノム上の狙った遺伝子の発現を光操作する技術(CPTS、図 1(a))の開発にすでに成功しています(参考文献 1)。しかし、この現状の技術では遺伝子発現の効率が不十分だったため、細胞の分化のような生命現象を光操作することができませんでした。

本研究グループはこの課題を解決するために、本研究グループが以前開発したゲノム編集(注6)の光操作技術(参考文献 2)、および米国の研究グループにより開発された SAM と呼ばれる遺伝子発現制御技術(参考文献 3)に注目し、両技術を融合して、ゲノム遺伝子の発現を光刺激で強力に活性化できる新技術(Split-CPTS2.0)を開発しました(図 1(b))。

Split-CPTS2.0 では、dCas9 タンパク質を二分割して作製した N 末端側断片 (dCas9(2-713)) と C 末端側断片 (dCas9(714-1,368)) に、同研究グループ開発の光スイッチタンパク質の Magnet システム (pMag、nMagHigh1) (参考文献 4)と転写活性化因子(VP64)を連結しました。さらに、MS2 RNA アプタマーを挿入したガイド RNA (sgRNA2.0)、MS2 タンパク質と転写活性化因子 (p65 および HSF1)を用いました。光を照射すると、これらの融合タンパク質とガイド RNA が、狙ったゲノム遺伝子の上流領域に集合することにより、そのゲノム遺伝子の発現を活性化します。既存の技術 (CPTS)では、光刺激により、転写活性化因子を一種類だけ(p65)、ゲノム遺伝子上流領域に呼び寄せていましたが、Split-CPTS2.0 では、異なる転写活性化因子 (VP64、p65、HSF1)を三つ同時にゲノムに集めたため、著しく高い効率でゲノム遺伝子の発現を光操作できるようになりました。

次に、本技術を応用して神経細胞への分化に関係した iPS 細胞の *NEUROD1* 遺伝子を光操作し、iPS 細胞を神経細胞に分化できるか検証しました。Split-CPTS2.0 を用いると、従来技術 (CPTS)と比べて 860 倍強く、*NEUROD1* 遺伝子の発現を光刺激で活性化できることが分かりました(図 2(a))。従来技術 (CPTS)では *NEUROD1* 遺伝子の発現が十分でないため、iPS 細胞を分化させることはできませんでしたが、Split-CPTS2.0 ではその効率が著しく高いため、光刺激により、iPS 細胞を神経細胞に分化できることが分かりました(図 2(b))。

上述のように本研究グループは、既存の技術では不可能だった細胞分化の光操作を実現しました。この技術は、iPS 細胞から神経細胞への分化だけでなく、様々な種類の細胞を光刺激によって分化誘導する基盤技術になると期待されます。また CRISPR-Cas9 システムの持つ応用の可能性を大きく広げ、基礎研究だけでなく、医療や創薬などといった人々の生活に貢献することが期待されます。

参考文献

- 1) Y. Nihongaki, S. Yamamoto, F. Kawano, H. Suzuki and M. Sato, "CRISPR-Cas9-Based Photoactivatable Transcription System" *Chemistry & Biology*, 22, 169-174 (2015). DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.12.011.
- 2) Y. Nihongaki, F. Kawano, T. Nakajima and M. Sato, "Photoactivatable CRISPR-Cas9 for Optogenetic Genome Editing" *Nature Biotechnology*, 33, 755-760 (2015). DOI: 10.1038/nbt.3245.
- 3) S. Konermann, M. D. Brigham, A. E. Trevino, J. Joung, O. O. Abudayyeh, C. Barcena, P. D. Hsu, N.

- Habib, J. S. Gootenberg, H. Nishimasu, O. Nureki, F. Zhang, “Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex” *Nature*, 517, 583–588 (2014). DOI: 10.1038/nature14136
- 4) F. Kawano, H. Suzuki, A. Furuya and M. Sato, “Engineered Pairs of Distinct Photoswitches for Optogenetic Control of Cellular Proteins” *Nature Communications*, 6, 6256 (2015). DOI: 10.1038/ncomms7256.

5. 発表雑誌:

雑誌名:「Nature Methods」(9月11日(英国時間)オンライン)

論文タイトル:CRISPR–Cas9-based photoactivatable transcription systems to induce neuronal differentiation

著者: Yuta Nihongaki, Yuichi Furuhata, Takahiro Otabe, Saki Hasegawa, Keitaro Yoshimoto and Moritoshi Sato*(*責任者)

DOI 番号:10.1038/nmeth.4430

6. 問い合わせ先:

東京大学総合文化研究科

教授 佐藤 守俊 (さとう もりとし)

〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1

Tel: 03-5454-6579

E-mail: cmsato”AT”mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

E-mail は上記アドレス”AT”の部分を変えてください。

7. 用語解説:

(注1) CRISPR–Cas9 システム

ゲノムの切断を人為的に行うための技術。Cas9 と呼ばれる DNA 切断酵素がガイド RNA と共に DNA に結合し、その DNA 配列を部位特異的に切断します。この CRISPR–Cas9 システムは、バクテリオファージに対する原核生物の免疫システムとして発見されましたが、2012 年以降、ゲノム編集に利用されています。ガイド RNA の 5'末端の塩基配列 (20 塩基程度) を適切に設計するだけで、ゲノムの切断部位を決定できる簡便性が大きな特徴です。

(注2) ゲノム遺伝子

ヒトの 46 本の染色体は、約 31 億の塩基対で構成されています。そこには、約 2 万の遺伝子が DNA 配列上にコードされています。

(注3) dCas9

原核生物には CRISPR–Cas9 システムと呼ばれる一種の免疫機構があります。このシステムを構成する Cas9 は、ガイド RNA の有無に応じて、標的遺伝子の特定の塩基配列を切断する酵素 (ヌクレアーゼ) です。dCas9 は、Cas9 の活性中心にアミノ酸変異を加えその酵素活性を消失させた変異体ですが、ガイド RNA の有無に応じて標的遺伝子に結合する機能は保持しています。

(注4) 光スイッチタンパク質

CPTSではシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) が有するクリプトクロムとよばれる光受容体 (CRY2) と、青色光によってCRY2に結合するシロイヌナズナ由来のタンパク質 (CIB1) を光スイッチタンパク質として利用しています。Split-CPTS2.0では、本研究グループが開発したMagnetシステムを光スイッチタンパク質として利用しています。Magnetシステム (pMagとnMagHigh1) はアカパンカビ (*Neurospora crassa*) が有する小さな光受容体のヴィヴィッド (Vivid) に対して多角的にプロテインエンジニアリングを施して開発されたタンパク質の対です。pMagとnMagHigh1は暗所では単量体として存在し、青い光を受容するとヘテロ二量体を形成します。

(注5) 転写活性化因子

転写開始複合体を呼び寄せて、転写を活性化するためのタンパク質ドメイン。

(注6) ゲノム編集技術

ゲノム上の遺伝子の塩基配列を改変してその機能を破壊したり (ノックアウト)、別の塩基配列で置き換える (ノックイン) 技術のこと。

(注7) 大学発新産業創出プログラム (START: Program for Creating Start-ups from Advanced Research and Technology)

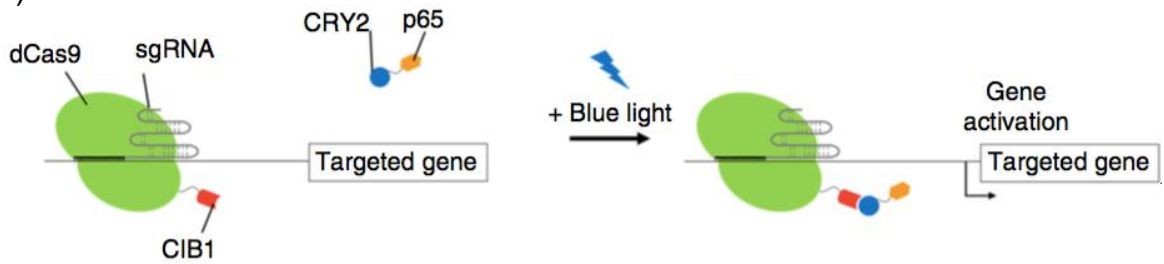
日本の大学などの基礎研究成果に関し、大学等発ベンチャーなどを通じた新規マーケットへの事業展開が十分に行われていない現状を踏まえて、平成24年度に文部科学省により「大学発新産業創出拠点プロジェクト」として創設され、平成27年度より科学技術振興機構が実施している制度です。本制度では、事業化ノウハウを持った人材 (事業プロモーター) ユニットを活用して、大学などのポテンシャルの高いシーズの事業化を通じて新産業の創出、新規マーケットの開拓を目指します。大学等発ベンチャーの起業前段階から公的資金と民間の事業化ノウハウを組み合わせることにより、事業戦略・知財戦略を構築しつつ、既存企業にはリスクの負えないポテンシャルの高いシーズの事業化への挑戦を支援しています。

(注8) 戦略的創造研究推進事業 (CREST: Core Research for Evolutionary Science and Technology)

戦略的創造研究推進事業は、我が国が直面する重要な課題の達成に向けた基礎研究を推進し、社会・経済の変革をもたらす科学技術イノベーションを生み出す、新たな科学知識に基づく創造的な革新的技術のシーズを創出することを目的としています。なかでもCRESTは、研究総括の運営の下、研究代表者が研究チームを率いて産・学・官にまたがるネットワークを形成し活用しながら、科学技術イノベーションに大きく寄与する国際的に高い水準の成果の創出を支援しています。

8. 添付資料:

(a) CPTS



(b) Split-CPTS2.0

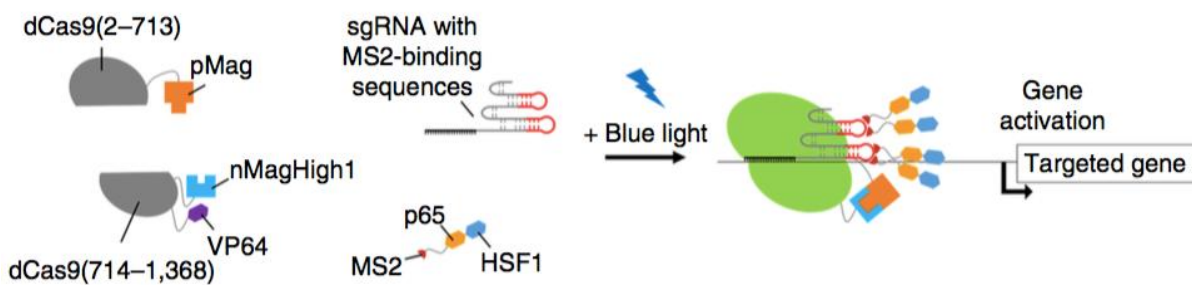


図1 従来技術と本技術の原理

(a) 従来の技術である CPTS では、変異を加えて DNA 切断活性を失わせた Cas9 (dCas9) タンパク質と青色の光を照射すると結合する光スイッチタンパク質 (CRY2-CIB1) を組み合わせました。dCas9 は CIB1 と連結することで、標的の塩基配列上での足場の役割を果たします。ここに遺伝子の発現を活性化する役割を持つ p65 と CRY2 を連結したタンパク質が存在すると青色の光依存的に CRY2 と CIB1 が結合することで、標的遺伝子の発現が活性化されます (オン)。光照射を止めると CRY2 と CIB1 は結合力を失うため、p65 が離れることで、遺伝子の活性化能は消失 (オフ) します。

(b) Split-CPTS2.0 では、dCas9 タンパク質を二分割して作製した N 末端側断片 (dCas9(2-713)) と C 末端側断片 (dCas9(714-1,368)) に、同研究グループが以前開発した光スイッチタンパク質の Magnet システム (pMag, nMagHigh1) と転写活性化因子 (VP64) を連結しました。さらに、MS2 RNA アプタマーを挿入したガイド RNA (sgRNA2.0)、MS2 タンパク質と転写活性化因子 (p65 および HSF1) を用いました。光を照射すると、これらの融合タンパク質とガイド RNA が、狙ったゲノム遺伝子の上流領域に集合することにより、その遺伝子の発現を活性化します。CPTS では、光刺激により、転写活性化因子を一種類だけ (p65)、ゲノム遺伝子の上流領域に呼び寄せていましたが、Split-CPTS2.0 では、異なる転写活性化因子 (VP64, p65, HSF1) を三つ同時にゲノムに集めたため、著しく高い効率でゲノム遺伝子の発現を光操作できるようになりました。

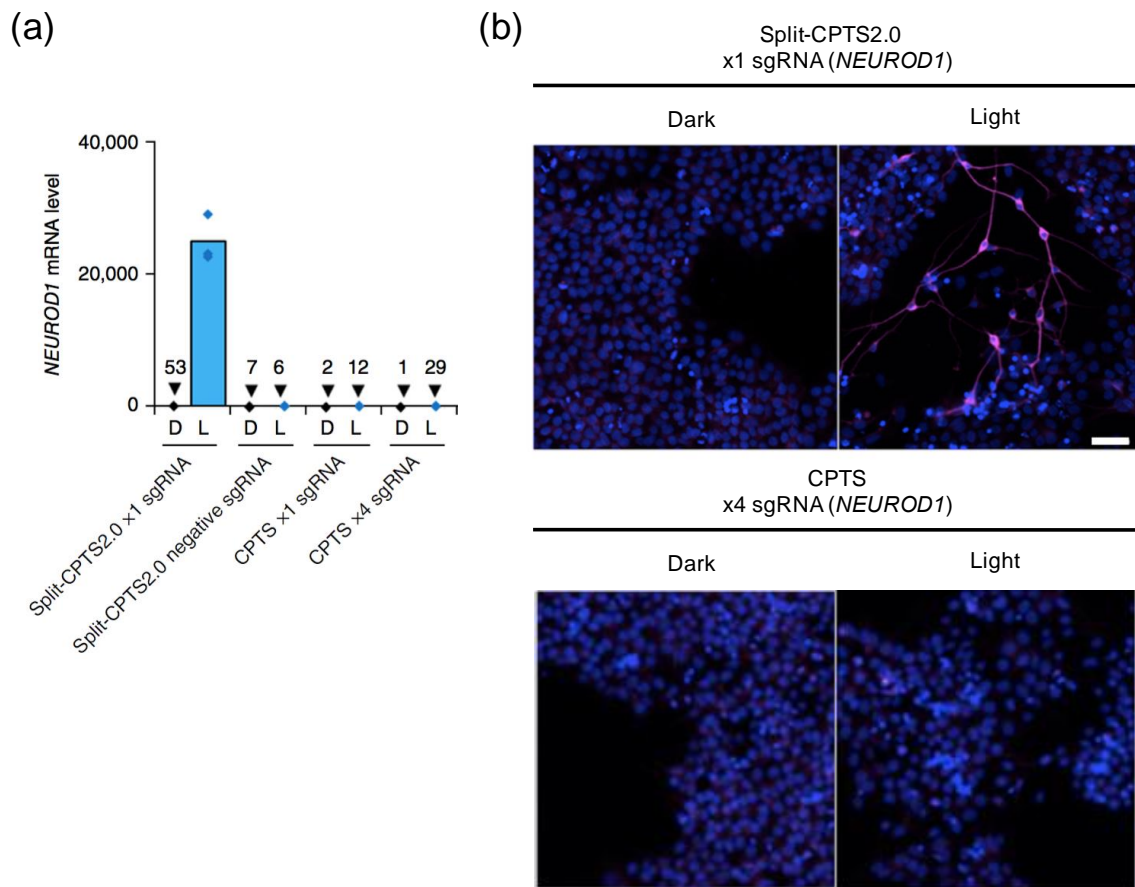


図2 Split-CPTS2.0によるiPS細胞から神経細胞への分化の光操作

(a) 従来の技術であるCPTSと本研究グループが新たに開発したSplit-CPTS2.0のiPS細胞における転写活性化能の比較（神経細胞への分化に関わっている*NEUROD1*遺伝子を例に）。その結果、Split-CPTS2.0ではCPTSよりも860倍強く、*NEUROD1*遺伝子の発現を光操作できることが分かりました。

(b) 蛍光免疫染色による神経細胞分化の評価（マゼンタが神経細胞）。Split-CPTS2.0によって、iPS細胞から神経細胞への分化を光刺激で操作することができました。一方、CPTSでは遺伝子発現効率が十分でないため、細胞分化を光操作することができませんでした。「CPTS」と「Split-CPTS2.0」はそれぞれの左側が暗所のデータ、右側が青色光照射時のデータ。