

青色光作動性 Gal4 転写因子と  
近赤外光作動性 Tet 転写因子の  
哺乳類細胞における機能向上とその応用

長崎 真治

# 目次

要旨.....	3
序論.....	5
1-1. 遺伝子発現の制御システム.....	6
1-2. 遺伝子発現の光操作.....	9
1-3. VVD を利用した青色光作動性 Gal4 転写因子.....	13
実験材料と方法.....	16
2-1. プラスミドの構築.....	17
2-2. 細胞培養.....	20
2-3. マウス.....	21
2-4. レンチウイルスベクター作製と形質導入された細胞の選別.....	21
2-5. 光照射装置.....	22
2-6. 光作動性転写因子の機能評価.....	23
2-7. 発光シグナルのリアルタイム測定.....	24
2-8. 発光イメージング.....	24
2-9. 固定した細胞の蛍光イメージング.....	25
2-10. ハイドロダイナミクス法による生体マウス肝細胞への遺伝子導入.....	25
2-11. ウイルスベクターを用いた成体マウス脳の細胞へ遺伝子導入.....	26
2-13. <i>Ex utero</i> エレクトロポレーションを用いた遺伝子導入.....	27
2-14. <i>In ovo</i> エレクトロポレーションを用いた遺伝子導入.....	27
2-15. フローサイトメーターを用いた蛍光シグナルの測定.....	28
2-16. 免疫組織染色と画像取得.....	28
2-17. 発光イメージングデータの解析.....	29
2-18. 遺伝子発現の光誘導能の時間的特性の定量.....	30
2-19. 統計解析.....	30
結果.....	31
哺乳類細胞における青色光作動性 Gal4 転写因子の機能向上.....	32
3-1. 機能向上型青色光作動性 Gal4 転写因子 (eGAV) の開発.....	32
3-2. eGAV 候補コンストラクトの遺伝子発現の光誘導能の時間特性の評価.....	44

3-3. eGAV の光スイッチを eMag に置き換えても光作動性転写因子としての性能は向上しない.....	48
3-4. eGAV は光量依存的な転写活性を示す .....	50
3-5. 目的遺伝子の安定性によって遺伝子発現の光誘導パターンを変化させることができる .....	52
3-6. eGAV を安定発現する哺乳類培養細胞における遺伝子発現の光応答性の評価	54
生体組織における eGAV を利用した遺伝子発現の光操作 .....	58
3-7. 発生期マウスの脳スライスにおける遺伝子発現の光操作.....	58
3-8. 成体マウスの海馬・歯状回における遺伝子発現の光操作.....	60
3-9. 生体マウスの肝細胞における遺伝子発現の光操作 .....	63
3-10. ニワトリ胚の脊髄における遺伝子発現の光操作 .....	66
考察.....	68
結語.....	72
引用文献.....	73
謝辞.....	80

## 要旨

次世代シーケンス解析やイメージング技術の発展により、シングルセルレベルで遺伝子発現動態やその制御機構が網羅的に解析されている。このような解析で観察された多様な遺伝子発現動態が、細胞や組織においてどのような機能を担っているかを検証するには、その複雑な動態変化をシングルセルレベルで自在に制御できるような技術の開発が必要である。近年、光遺伝学ツールの開発が進み、細胞内で数時間の周期で振動発現パターンを誘導できるなど、遺伝子発現を光で制御できる様々な技術が発展してきた。細胞が示す遺伝子発現変化は複雑であり、複数の遺伝子発現の相互作用を通じて、時には、細胞の表現型の表出に繋がっていると考えられる。

これまでに、アカパンカビ *Neurospora crassa* 由来の光受容体 Vivid (VVD) を利用した青色光作動性転写因子として、Gal4/UAS システムを基にした人工転写因子 hGAVPO が開発されている。しかしながら、哺乳類細胞に hGAVPO が高発現した条件下では、暗所における遺伝子発現の誘導活性 (バックグラウンド活性) が非常に高いことや、光量依存的な遺伝子発現量のコントロールが困難なことが欠点として挙げられていた。これらの欠点は、遺伝子発現の光操作の信頼性を低下させ、定量的な光操作の実現の障壁となっている。本研究では、光受容体 VVD を利用した光作動性 Gal4 転写因子の遺伝子発現の信頼性と光誘導能の向上を目的とし、VVD、Gal4 DNA 結合ドメイン、様々な転写活性化ドメインの最適な連結順序を評価した。その結果、hGAVPO よりも、暗所でのバックグラウンド活性が非常に低い、かつ、光照射下での転写活性が高い特徴を持った、機能向上型・青色光作動性 Gal4 転写因子 eGAV (enhanced Gal4-VVD 転写因子) を開発することに成功した。単発光照射に対する転写活性の光応答性を評価したところ、eGAV は hGAVPO よりも、光照射後の遺伝子発現誘導が速く、目的遺伝子の発現を 3 時間の周期で振動発現させることに成功した。また、eGAV は光量依存的な転写活性を持ち、目的遺伝子の発現量を高精度で光制御できることを示した。更に、eGAV を利用した実験の応用例として、哺乳類培養細胞だけではなく、マウス胎仔脳や成体マウスの脳に存在する神経幹細胞や神経前駆細胞、生体マウスの肝細胞、ニワトリ胚の脊髄に存在する神経前駆細胞や新生神経細胞において、目的遺伝子の発現を光操作できることを示した。今後、本研究で開発した eGAV を利用し、異なる複数の遺伝子の発現ダイナミズムを時空間的に高精度に光操作することで、光遺伝学の新展開を示すとともに、これまで遺伝子の過剰発現やノックアウト・ノックダウンという古典的な遺伝子発現操作だけでは見出せな



ったような、多細胞システムの中で細胞が示す、種々の複雑な遺伝子発現動態の機能的意義の検証が可能になると期待される。

# 第一章

## 序論

## 1-1. 遺伝子発現の制御システム

近年、次世代シーケンス (NGS, Next Generation Sequencing) 解析やイメージング技術の発展により、シングルセルの分解能で遺伝子発現動態やその制御機構が網羅的に解析されている。しかしながら、様々な遺伝子発現パターンが、細胞や組織においてどのような機能を担っているかを検証するには、その複雑な動態変化をシングルセルレベルで自在に制御できるような技術の開発が必要である。目的とする遺伝子の機能を調べる手段として、部位特異的組み換え酵素 Cre (Cyclization recombination enzyme) や Flp (Flippase) による遺伝子欠損、CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR associated protein 9) や TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) あるいは ZFN (Zinc-Finger Nuclease) によるゲノム編集制御、不活性型 Cas9 (Catalytically dead CRISPR-associated protein-9 nuclease, dCas9) を利用した内因性遺伝子の転写調節や、遺伝子発現に関与するエピゲノム状態を人為的に制御するツールの開発なども行われてきた (Nagy, 2000; Karimova et al., 2018; Makarova et al., 2006; Cong et al., 2013; Christian et al., 2010; Kim et al., 1996)。このように、多くの遺伝子発現制御システムが開発されてきたが、単なる遺伝子発現のオン・オフではなく、遺伝子発現が示す複雑な動態変化の機能的な意義を検証する場合、それらを人工的に細胞内で再構成させ、細胞の表現型を同時に解析するという構成的なアプローチが取られることが多い。そのような実験系においては、外来性遺伝子の発現を人為的に制御する遺伝子発現制御システムが活用されることが多い (Fischer et al., 1988; Brand and Perrimon, 1993; Gossen and Bujard, 1992)。

本研究では、外来性遺伝子の発現制御システムを、より高い時間的・空間的解像度でもって制御できるように改良し、特に、複数の遺伝子の発現動態の相互作用の機能的意義を、実験的に検証できるような遺伝学的ツールの開発を目標とした。外来性遺伝子の発現制御システムの中でも、Gal4/UAS (Upstream activation sequence) システム (図 1A) と Tet-OFF システム (図 1B, C) に着目した。

ショウジョウバエやゼブラフィッシュなどのモデル生物で使用されている Gal4/UAS システムは、酵母由来の Gal4 転写因子の二量体形成ドメインと DNA (Deoxyribonucleic acid) 結合ドメインに、転写活性化ドメインを連結した人工転写因子を利用する (図 1A) (Fischer et al., 1988; Brand and Perrimon, 1993)。ホモ二量体化した Gal4 人工転写因子は、そのターゲット配列である UAS 配列に結合し、下流の目的遺伝子の転写を促進させる。

Tet-ON/OFF システムは、大腸菌由来の転写リプレッサー (Tetracycline repressor, TetR) の転写抑制ドメインを、VP16 (Herpes simplex virus transcription factor VP16) や VP64 (Tandem 4-copy repeats of VP16 activation domain) などの転写活性化ドメインに置き換えた人工転写因子を利用する (図 1B, C) (Gossen and Bujard, 1992)。上述した Gal4/UAS システムとは異なり、Tet-ON/OFF システムは、低分子化合物テトラサイクリン、あるいは、ドキシサイクリン (Doxycycline, DOX) によって、遺伝子発現量を制御できる特徴がある。Tet-OFF システムでは、DOX 非存在下で目的遺伝子の発現を誘導し (図 1B)、一方の Tet-ON システムでは DOX 存在下で目的遺伝子の発現を誘導することができる (図 1C)。また、Tet-ON/OFF システムは、DOX 濃度依存的に遺伝子発現量を制御することができる。しかし、これらのシステムの欠点としては、可逆性が低く、空間的に高い分解能での制御ができないことが挙げられる。空間的な制御に関しては、Gal4 や Tet 転写因子を細胞種特異的プロモーターによって発現させる方法が挙げられるが、利用できるプロモーターは限られており、対象とする細胞集団で特異的に発現するプロモーターが同定されている場合にしかターゲットすることができない。また、細胞の物理的な空間配置とマーカーとなる遺伝子の発現は必ずしも相関があるわけではない。加えて、Tet-ON/OFF システムについては、DOX の投与と除去によって、時間的な制御は可能であるが、生体内や培養細胞における薬剤の残留時間は数日間と続くため、残存した DOX によって Tet-ON/OFF システムが影響を受けてしまい、数十分や数時間スケールでの遺伝子発現の制御はできない。また、空間的な低分子化合物の拡散制御に関しては、生体組織や培地中で DOX は拡散してしまうので、特定領域の細胞のみで遺伝子発現を制御することは困難である。

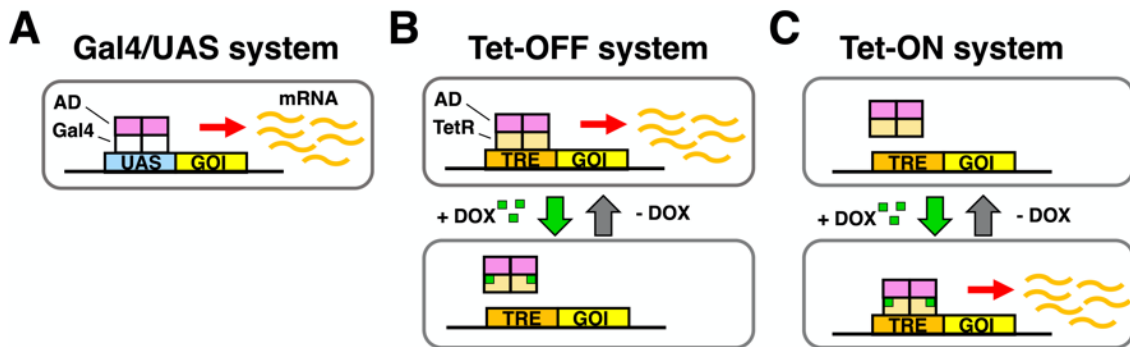


図 1. Gal4/UAS システムと Tet-ON/OFF システムの機序

- (A) Gal4/UAS システムは、二量体形成ドメインと DNA 結合ドメインから成る Gal4 (白色の四角) に、転写活性化ドメイン (Transcription activation domain, AD, 桃色の四角) を連結した Gal4 人工転写因子を利用する。ホモ二量体化した Gal4 転写因子は UAS (Upstream activation sequence) 配列に結合し、下流の目的遺伝子 (Gene of Interest, GOI) の転写を促進させる。
- (B) Tet-OFF システムは、TetR (Tetracycline repressor, 薄黄色の四角) と 転写活性化ドメイン (AD, 桃色の四角) を連結した Tet 人工転写因子を利用する。Tet 人工転写因子がホモ二量体化することで、TRE (Tetracycline-responsive promoter element) 配列に結合し、下流の目的遺伝子の転写を促進させる。また、低分子化合物ドキシサイクリン (Doxycycline, DOX) を取り込むと TetR は TRE 配列に結合できず、転写は誘導されない。
- (C) Tet-ON システムは、TetR の変異体 rTetR (reverse tetracycline repressor, 薄黄色の四角) によって、DOX 非存在下では、TRE 配列に結合できないが、DOX 存在下では TRE 配列に結合し、下流の目的遺伝子の転写を促進させる。

## 1-2. 遺伝子発現の光操作

上述したように Tet-ON/OFF システムは、低分子化合物による制御が可能であり、優れた遺伝子発現制御システムであるが、可逆性が限られているだけではなく、時空間的分解能が低いといった欠点がある。そこで、このような欠点を解消するために発展してきたのが、光受容体と Gal4 あるいは Tet 転写因子とを組み合わせた遺伝子発現の光操作技術である。光照射のオン・オフは高い時間分解能でコントロールでき、また、光量も定量的にコントロールできる。光を遺伝子発現のスイッチの媒体として利用し、光やその制御の利点を、転写因子の活性制御に反映させるようなツール開発が精力的に行われてきた。光作動性転写因子では、光照射のオン・オフにより、高い時間分解能で可逆的な活性操作が可能であるだけでなく、光量依存的に遺伝子の発現量を制御できることも報告されている。また、デジタルミラーデバイス等の、特定の空間領域に光を限局照射するデバイスを用いることで、狙った細胞特異的に遺伝子発現を制御することも可能になる。遺伝子発現の光制御技術を用いることによって、従来の低分子化合物を利用した遺伝子発現制御システムでは不可能であった、複雑な遺伝子発現パターンを時空間的に高い分解能で再構成することが可能になり、遺伝子発現ダイナミクスの機能的意義の解析が進んできた (Imayoshi et al., 2013; Chan et al., 2015; Nihongaki et al., 2017; Isomura et al., 2017; Shao et al., 2018; Yoshioka-Kobayashi et al., 2020; Zhou et al., 2022)。

現在、様々な生物種由来の光受容体が報告されているが、遺伝子発現の光操作ツールに適用されているものは、光受容後に立体構造変化が起こり、(1) ホモ複合体を形成するもの、(2) ヘテロ複合体を形成するものといった 2 タイプに大別することができる。紫外光から近赤外光まで、異なる波長の光に応答する様々な光受容体が知られているが、主に使用されているのは青色光応答性の光受容体である。

(1) 光依存的にホモ複合体を形成する光受容体で、青色光作動性転写因子の光スイッチとして利用されるのは、アカパンカビ *Neurospora crassa* 由来の Vivid (VVD) (Wang et al., 2012) と、エリスロバクター・リトラリス *Erythrobacter litoralis* 由来の EL222 (Motta-Mena et al., 2014) が例として挙げられる。これらを利用した人工転写因子の特徴としては、光受容体と DNA 結合ドメイン、転写活性化ドメインの 3 つの機能タンパク質ドメインを連結させた 1 種類の融合タンパク質から構成されることである (図 2)。作動機序としては、単量体の人工転写因子はその標的配列に結合

できないが、光を吸収してホモ二量体を形成することで、標的配列に結合できる特性を利用する。つまり、光照射によって、光受容体を介してホモ二量体が形成され、人工転写因子が標的配列に結合することで、転写活性化ドメインを介した転写が開始する。

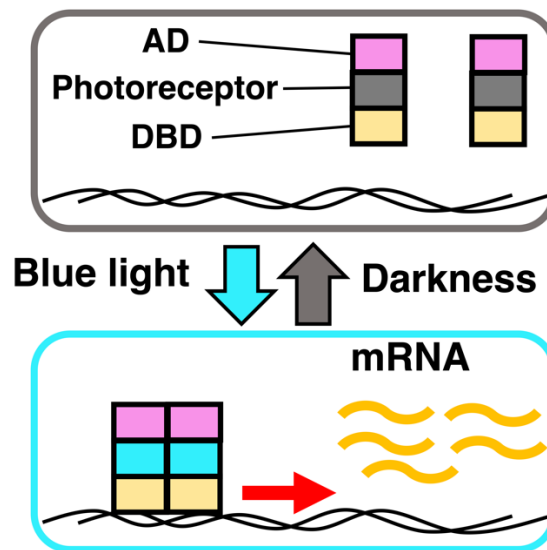


図 2. ホモ複合体を形成する光受容体を利用した青色光作動性転写因子

転写活性化ドメイン (AD, 桃色の四角)と、光受容体 (Photoreceptor, 灰色もしくは水色の四角)と、DNA 結合ドメイン (DNA-binding domain, DBD, 薄黄色の四角)を持つ人工転写因子の模式図。暗所では、人工転写因子は単量体として安定的に存在するが、青色光照射によってホモ複合体を形成する。これにより、標的配列に結合することができ、転写活性化ドメインを介して、下流に配置した目的遺伝子の転写が誘導される。

(2) 光依存的にヘテロ複合体を形成する光受容体で、青色光作動性転写因子の光スイッチとして利用されるのは、シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* 由来の Cry2/CIB1 (Cryptochrome 2/Cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix 1) (Kennedy et al., 2010; Aoki et al., 2017; Taslimi et al., 2016; Quejada et al., 2017)、アカパンカビ *Neurospora crassa* 由来の Magnet (Kawano et al., 2015)、シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* 由来の FKF1/GI (Arabidopsis photoreceptor Flavin Kelch-repeat F-box 1/GIGANTEA) (Yazawa et al., 2009; Quejada et al., 2017)、エンバク *Avena sativa* 由来の TULIPs (Tunable light-controlled interacting protein tags) (Strickland et al., 2012)、同じくエンバク *Avena sativa* 由来の oLID/iLID (original light-inducible dimer/improved light-inducible dimer) (Guntas et al., 2015; Hallett et al., 2016) などが主に挙げられる。これらは、光スイッチの片方のタンパク質に DNA 結合ドメインを融合させ、別の片方のタンパク質に転写活性化ドメインを融合させた、2 種類の融合タンパク質から構成される (図 3)。作動機序は、暗所では人工転写因子はヘテロ複合体を形成しないが、光照射下では、光受容体を介して DNA 結合ドメインと転写活性化ドメインのヘテロ複合体が形成され、転写因子が再構成され、標的配列下流の遺伝子の転写を誘導する。ヘテロ複合体を形成する光受容体として、特に利用されるのは Cry2/CIB1 システムと Magnet システムである。これらは変異体スクリーニングによって、暗所のバックグラウンド活性が低い変異体や、解離が速い、もしくは遅い変異体が同定されており、他の光受容体と比較して分子進化が進んでいる。また、マウス生体やヒト由来培養細胞、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエを含め、様々なモデル生物や細胞で利用されている実績もあり、Cry2/CIB1 システムと Magnet システムは、光スイッチとしての信頼性が高いとされる。

光受容体は、発色団を取り込むことで光応答性を獲得する (Yamada et al., 2020a)。VVD、Magnet、Cry2 は発色団として Flavin adenine dinucleotide (FAD) を必要とし、FKF1、TULIPs、oLID/iLID、EL222 は発色団として Flavin mononucleotide (FMN) を必要とする。FAD と FMN は哺乳類細胞において豊富に存在するため、これらの光受容体を哺乳類細胞に発現させた場合でも、外部から発色団を添加する必要はないとされる。



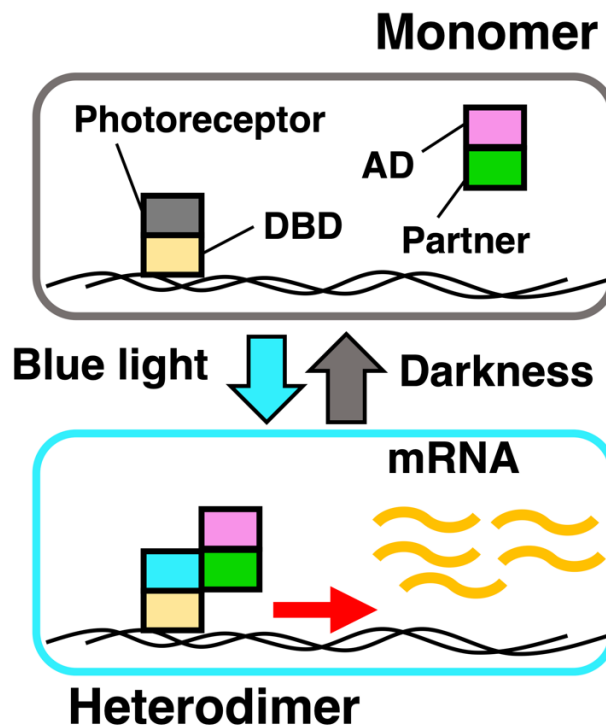


図 3. ヘテロ複合体を形成する光受容体を利用した青色光作動性転写因子

DNA 結合ドメイン (DBD, 薄黄色の四角) と光受容体 (Photoreceptor, 灰色もしくは水色の四角) から成る融合タンパク質と、転写活性化ドメイン (AD, 桃色の四角) と、光受容体の結合パートナータンパク質 (Partner, 緑色の四角) から成る融合タンパク質を利用した人工転写因子の模式図。暗所では、それぞれホモ単量体、もしくはホモ複合体として安定的に存在するが、青色光照射によってヘテロ複合体を形成する。これにより、転写活性化ドメインが目的遺伝子の近傍にリクルートされ、転写が誘導される。なお、融合タンパク質の組み合わせとしては、融合させるタンパク質を入れ替えて、DNA 結合ドメインと光受容体の結合パートナータンパク質から成る融合タンパク質と、転写活性化ドメインと光受容体から成る融合タンパク質を用いても作動機序は成立する。

### 1-3. VVD を利用した青色光作動性 Gal4 転写因子

アカパンカビ *Neurospora crassa* 由来の光受容体である Vivid (VVD) は、青色光を照射されると、発色団 Flavin adenine dinucleotide (FAD) が 108 番目のシステインと共有結合することで light, oxygen, voltage (LOV) ドメインの立体構造が変化し、ホモ二量体の形成が誘導される (Zoltowski et al., 2007; 2008; 2009)。この特性を利用し、VVD に目的のタンパク質を連結させることで、融合タンパク質のホモ二量体形成を青色光依存的に誘導することができる。また、同じく青色光受容体として汎用される Cryptochrome 2 (Cry2) の分子サイズ 57 kDa と比較して、VVD の分子サイズは 17 kDa と小さく、連結されたタンパク質ドメインに対して立体構造的な影響を与えにくい点で優れている。

上述したように、VVD を利用した青色光作動性 Gal4 転写因子として、GAVPO が開発されている (Wang et al., 2012)。GAVPO は、酵母由来 Gal4 の DNA 結合ドメインと、転写活性化因子 p65 の転写活性化ドメインを、VVD に連結させた人工転写因子である。GAVPO を利用して遺伝子発現を光操作するためには、Gal4 の結合塩基配列 (UAS) 下流に、最小の TATA ボックスと、目的遺伝子を配置したコンストラクトを、GAVPO と共に遺伝子導入する。作動機序としては、暗所では GAVPO は単量体として存在するが、青色光を吸収すると、VVD を介したホモ二量体形成が誘導される (図 4)。ホモ二量体化した Gal4 DNA 結合ドメインは UAS 配列に結合することができ、これにより、p65 転写活性化ドメインが UAS 配列近傍にリクルートされる。その結果、TATA ボックス上に p65 転写活性化ドメインを介して転写開始複合体が形成されることで、下流の目的遺伝子の転写が誘導される。

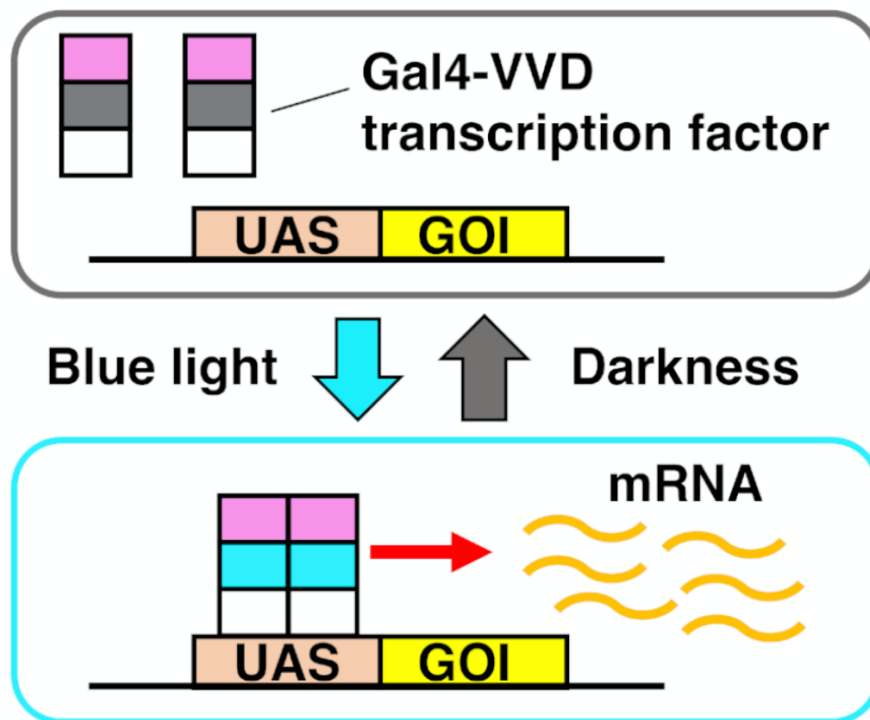


図4. GAVPO による遺伝子発現の光操作

GAVPO は、二量体化ドメインを欠失させた Gal4 DNA 結合ドメイン (白色の四角) と、転写因子 p65 の転写活性化ドメイン (桃色の四角) を、VVD (灰色もしくは水色の四角) に連結させた人工転写因子である。GAVPO は暗所では単量体として存在し、UAS 配列に結合できない。光照射下では、GAVPO はホモ二量体を形成し、Gal4 DNA 結合ドメインを介して UAS 配列に結合することで、下流の遺伝子の発現を誘導する。光を吸収する VVD の発色団は、FAD であり、菌類や植物、哺乳類細胞に内在する。

GAVPO は、他の光操作ツールと比較して、目的遺伝子発現を高いレベルで光誘導できることが報告されており、持続的な青色光照射下では、CMV プロモーターなどの恒常活性型プロモーターを用いた場合と同程度の遺伝子発現量を誘導することができる (Wang et al., 2012; Yamada et al., 2020b)。そのため、ヒト用にコドン最適化した hGAVPO (Imayoshi et al., 2013) も含め、遺伝子発現の光操作ツールを細胞生物学の研究に応用した例も複数報告されている (Imayoshi et al., 2013; Shimojo et al., 2016; Isomura et al., 2017; Sueda et al., 2019)。しかしながら、繰り返し述べることになるが、哺乳類細胞内で GAVPO/hGAVPO を高発現させた条件下では、暗所における遺伝子発現の誘導活性 (バックグラウンド活性) が非常に高いことや、遺伝子発現を光量依存的に制御することが難しいといった問題を抱えている。これらの問題は、より高精度で遺伝子発現を光操作する際の障壁になると考えられる。

これまでの光作動性転写因子の開発研究では、構成するタンパク質ドメインの種類や配置を検討することで、その暗所バックグラウンド活性の低下や、光照射時の遺伝子発現応答の向上に成功した例が報告されている (Nihongaki et al., 2017; Yamada et al., 2018; 2020b)。しかしながら、VVD を利用した光作動性 Gal4 転写因子に関しては、構成するタンパク質ドメインの種類や配置の最適化は、これまでに十分に実施されておらず、検証の余地があると考えた。よって、本研究では、遺伝子発現の高い光誘導能を維持しつつ、暗所におけるバックグラウンド活性が低い、かつ、光量依存的な遺伝子発現の制御性を向上させた、機能向上型の青色光作動性 Gal4 転写因子の開発に取り組んだ。

## 第二章

### 実験材料と方法

## 2-1 プラスミドの構築

制限酵素処理した発現ベクターと DNA 断片は、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Takara, U0609C) を用いて精製した。DNA フラグメントのライゲーションには、Ligation mix (Takara, #6023) もしくは NEBuilder HiFi DNA Assembly (New England Biolabs, E2621) を用いた。ライゲーション後の産物は、コンピテントセル (E. coli DH5α Competent Cells, Takara, 9057) にトランスフォーメーションした。プラスミドのミニプレップには、PureLink[™] Quick Plasmid Miniprep Kit (Thermo, K210011) を用いた。

eGAV 候補コンストラクトのスクリーニング実験において、ヒトポリペプチド鎖伸長因子 EF-1α (Human elongation factor-1α) 遺伝子プロモーター配列 (pEF) を搭載した hGAVPO の発現ベクター (pEF-hGAVPO) (Imayoshi et al, 2013; Yamada et al, 2020b; Wang et al, 2012) から Gal4 の DNA 結合ドメイン (DNA-binding domain, DBD) のアミノ酸残基 1–65 の complementary DNA (cDNA) を、Polymerase chain reaction (PCR) により増幅した。また、変異 (N56K および C71V) が導入された光受容体 VVD のアミノ酸残基 37–186 の cDNA を、pEF-hGAVPO から PCR で増幅した。転写活性化ドメイン (Transcription activation domain, AD) に関しては、p65 (ヒト p65 のアミノ酸残基 286–550)、VP16 (単純ヘルペスウイルス VP16 のアミノ酸残基 413–490)、VP64 (4 つの VP16 AD をタンデムに反復した人工転写因子)、Rta (ヒトガンマヘルペスウイルス 4 の複製・転写活性化因子)、HSF1 (ヒト熱ショック転写因子 1)、VPR (VP64 と p65 と Rta をタンデムに連結させた人工転写因子)、VPRmini (VPR の p65 と Rta の転写活性化ドメインを最小限に改良した人工転写因子) を用いた (van Essen et al., 2009; Sadowski et al., 1988; Seipel et al., 1992; Noda and Ozawa, 2018; Beerli et al., 1998; Regier et al., 1993; Lu et al., 2006; Barna et al., 2018; Kunii et al., 2018; Chavez et al., 2015; Vora et al., 2018)。VP16 および VP64 の cDNA は、小澤岳晶教授 (東京大学) より分与していただいた (Noda and Ozawa, 2018)。p65 および Rta の cDNA は、それぞれ pEF-hGAVPO および PB-TRE-dCas9-VPR から PCR 反応により増幅した。PB-TRE-dCas9-VPR は George Church 教授 (Wyss Institute) より分与していただいた (Addgene plasmid #63800) (Chavez et al., 2015)。HSF1 の cDNA は、佐久間哲史博士 (広島大学) から分与していただいた (Kunii et al., 2018)。VPR (Chavez et al., 2015) については、VP64、p65、Rta の cDNA を PCR 反応により

増幅し、NEBuilder HiFi DNA Assembly を用いて、3 つの cDNA を連結させた。VPRmini (Vora et al., 2018) については、VP64 および p65 (アミノ酸残基 100–261) および Rta (アミノ酸残基 125-190) の cDNA を PCR 反応により増幅し、3 つの cDNA を NEBuilder HiFi DNA Assembly を用いて連結させた。これらの cDNA を用い、Gal4 DBD と転写 AD と VVD を連結させた eGAV 候補コンストラクトを、ヒトポリペプチド鎖伸長因子 EF-1 $\alpha$  遺伝子プロモーター配列 (pEF) とポリアダニル化シグナル (polyA, pA) を持つ発現ベクタープラスミド (pEF-BOS および pEF-BOS を由来とする発現ベクター) に挿入した (Mizushima and Nagata, 1990)。eGAV 候補コンストラクトの各ドメイン間には、3 つのグリシン-セリン (3x GS) リンカー、または、制限酵素 (RE) 標的部位を挿入した。また、Magnet の熱安定性改良型 (enhanced Magnets, eMags) をコードする配列を、ヒト用にコドン最適化し (Fasmac, Kanagawa, Japan)、eMags を用いた eGAV-eMag をコンストラクトした。

レンチウイルスベクター用のプラスミド構築では、CSII-CAG (CMV early enhancer/chicken  $\beta$  actin promoter)-MCS (Multiple cloning site) (Yamada et al., 2018; Imayoshi et al., 2013; Miyoshi, 2004) から PCR 反応により増幅した CAG プロモーター配列を、CSII-EF-MCS-IRES2 (Internal ribosome entry site)-mCherry-NLS (Nuclear Localization Sequence) (Yamada et al., 2018; Imayoshi et al., 2013; Miyoshi, 2004) の EF プロモーター配列と置換した。この CSII-CAG-MCS-IRES2-mCherry-NLS のクローニングサイトに eGAV の cDNA を挿入し、CSII-CAG-eGAV-IRES2-mCherry-NLS を作製した。UAS (Upstream activation sequence) レポーターのレンチウイルスベクターに関しては、CSII-EF-MCS (Miyoshi, 2004) を AgeI の反応によって EF プロモーター配列を除去し、5x UAS 配列とマウス *Hes1* (*Hairy enhancer of split 1*) 遺伝子の 3' 非翻訳領域 (3' untranslated region, 3' UTR) の配列を挿入した。この CSII-5x UAS-MCS-Hes1 3' UTR の 5x UAS 配列の下流に Ub (Ubiquitin)-NLS-Luciferase (Luc2) の cDNA を挿入した。また、ピューロマイシンおよび HaloTag® (Promega, G6050) を利用したセレクションのために、chicken hypersensitive site 4 (cHS4)-insulator-pEF-Puro-Halo の cDNA を、5x UAS 配列の上流に挿入した。蛍光タンパク質レポーターのレンチウイルスベクターに関しては、CSII-5x UAS-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR を PacI と AscI で切断し、

Ub-NLS-Luc2 の cDNA を除去した。次に、マウスオルニチンデカルボキシラーゼドメインをヒト用にコドン最適化した PEST 配列を、黄色蛍光タンパク質 (Yellow fluorescent protein, YFP) Achilles の C 末端に融合させた、不安定化 Achilles (Achilles-NLS-PEST) (Yoshioka-Kobayashi et al, 2020) の cDNA を PCR 反応により増幅し、NEBuilder HiFi DNA Assembly を用いて挿入した。Achilles の cDNA は、宮脇敦史教授 (理化学研究所 脳神経科学研究センター) より分与していただいた。

一過性トランスフェクションに用いた UAS レポータープラスミドの構築に関しては、5x UAS-Ub-Luc2-Hes1 3' UTR 配列を PCR 反応によって増幅し、pSP72 vector (Promega, P2191) に NEBuilder HiFi DNA Assembly を用いて挿入した。また 5x UAS-Achilles-NLS-PEST-Hes1 3' UTR を構築するために、PB-TRE-dCas9-VPR (Addgene plasmid #63800) を SpeI と ApaI で切断して TRE-dCas9-VPR の cDNA を除去し、5x UAS-Achilles-NLS-PEST の cDNA を PCR 反応で増幅し、NEBuilder HiFi DNA Assembly を用いて挿入した。また、5x UAS-mScarlet-I-NLS-PEST-Hes1 3' UTR を構築するために、mScarlet-I の cDNA については pEB2-mScarlet-I から、NLS-PEST の cDNA については 5x UAS-Achilles-NLS-PEST-Hes1 3' UTR から PCR 反応でそれぞれ増幅し、NEBuilder HiFi DNA Assembly を用いて連結させ、制限酵素処理によって Achilles-NLS-PEST の cDNA を除去した 5x UAS-Achilles-NLS-PEST-Hes1 3' UTR に挿入した。pEB2-mScarlet-I は、Philippe Cluzel 教授から分与していただいた (Addgene plasmid # 104007) (Balleza et al., 2018)。

*In ovo* electroporation で用いたプラスミドの構築に関しては、pEF-eGAV の pEF 配列を、CSII-CAG-MCS から PCR 反応で増幅し CAG プロモーター配列に置き換え、CAG-eGAV を作製した。次に、CAG-eGAV を SalI および NotI で切断し、mRuby3-C1 から PCR 反応によって mRuby3 の cDNA を増幅し、NEBuilder HiFi DNA Assembly を用いて挿入することで、CAG-mRuby3 を作製した。mRuby3-C1 は Salvatore Chiantia 教授より分与していただいた (Addgene plasmid #127808) (Dunsing et al., 2018; Bajar, 2016)。



本研究で使用したすべてのコンストラクトは、DNA シーケンサー (Applied Biosystem ジェネティックアナライザー, 3500xL-150) を用いたサンガー法によって塩基配列が正しいものであることを確認した。

## 2-2. 細胞培養

HEK (Human Embryonic Kidney) 293T 細胞、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞、EpH4 細胞 (EpH4 Mouse Mammary Epithelial Cell) (American Type Culture Collection) を使用した。培地には、10%ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum, FBS; ThermoFisher, Hyclone, SH30071.03; Sigma-Aldrich, S173012, Lot: S.BCCC3916) と、100 units/mL penicillin · 100 mg/mL of streptomycin (Nacalai Tesque, 09367-34) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan 08458-16; ThermoFisher, Waltham, USA, 11039047) を用い、37°C、5%CO<sub>2</sub> で培養した。継代は、HEK293T 細胞と NIH3T3 細胞には 0.05% Trypsin/EDTA (Nacalai Tesque, 32778-05) を用い、EpH4 細胞と HeLa 細胞には、0.25% Trypsin/EDTA (Nacalai Tesque, 32777-15) を用い、37°C で 5 分間反応させた。その後、培地を加えて懸濁し、遠心 (400 g, 3 分) した。遠心後、上清を除去し、沈殿した細胞を新たな培地で懸濁して播種した。

### 2-3. マウス

実験動物のプロトコルは、京都大学動物実験委員会で認可されたものを用いた（承認番号 Lif-K22008）。また、すべての動物実験は、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」に従って行われた。マウス胎仔脳を使用した実験に関しては、日本エスエルシー株式会社から購入した妊娠 14 日目の ICR 雌マウスを用いた。成体のマウス脳を使用した実験に関しては、日本エスエルシー株式会社から購入した 12 週齢の C57BL/6N 雄マウスを用いた。マウスの肝臓を使用した実験に関しては、日本エスエルシー株式会社から購入した 4 週齢の ICR 雌マウスを用いた。

### 2-4. レンチウイルスベクター作製と形質導入された細胞の選別

レンチウイルス粒子の精製には、パッケージングプラスミドを用いた既報のプロトコル (Imayoshi et al., 2013; Miyoshi, 2004) を参照した。すなわち、パッケージングプラスミド (psPAX2) と、エンベローププラスミド (pMDG.2) と、ベクタープラスミドを HEK293T 細胞に一過性トランスフェクションして、培養上清中のレンチウイルス粒子を精製した。1 種類のレンチウイルスベクターの作製につき、10 cm dish を 5 枚分用意した。まず、10 cm dish に、 $3.0 \times 10^6$  cell/dish の密度で HEK293T 細胞を播種し、24 時間後にトランスフェクションを実施した。トランスフェクションは、10 cm dish 1 枚につき、950  $\mu$ l の Opti-MEM (Gibco, 31985070) に、CSII-CAG (8.4  $\mu$ g)、PsPax2 (6.2  $\mu$ g)、pMDG.2 (2.6  $\mu$ g) と Polyethylenimine "Max" (コスモ・バイオ株式会社, PEI MAX) (86.0  $\mu$ g) を混合し、室温で 25 分間静置した後、HEK293T 細胞の培養液中に添加した。添加してから 8 時間後に、Dimethyl sulfoxide (DMSO) 中に溶解した 1 mM Forskolin (Wako, Cat.No. 063-02193) を 1  $\mu$ l 加えた培地に置換して、48 時間培養した。その後、培養上清を回収し、0.45  $\mu$ m 滅菌フィルター (PALL Life Sciences, Acrodisc 25 mm Syringe Filter, GM4614, 0.45 $\mu$ m) に通し、4°C、11,000 *g* で 12 時間遠心した。遠心後の沈殿を Phosphate-buffered saline (PBS) で溶解した後、4°C、13,000 *g* で 4 時間遠心し、30  $\mu$ l の PBS に沈殿を溶解し、-80°C で保存した。作製したレンチウイルスの力価は、qPCR Lentivirus Titration Kit (コスモ・バイオ株式会社, LV900) を用いて測定し、いずれも  $10^8$ – $10^9$  infectious units/mL であった。培養細胞には、精製レンチウイルス粒子を 10–50 の感染多重度 (MOI) で感染させた。形質導入された EpH4 細胞には、フローサイトメーター (BD Biosciences, FACSAriaIIIu) を用いて、mCherry と

HaloTag を共発現する細胞をソーティングした。また、形質導入された HEK293T 細胞については、青色光 ( $7.10 \text{ W m}^{-2}$ ) を 30 秒オン、180 秒オフのサイクルで 6 時間照射した後、フローサイトメーター (BD Biosciences, FACSAriaIIIu) を用いて、Achilles 陽性細胞をソーティングした。

## 2-5. 光照射装置

CO<sub>2</sub> インキュベーター内の培養細胞と、マウスの肝臓への青色光照射には、465 nm LED (Light-emitting diode) (日亜化学工業株式会社, NCSB119) を配列した LED アレイ (エビス電子株式会社) と、LED 青色光源 (オプトコード株式会社, LEDB-SBOXH) を使用した。顕微鏡下での青色光照明には、470 nm の LED アレイモジュール (LAM) を備えた pE-2 LED 励起システム (CoolLED) を用いた。成体のマウス脳における青色光照射には、470 nm LED (Thorlabs, M470F3) に光ファイバーパッチケーブルとロータリージョイントで接続した光ファイバーカニューラ (Thorlabs, CFMLC52L02) を用いた。蛍光レポーターを導入した HEK293T 培養細胞の限局照射には、共焦点顕微鏡 (Zeiss, LSM980) を使用した。40 倍の対物レンズ用い、 $212.13 \mu\text{m} \times 212.13 \mu\text{m}$  の範囲 ( $1024 \text{ pixels} \times 1024 \text{ pixels}$ ) を、488 nm の Argon laser ( $0.8 \mu\text{W}$ ) で、3 分間隔で細胞を光刺激した。光刺激の条件は、1 ラインごとに 4 回反復、速度は  $0.77 \mu\text{s/pixel}$ 、Z 軸方向  $17.46 \mu\text{m}$  を  $5.82 \mu\text{m}$  の z 軸ステップでスキャンした。すべての実験において、ライトメーター (Thorlabs, PM100A, S120VC) を用いて光量測定した。

## 2-6. 光作動性転写因子の機能評価

eGAV 候補コンストラクトのスクリーニングにおいて、HEK293T 細胞は  $6 \times 10^4$  cells/well、NIH3T3 細胞は  $2.5 \times 10^4$  cells/well の密度で 24 well プレートに播種した。これらの細胞を 24 時間培養した後、eGAV 候補コンストラクトの発現プラスミド、および、5x UAS-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR レポータープラスミドを、PEI MAX を用いて一過性トランスフェクションした。ネガティブコントロールとして、転写活性ドメインを含まない Gal4 DBD の発現プラスミドと、空ベクターである pBluescript を使用した。また、光非依存性 Gal4 転写因子として Gal4-VN8x6 の発現プラスミドを用いた (Salghetti et al., 2000)。各発現プラスミドは  $0.4 \mu\text{g/well}$ 、5x UAS-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR レポータープラスミドは  $0.1 \mu\text{g/well}$  となるようにトランスフェクションした。トランスフェクションしてから 24 時間後に、青色光 ( $7.10 \text{ W m}^{-2}$ ) を 30 秒オン、180 秒オフのサイクルで 24 時間、細胞に光照射した。その後、Luciferase Assay System (Promega, E1501) を使用して細胞を溶解し、高感度マルチプレートリーダー (Promega, GloMax Explorer) を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。

## 2-7. 発光シグナルのリアルタイム測定

ルシフェラーゼ活性をライブセルで経時的に測定するために、光電子増倍管 (photomultiplier tube, PMT) を光検出器として使用した高感度の生物発光測定装置 (中立電機株式会社, CL24B-LIC/B) を用いた。まず、HEK293T 細胞を  $1 \times 10^4$  cells/well の密度で、黒色 24 ウェルプレート (ビーエム機器株式会社, 303012) に播種した。播種してから 24 時間後に、1 mM の D-luciferin (ナカライテスク株式会社, 01493-85) を含む培地に置き換え、光作動性転写因子の発現プラスミドは 0.4  $\mu\text{g}/\text{well}$  で、発光レポータープラスミドの 5x UAS-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR は 0.1  $\mu\text{g}/\text{well}$  で、HEK293T 細胞に PEI MAX を用いて一過性トランスフェクションした。その後、生物発光測定装置に 24 ウェルプレートをセットし、10 分ごとに各ウェルの発光シグナルを測定した。最初の光照射は、トランスフェクションしてから 36 時間後に実施した。

## 2-8. 発光イメージング

eGAV と発光レポーターを安定発現する EpH4 細胞、もしくは、一過性トランスフェクションしたマウス胎仔脳は、35 mm ガラスボトムディッシュ (IWAKI, 3910-035) 上で、1 mM の D-luciferin を含む培地を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。発光シグナルの取得には、冷却 Charge coupled device (CCD) カメラ (Andor, iKon-MDU934P-BV) を搭載した倒立顕微鏡 (株式会社エビデント, IX83) を用いた。顕微鏡とイメージングシステムの制御は、MetaMorph®イメージングソフトウェア (Molecular Devices) を使用した。Eph4 細胞の撮像は 40 倍の対物レンズを使用し、マウス胎仔脳の撮像は 10 倍の対物レンズを使用した。また、サンプル準備と撮像はすべて暗所にて実施した。

## 2-9. 固定した細胞の蛍光イメージング

HEK293T 細胞を 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝生理食塩水 (4% PFA (Paraformaldehyde)/PBS) を用い、15 分間、室温で固定した後、PBS で洗浄した。蛍光画像は、共焦点顕微鏡 (Zeiss, LSM880) を用いて取得した。

## 2-10. ハイδροダイナミクス法による生体マウス肝細胞への遺伝子導入

日本エスエルシー株式会社から購入した、4 週齢の ICR 雌マウスを用いた。マウス肝組織への一過性トランスフェクションは、10  $\mu\text{g}$  の pEF-eGAV または pEF-hGAVPO、30  $\mu\text{g}$  の 5x UAS-Achilles-NLS-PEST-Hes1 3' UTR レポーター、および、10  $\mu\text{g}$  の pEF-mCherry-NLS を含む 2 mL の生理食塩水を、既報のプロトコル (Liu et al., 1999) を参照して尾静脈内に 5~7 秒間で急速に注入した。光照射をするマウスは、DNA 溶液を注入してから 2 時間後に腹部を除毛し、465 nm LED (日亜化学工業株式会社, NCSB119) を配列した LED アレイ (エビス電子株式会社) を用い、20 時間 (1 分オン、1 分オフのサイクル)、自由行動下で光照射した。光量は既報のプロトコル (Wang et al., 2012) を参照し、90  $\text{mW cm}^{-2}$  とした。一過性トランスフェクションしてから 22 時間後にマクロズーム顕微鏡 (株式会社エビデント, MVX10) を用い、蛍光画像を取得した。

## 2-11. ウイルスベクターを用いた成体マウス脳細胞への遺伝子導入

成体マウスの海馬・歯状回の神経幹細胞および前駆細胞における、ウイルスベクターを利用した遺伝子導入では、既報のプロトコル (Yamada, 2018; Kawashima et al., 2013; Sano and Yokoi, 2007) を参照し、定位脳手術装置を使用して実施した。日本エスエルシー株式会社から購入した、12 週齢の C57BL/6N 雄マウス (日本 SLC) に、0.3 mg/kg 塩酸メドミジン (日本全薬工業株式会社)、4.0 mg/kg ミタゾラム (サンド株式会社)、5.0 mg/kg 酒石酸ブトルフェノール (Meiji Seika ファルマ株式会社) の 3 種混合麻酔を用い、腹腔内投与によって麻酔をした。ウイルスベクターの海馬・歯状回への注入は、ブレグマから後方 2.0 mm、右方 1.3 mm、深さ 1.80 mm の座標で実施した。海馬・歯状回への光照射は、レンチウイルスベクターを注入後 7 日目に開始した。成体マウスの海馬・歯状回への光照射は、470 nm 青色光 LED (Thorlabs, M470F3) に光ファイバーパッチケーブルとロータリージョイントで接続した光ファイバーカニューラ (Thorlabs, CFMLC52L02) を用い、ブレグマから後方 2.0 mm、右方 1.3 mm、深さ 1.20 mm の座標でマウスの脳内に設置した。光量はライトメーター (Thorlabs, PM100A, S120VC) を用いて測定し、青色光照射は 12.6  $\mu$ W で 12 時間 (30 秒オン、180 秒オフのサイクル) で実施した。光照射後、麻酔をしたマウスを 4% PFA/PBS で灌流固定し、脳を摘出し、免疫組織化学染色を実施した。

### 2-13. *Ex utero* エレクトロポレーションを用いた遺伝子導入

発生期マウス脳における eGAV の光応答性転写活性の評価のため、pEF-mCherry-NLS、pEF-eGAV および 5x UAS-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR を質量比 2:9:9 で混合し、子宮外エレクトロポレーション (*Ex utero* electroporation) によって、胎生 14.5 日目のマウス胎仔の終脳背側領域の神経幹細胞および前駆細胞に一過性トランスフェクションした (Imayoshi et al., 2013)。プラスミド混合溶液 (2.5 µg/µl) は、ガラスキャピラリーを用いて、マウス胎仔脳の側脳室に注入し、エレクトロポレーター (ネッパジーン株式会社, NEPA21) を用いて、エレクトロポレーション (電圧 50 V, 50 ミリ秒オン、950 ミリ秒オフで 6 パルス) を行った。その後、胎仔脳を摘出し、3% 低融点アガロースに包埋し、ビブラトーム (Leica, VT1000) を用い、250 µm 厚の脳スライスを作製し、12 mm セルカルチャーインサート (Merck, PICM01250) 上で、脳スライス培地 (0.6 mM L-Glutamine、5% ウマ血清、200 units/mL penicillin・200 mg/mL of streptomycin、1 mM D-luciferin を DMEM/F-12 (GIBCO, 11039) に添加した培地) を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養し、発光イメージングを実施した。最初の光照射は、培養開始 24 時間後に開始した。

### 2-14. *In ovo* エレクトロポレーションを用いた遺伝子導入

実験動物のプロトコルは、京都大学動物実験委員会で認可されたものを用いた (承認番号 Lif-K22021)。ニワトリ胚における eGAV の転写活性の光応答性を評価するために、日本レイヤー株式会社から購入した、ニワトリ (ボリス・ブラウン) の有精卵を購入した。有精卵は、Hamburger and Hamilton stage (HH) 18 または 19 (Hamburger and Hamilton, 1951) に達するまで、37°C で 3 日間、自動孵卵器で培養した。*In ovo* エレクトロポレーションは、既報のプロトコル (Baeriswyl et al., 2008) を参照し、卵殻に窓を作製し、CAG-eGAV (0.5 µg/µl)、5x UAS-Achilles-NLS-PEST-Hes1 3' UTR レポーター (1.0 µg/µl)、CAG-mRuby3 (0.5 µg/µl)、0.01% Fast Green を含む生理食塩水を、ガラスキャピラリーを用いてニワトリ胚の脊髄中心管内に、混合溶液が満ちるまで注入した。プラスミド混合溶液を後肢まで注入した後、エレクトロポレーター (ネッパジーン株式会社, NEPA21) を用いて、エレクトロポレーション (電圧 26 V, 50 ミリ秒オン、950 ミリ秒オフで 5 パルス) を行った。その後、卵殻の窓を半透明テープで塞ぎ、37°C の暗所で培養した。光照射をするサンプルは、エレクトロポレーションから 24 時間後に、465 nm LED (日亜化学工業株式会



社, NCSB119) を配列した LED アレイ (エビス電子株式会社) を用い、24 時間 (30 秒オン、180 秒オフのサイクル)、光照射した。エレクトロポレーションから 48 時間後に、マクロズーム顕微鏡 (株式会社エビデント, MVX10) を用い、ニワトリ胚から蛍光画像を取得した。次に、剃刀でニワトリ胚の切片を作製し、共焦点顕微鏡 (Zeiss, LSM880) を用いて、脊髄における蛍光画像を取得した。

## 2-15. フローサイトメーターを用いた蛍光シグナルの測定

eGAV による蛍光レポーターのシグナルを経時的に評価するために、eGAV 発現レンチウイルスベクターと 5x UAS-Achilles-NLS-PEST-Hes1 3' UTR のレンチウイルスベクターを用いて、形質導入した HEK293T 細胞に青色光照射 ( $7.10 \text{ W m}^{-2}$ ) を 3 時間周期で 2 分間照射し、最初の光照射時点とその後 30 分間隔で 12 時間、サンプリングした。サンプリングは、細胞をトリプシン処理で回収し、3.2% PFA/PBS を用い、室温で 15 分間、固定した。その後、フローサイトメーター (ソニー株式会社, Cell Sorter MA900) を用いて、Achilles の蛍光シグナルを測定した。測定は、488 nm レーザーを励起光として用い、525/50 nm のバンドパスフィルターを通して Achilles のシグナルを取得した。また、前方散乱光シグナル (Forward scatter, FSC) と側方散乱光シグナル (Side scatter, SSC) のパラメータに基づき、各サンプルにつき 1 万個の細胞を測定した。5x UAS-Achilles-NLS-PEST-Hes1 3' UTR のレンチウイルスベクターを導入していない HEK293T 細胞を用いて、バックグラウンドシグナルを測定し、各サンプルデータからバックグラウンドの値を減算することで、Achilles の蛍光シグナル強度を算出した。

## 2-16. 免疫組織染色と画像取得

灌流固定後に摘出したマウスの脳組織は  $4^{\circ}\text{C}$  で 24 時間、4% PFA/PBS に浸して固定した。PBS で洗浄後、 $4^{\circ}\text{C}$  で 48 時間、30% Sucrose/PBS に浸して脱水した。脱水した脳は、Tissue-Tek O.C.T. compound (サクラファインテックジャパン, 45833) を用いて、凍結包埋した。その後、クライオスタット (Leica, CM1950) を用い、 $50 \mu\text{m}$  厚で切片を作製し、免疫蛍光染色を行った。脳切片を PBS で洗浄後、5% 正常ロバ血清 (NDS)/0.3% Triton X-100/PBS を用い、室温で 1 時間ブロッキングした。次に、1% NDS/0.3% Triton X-100/PBS で希釈した 1 次抗体 (Invitrogen, 抗 Green fluorescent protein (GFP) ウサギポリクローナル抗体, A11122) を用い、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩、脳切片を反応させた。PBS で 3 回洗浄後、1% NDS/0.3% Triton X-

100/PBS で希釈した 2 次抗体 (Invitrogen, Alexa Fluor® 488) を用い、室温で 2 時間、脳切片を反応させた。その後、脳切片を Permafluor (Richaerd-Allan Scientific Co. Powered by Eprexia, TA-030-FM) を用いてスライドガラスに封入し、染色した切片を共焦点顕微鏡 (Zeiss, Oberkochen, DE, LSM880) を用い、蛍光画像を取得した。

## 2-17. 発光イメージングデータの解析

画像解析は、ImageJ (アメリカ国立衛生研究所 NIH) と、既報のカスタムプラグイン (Imayoshi et al., 2013; Isomura et al., 2017; Yamada et al., 2018; 2020b) を使用して実施した。発光イメージングで取得した画像データは、宇宙線に起因するノイズ信号を除去するために、Spike-noise filter で処理した。CCD カメラの読み出しノイズは、Temporal background reduction filter で処理して除去した。また、各時点の撮像領域の外側で測定されたバックグラウンドの値を測定値から減算した。経時的な定量においては、EpH4 細胞に発現させた mCherry-NLS の蛍光シグナルを細胞追跡マーカーとして扱い、細胞核内の発光シグナルを定量した。

## 2-18. 遺伝子発現の光誘導能の時間的特性の定量

遺伝子発現の光誘導の switch-on/off-kinetics の半減期は、既報 (Yamada et al., 2018; 2020b) のプロトコルを参照し、以下のように決定した。光刺激に依存しない遺伝子発現誘導の直線的な傾向を除去するために、波形の絶対偏差の中央値より小さい測定値に対して線形回帰を行い、波形の全点から回帰より予測される値を減算することで、各波形を Detrend 処理した。また、高周波成分を除去するためにローパスフィルター (order = 4, cut-off frequency = 0.2) を適用し、処理後の波形を z スコアに変換した。次に、ガウス分布 ( $\mu = 0$ ,  $\sigma = \sigma_{\text{waveform}}$ ) から波形ベクトルと同じ長さの乱数 (確率的閾値) を生成した。波形の各時点の値は、確率的閾値の対応する時点の値と比較された。この処理を 100 回繰り返し、閾値を超えた回数が 50 回以上となる最初の時点を経験した遺伝子発現の始点とした。 $\tau_{\text{on}}$  は、光誘導性の遺伝子発現の開始からレポーター活性のピークまでの時間から算出された。観測された波形と確率的閾値の全時点における差を算出し、その分布をガウス分布でフィッティングした。終点に関しては、フィットしたガウス分布の左端 2.5% に含まれ (i.e. 観測された波形と確率的閾値との差が小さい時点)、かつ、光誘導性の遺伝子発現期間の頂点に最も近い時点と定義した。 $\tau_{\text{off}}$  の値は、光誘導性の遺伝子発現期間の頂点から終点までの時間から算出された。なお、閾値を定数にした時に、観測された波形がその閾値をわずかに超えた値に収束し、終点を特定できないケースがあった。これを回避するために、本手法では閾値を確率分布からサンプリングした。上記の手順をモニター細胞の各時系列データについて 100 回繰り返し、各光作動性転写因子コンストラクトの平均  $\tau_{\text{on}}$  と  $\tau_{\text{off}}$  の平均値を経験した遺伝子発現の switch-on/off-kinetics の半減期を決定するために使用した。この解析のためのプログラムはすべて MATLAB R2021a (MathWorks Inc., MA, USA) で作成した。

## 2-19. 統計解析

統計処理は Prism® 8.0 (GraphPad Software) を使用した。2 群間の比較には、Student's *t*-test を行った。多群の比較には、one-way ANOVA 後に Tukey-Kramer's *post hoc* test を行った。P < 0.05 のものを統計的に有意であるとした。

## 第三章

### 結果

## 哺乳類細胞における青色光作動性 Gal4 転写因子の機能向上

### 3-1. 機能向上型青色光作動性 Gal4 転写因子 (eGAV) の開発

本研究では、Vivid (VVD) を利用した青色光作動性 Gal4 転写因子の光操作性の向上を目的とし、機能向上型青色光作動性 Gal4 転写因子の開発を行った。これまでの光作動性転写因子の機能向上を目的とした開発研究では、タンパク質ドメインの種類や、それらの配置と構成を検討することで行われてきた (Nihongaki et al., 2017; Yamada et al., 2018; Yamada et al., 2020b)。特に、光受容体に別のタンパク質ドメインを融合させる場合、C 末端あるいは N 末端のどちら側に融合させるかは、遺伝子発現の光誘導レベルや光応答性に強く影響を与える。また、採用するタンパク質ドメインの種類やリンカー配列を最適化することでも、光応答性の向上がなされてきた。これらの知見を基に、機能向上型青色光作動性 Gal4 転写因子の候補コンストラクトに関して、以下のように設計を行った。

まず、Gal4 (アミノ酸残基 1–147) には、DNA 結合ドメインだけでなく、二量体形成ドメインが含まれることが知られているが、VVD の光依存的なホモ二量体形成との干渉を避けるために、二量体形成ドメインを除去した DNA 結合ドメインのみから成る Gal4 (アミノ酸残基 1–65) を採用した。次に、転写活性化ドメインに関しては、人工転写因子として汎用されている、VP16 (residues 413–490 of herpes simplex virus transcription factor VP16)、VP64 (tandem 4-copy repeats of VP16 AD)、p65 (residues 286–550 of human p65)、Rta (Replication and transcription activator of human gammaherpesvirus 4)、HSF1 (Human heat shock transcription factor 1)、VPR (Tripartite activator VP64-p65-Rta)、および、VPRmini (VPR miniature activator) を採用した。光受容体 VVD に関しては、人工転写因子の光スイッチとして利用する場合、N56K および C71V の変異を導入することで、暗所におけるバックグラウンド活性が低くなることが報告されている (Wang et al., 2012) ことから、VVD (N56K, C71V) を採用した。また、GAVPO/hGAVPO には、Flag タグおよび HA タグのエピトープタグが付与されているが、各タンパク質ドメインの機能を妨げる可能性があるため、本研究ではエピトープタグは付与せずに、各タンパク質ドメイン間には、3 つのグリシン-セリン (3x Glycine-serine, 3x GS) から成る柔軟性の高いリンカー配列、もしくは、制限酵素 (Restriction endonucleases, RE) サイトを挿入

した。これらのコンストラクトを、機能向上型光作動性 Gal4 転写因子 eGAV (enhanced Gal4-VVD 転写因子) 候補コンストラクトとした (図 5 および表 1)。

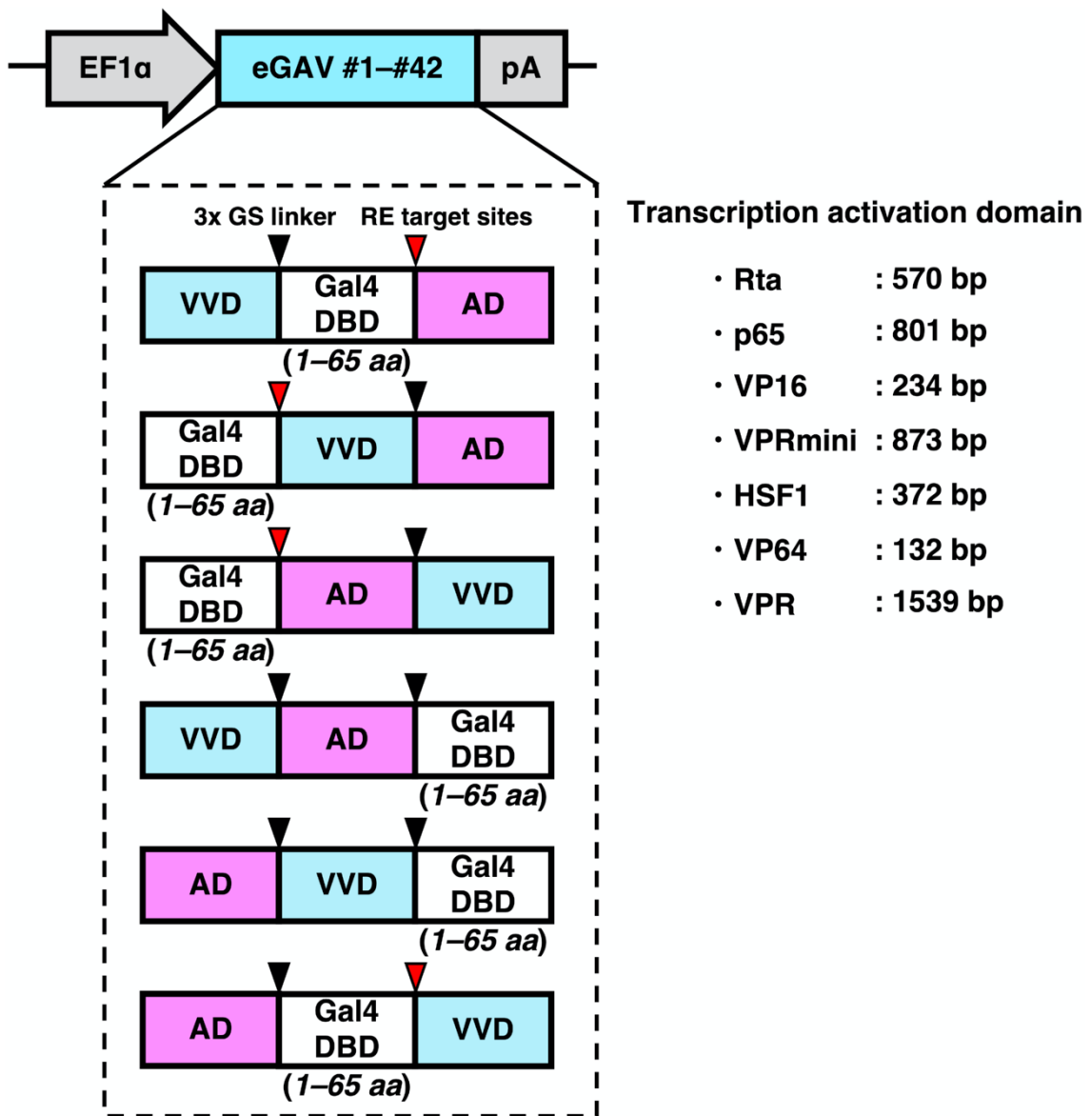


図 5. eGAV 候補コンストラクトの模式図

青色光依存的にホモ二量体を形成する光受容体 Vivid (VVD, 暗所バックグラウンド活性を低下させる N56K, C71V のアミノ酸変異を導入) と、7 種類の各転写活性化ドメイン (AD) と、アミノ酸残基 1-65 の Gal4 DNA 結合ドメイン (Gal4 DBD) を 6 通りの配置で、計 42 個の eGAV 候補コンストラクトを発現ベクタープラスミド (pEF-MCS) にクローニングした。

Construct ID	Domain#1	Linker#1	Domain#2	Linker#2	Domain#3
eGAV#1	VVD	3x GS linker-Xbal	Gal4 DBD	SpeI-MluI	Rta
eGAV#2	Gal4 DBD	SpeI-MluI	VVD	3x GS linker-Xbal	Rta
eGAV#3	Gal4 DBD	SpeI-MluI	Rta	3x GS linker-Xbal	VVD
eGAV#4	VVD	3x GS linker-Xbal	Rta	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD
eGAV#5	Rta	3x GS linker-Xbal	VVD	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD
eGAV#6	Rta	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD	XbaI	VVD
eGAV#7	VVD	3x GS linker-Xbal	Gal4 DBD	SpeI-MluI	p65
eGAV#8	Gal4 DBD	SpeI-MluI	VVD	3x GS linker-Xbal	p65
eGAV#9	Gal4 DBD	SpeI-MluI	p65	3x GS linker-Xbal	VVD
eGAV#10	VVD	3x GS linker-Xbal	p65	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD
eGAV#11	p65	3x GS linker-Xbal	VVD	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD
eGAV (eGAV#12)	p65	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD	XbaI	VVD
eGAV#13	VVD	3x GS linker-Xbal	Gal4 DBD	SpeI-MluI	VP16
eGAV#14	Gal4 DBD	SpeI-MluI	VVD	3x GS linker-Xbal	VP16
eGAV#15	Gal4 DBD	SpeI-MluI	VP16	3x GS linker-Xbal	VVD
eGAV#16	VVD	3x GS linker-Xbal	VP16	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD
eGAV#17	VP16	3x GS linker-Xbal	VVD	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD
eGAV#18	VP16	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD	XbaI	VVD
eGAV#19	VVD	3x GS linker-Xbal	Gal4 DBD	SpeI-MluI	VPRmini
eGAV#20	Gal4 DBD	SpeI-MluI	VVD	3x GS linker-Xbal	VPRmini
eGAV#21	Gal4 DBD	SpeI-MluI	VPRmini	3x GS linker-Xbal	VVD
eGAV#22	VVD	3x GS linker-Xbal	VPRmini	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD
eGAV#23	VPRmini	3x GS linker-Xbal	VVD	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD
eGAV#24	VPRmini	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD	XbaI	VVD
eGAV#25	VVD	3x GS linker-Xbal	Gal4 DBD	SpeI-MluI	HSF1
eGAV#26	Gal4 DBD	SpeI-MluI	VVD	3x GS linker-Xbal	HSF1
eGAV#27	Gal4 DBD	SpeI-MluI	HSF1	3x GS linker-Xbal	VVD
eGAV#28	VVD	3x GS linker-Xbal	HSF1	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD
eGAV#29	HSF1	3x GS linker-Xbal	VVD	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD
eGAV#30	HSF1	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD	XbaI	VVD
eGAV#31	VVD	3x GS linker-Xbal	Gal4 DBD	SpeI-MluI	VP64o
eGAV#32	Gal4 DBD	SpeI-MluI	VVD	3x GS linker-Xbal	VP64o
eGAV#33	Gal4 DBD	SpeI-MluI	VP64o	3x GS linker-Xbal	VVD
eGAV#34	VVD	3x GS linker-Xbal	VP64o	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD
eGAV#35	VP64	3x GS linker-Xbal	VVD	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD
eGAV#36	VP64o	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD	XbaI	VVD
eGAV#37	VVD-GS	XbaI	Gal4 DBD	SpeI-MluI	VPR
eGAV#38	Gal4 DBD	SpeI-MluI	VVD	3x GS linker-Xbal	VPR
eGAV#39	Gal4 DBD	SpeI-MluI	VPR	3x GS linker-Xbal	VVD
eGAV#40	VVD	3x GS linker-Xbal	VPR	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD
eGAV#41	VPR	3x GS linker-Xbal	VVD	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD
eGAV#42	VPR	3x GS linker-SpeI-MluI	Gal4 DBD	XbaI	VVD

表 1. eGAV 候補コンストラクトの一覧

各 eGAV 候補コンストラクトにおける、タンパク質ドメインの配置、リンカー配列、転写活性化ドメインの種類を示した。



光作動性 Gal4 転写因子による遺伝子発現の光誘導能を評価するために、Human Embryonic Kidney (HEK) 293T 細胞を用いて、Luciferase assay (luc assay) を行った。luc assay で用いる発光レポーターは、脱ユビキチン化酵素によって切断されず、プロテアソームによって分解されるユビキチン (Ubiquitin, Ub) 変異体 Ub (G76V) を Luciferase (Luc2) の N 末端に融合した不安定化核内局在性ルシフェラーゼ (Ub-NLS-Luc2) を利用した。更に、mRNA の半減期を短くするために、Ub-NLS-Luc2 の下流に Hes1 3' UTR (マウス *Hes1* 遺伝子の 3' 非翻訳領域) を配置した (図 6A)。このように、レポータータンパク質と mRNA の半減期を短くした不安定化発光レポーター (Ub-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR) を用いることで、細胞内におけるレポータータンパク質の蓄積を防ぎ、eGAV 候補コンストラクトの転写活性を高い精度で評価した (図 6B) (Luker et al., 2003; Voon et al., 2005; Masamizu et al., 2006)。

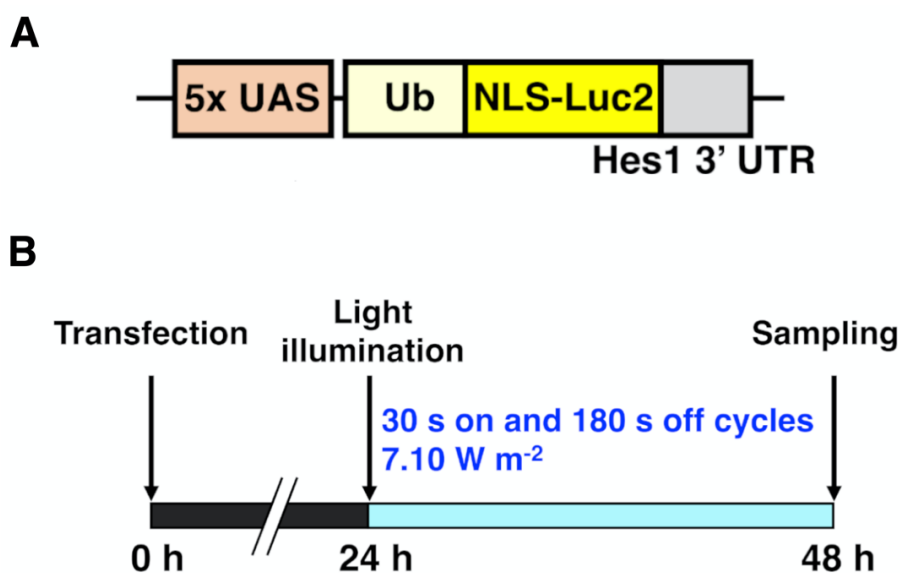
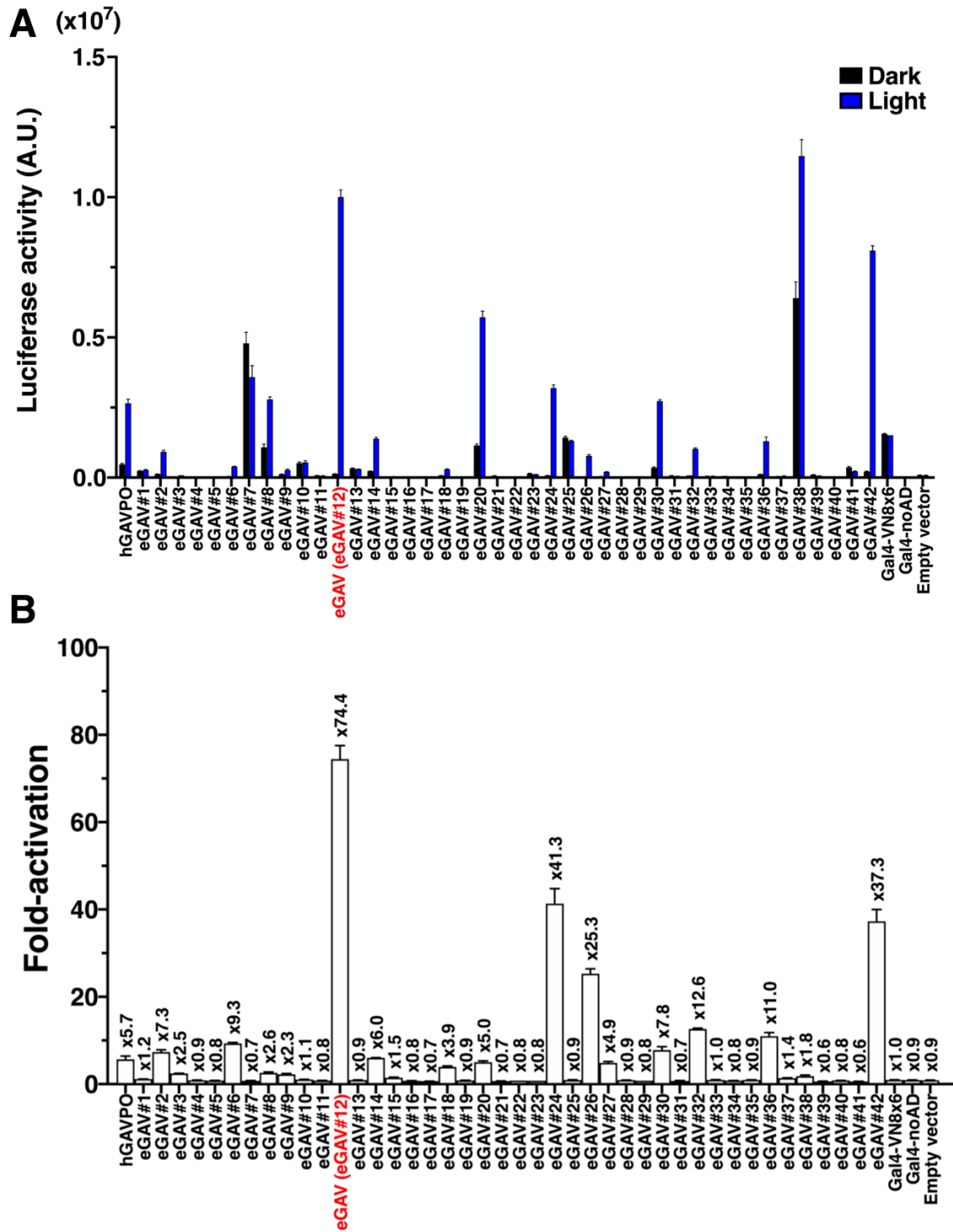


図 6. 不安定化発光レポーターの模式図と luc assay のタイムコース

- (A) 5x UAS の下流に、タンパク質の半減期が短い Ub-NLS-Luc2 (不安定化核内局在性ルシフェラーゼ) と、mRNA を不安定化させる Hes1 3' UTR (マウス *Hes1* 遺伝子の 3' 非翻訳領域) を配置した。
- (B) HEK293T (Human Embryonic Kidney) 細胞に、eGAV 候補コンストラクトとレポーターコンストラクトを一過性トランスフェクションした。光照射するサンプルは、トランスフェクションしてから 24 時間後に、青色光照射を開始した。トランスフェクションから 48 時間後にサンプルを回収し、luc assay によって、各 eGAV 候補コンストラクトにおけるレポーター活性を測定した。

HEK293T 細胞を用いた、luc assay による評価結果を、**図 7** および**表 2** に示した。暗所 (Dark) と光照射 (Light) サンプルそれぞれに対して、ルシフェラーゼ活性を測定し (**図 7A**)、さらに、光照射サンプルと非光照射サンプルのルシフェラーゼ活性の比率を算出した (**図 7B**)。

その結果、eGAV#12 に関しては、光照射下における転写活性が高く、暗所におけるバックグラウンド活性が低いので、光照射下と暗所における転写活性の変化倍率が 74.4 倍であり最も高かった。その他の候補コンストラクトで変化倍率が高かったものは、eGAV#24 の 41.3 倍、eGAV#42 の 37.3 倍であった。変化倍率は高くないが、光照射下におけるレポーター活性の高いものは、eGAV#20、eGAV#38 であった。また、hGAVPO と同程度のレポーター活性と変化倍率を示したのは、eGAV#30 であった。これらの結果を踏まえ、更に評価するものとして、eGAV#12、eGAV#20、eGAV#24、eGAV#30、eGAV#38、eGAV#42 を選択し、これらのコンストラクトの模式図と luc assay における結果を、**図 8** にまとめた。



## 図 7. luc assay による eGAV 候補コンストラクトにおける遺伝子発現の光誘導

- (A) HEK293T 細胞に、eGAV 候補コンストラクトと 5x UAS-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR レポーターを一過性トランスフェクションし、暗所もしくは光照射下におけるレポーター活性を評価した。光感受性のない Gal4 転写因子としては Gal4-VN8x6 (Salghetti et al., 2000) を、転写活性化ドメインを含まない Gal4 (アミノ酸残基 1-65) としては Gal4-noAD を、インサート DNA がない空ベクターとして Empty vector をコントロールとして用いた。
- (B) 光照射下と暗所におけるレポーター活性の変化倍率を示した。値は 1 回の実験からの平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n = 3$ ) を示している。同じ実験を 3 回繰り返し、同様の結果が得られた。

Construct ID	Light/Dark ratio		Dark		Light		Unpaired t-test p value
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
hGAVPO	5.7	0.8	470000	35679	2650000	147309	<0.0001
eGAV#1	1.2	0.0	236667	18037	272667	15948	0.0607
eGAV#2	7.3	0.5	126333	3786	923667	50362	<0.0001
eGAV#3	2.5	0.0	35133	493	86433	666	<0.0001
eGAV#4	0.9	0.0	32933	1474	29333	723	0.0192
eGAV#5	0.8	0.0	23233	635	19133	321	0.0006
eGAV#6	9.3	0.2	42467	1415	395667	6028	<0.0001
eGAV#7	0.7	0.1	4786667	398790	3583333	411015	0.0220
eGAV#8	2.6	0.2	1080667	114548	2790000	90000	<0.0001
eGAV#9	2.3	0.2	121333	8386	273333	28746	0.0009
eGAV#10	1.1	0.0	517000	40447	545667	56048	0.5123
eGAV#11	0.8	0.0	79967	2558	66567	3907	0.0077
eGAV (eGAV#12)	74.4	3.1	134667	9074	10006667	254231	<0.0001
eGAV#13	0.9	0.0	332667	9713	305333	5033	0.0124
eGAV#14	6.0	0.0	230333	6807	1386667	46188	<0.0001
eGAV#15	1.5	0.1	25000	600	36633	1914	0.0006
eGAV#16	0.8	0.0	21733	1301	16333	451	0.0025
eGAV#17	0.7	0.0	30833	1102	20333	1419	0.0005
eGAV#18	3.9	0.2	73800	2685	291333	25423	0.0001
eGAV#19	0.9	0.0	13067	808	11200	1058	0.0721
eGAV#20	5.0	0.3	1146667	51316	5720000	216564	<0.0001
eGAV#21	0.7	0.0	67033	1332	45167	1102	<0.0001
eGAV#22	0.8	0.0	8210	113	6667	178	0.0002
eGAV#23	0.8	0.0	148667	4163	116333	2082	0.0003
eGAV#24	41.3	3.4	77533	4020	3196667	106927	<0.0001
eGAV#25	0.9	0.0	1420000	52915	1306667	28868	0.0312
eGAV#26	25.3	1.1	30533	611	772667	48418	<0.0001
eGAV#27	4.9	0.3	42700	3124	206667	3215	<0.0001
eGAV#28	0.9	0.0	11267	503	10210	543	0.0689
eGAV#29	0.8	0.0	38767	1290	30067	1266	0.0011
eGAV#30	7.8	0.8	352333	30436	2730000	51962	<0.0001
eGAV#31	0.7	0.1	71700	5057	51600	2972	0.0040
eGAV#32	12.6	0.2	80833	2178	1022333	36556	<0.0001
eGAV#33	1.0	0.1	52133	1002	50567	2098	0.3080
eGAV#34	0.8	0.0	60500	1136	48600	1044	0.0002
eGAV#35	0.9	0.0	31500	1114	29533	208	0.0397
eGAV#36	11.0	0.8	118000	5196	1296667	153080	0.0002
eGAV#37	1.4	0.1	41433	2346	57000	5839	0.0128
eGAV#38	1.8	0.2	6400000	575587	11466667	585947	0.0004
eGAV#39	0.6	0.1	100967	5348	59900	4480	0.0005
eGAV#40	0.8	0.0	23267	757	19567	839	0.0048
eGAV#41	0.6	0.0	364000	28213	220333	18009	0.0017
eGAV#42	37.3	2.7	217667	13650	8093333	171561	<0.0001
Gal4-VN8x6	1.0	0.0	1560000	17321	1510000	0	0.0075
Gal4-noAD	0.9	0.0	23100	361	21333	208	0.0018
Empty vector	0.9	0.0	90667	2250	80100	5742	0.0412

表 2. luc assay による eGAV 候補コンストラクトの遺伝子発現の光誘導能の評価

統計解析には、各コンストラクトにおける暗所と光照射下のレポーター活性を比較するために、two-tailed Student's t test を用いた。値は 1 回の実験からの平均値 ± 標準偏差 ( $n = 3$ ) を示している。同じ実験を 3 回繰り返して、同様の結果が得られた。

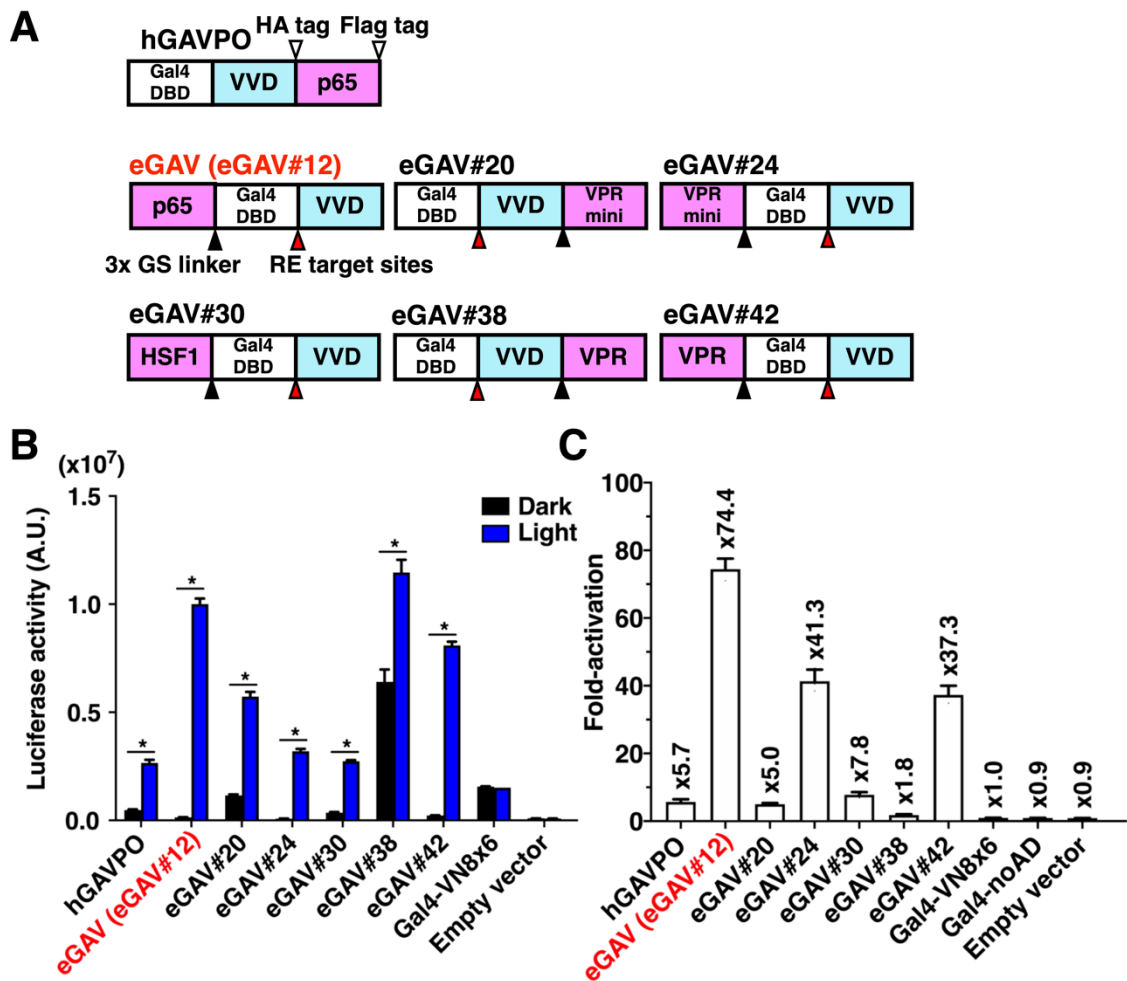


図 8. HEK293T 細胞を用いた luc assay によって選抜した eGAV 候補コンストラクトの評価結果

- (A) hGAVPO と eGAV 候補コンストラクトの模式図。
- (B) 光照射下と暗所におけるレポーター活性を示した。統計解析には、各光作動性 Gal4 転写因子のコンストラクトにおける暗所と光照射下のレポーター活性を比較するために、two-tailed Student's t test を用いた (\* $p < 0.05$ )。
- (C) 光照射下と暗所におけるレポーター活性の変化倍率を示した。値は 1 回の実験からの平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n = 3$ ) を示している。同じ実験を 3 回繰り返し、同様の結果が得られた。

次に、これら 6 つのコンストラクトの光依存的な転写活性を、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞で評価した (図 9)。NIH3T3 細胞は HEK293T 細胞に比べて、一過性トランスフェクションの効率が低いため、暗所と光照射下におけるレポーター活性の変化倍率が低い傾向にあった。しかし、eGAV#12 は HEK293T 細胞での結果と同様に、暗所でのバックグラウンド活性が低い、かつ、光照射下における転写活性が高く、暗所と光照射下において高い変化倍率を示した。

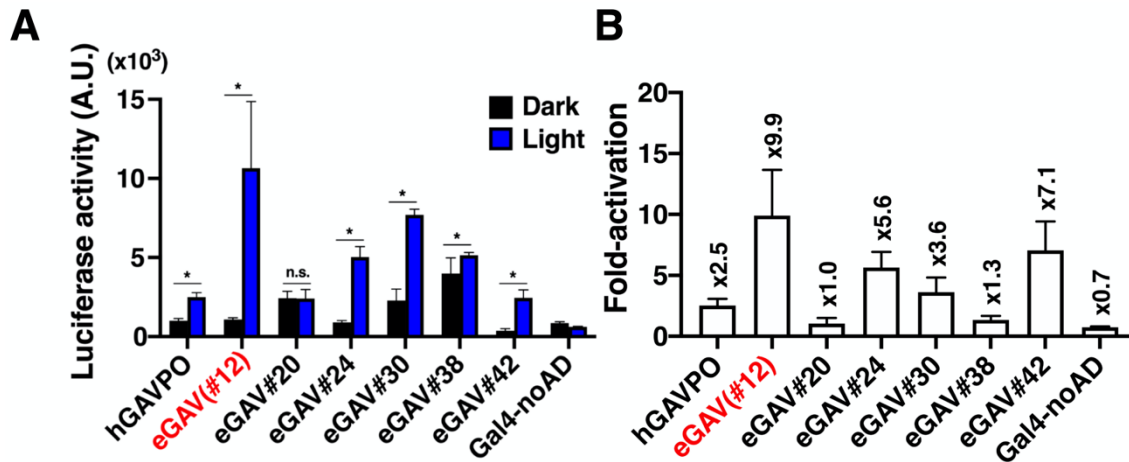


図 9. 選抜した eGAV 候補コンストラクトをマウス NIH3T3 細胞を用いて luc assay によって評価した結果

- (A) 選抜した 6 つの eGAV 候補コンストラクトを、マウス NIH3T3 細胞に一過性トランスフェクションし、luc assay を実施した。統計解析には、hGAVPO または各 eGAV 候補コンストラクトの暗所および光照射下におけるレポーター活性を比較するために、two-tailed Student's t test を用いた ( $*p < 0.05$ )。
- (B) レポーター活性の暗所と光照射下における変化倍率を示した。値は 1 回の実験からの平均値 ± 標準偏差 ( $n = 3$ ) を示している。同じ実験を 3 回繰り返し、同様の結果が得られた。



### 3-2. eGAV 候補コンストラクトの遺伝子発現の光誘導能の時間特性の評価

次に、単発の光照射に対する遺伝子発現の光誘導能を評価するために、結果 3-1 において選抜した eGAV 候補コンストラクトと 5x UAS-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR レポーターを、HEK293T 細胞に一過性トランスフェクションして、レポーター活性の変化を経時的に測定した (図 10A)。その結果、選抜したすべての eGAV 候補コンストラクトは、hGAVPO より有意に速い遺伝子発現の switch-on-kinetics を示した (図 10B)。一方で、switch-off-kinetics に関しては、各コンストラクト間で有意な差はなかった。また、光照射直前と光照射後のピーク値の変化倍率に関しては、eGAV#12 が最も高かった (図 10B, Peak amplitude)。eGAV#12 では、光照射後およそ 1.5 時間後にレポーター活性のピークが観察され、4-5 時間後にバックグラウンド活性のレベルに戻っていた (図 10A)。これらの結果から、eGAV#12 は、振動発現のような複雑な遺伝子発現ダイナミクスを人為的に誘導するのに適していると考え、3 時間の周期で青色光を照射した条件下での遺伝子発現の誘導能を評価した。

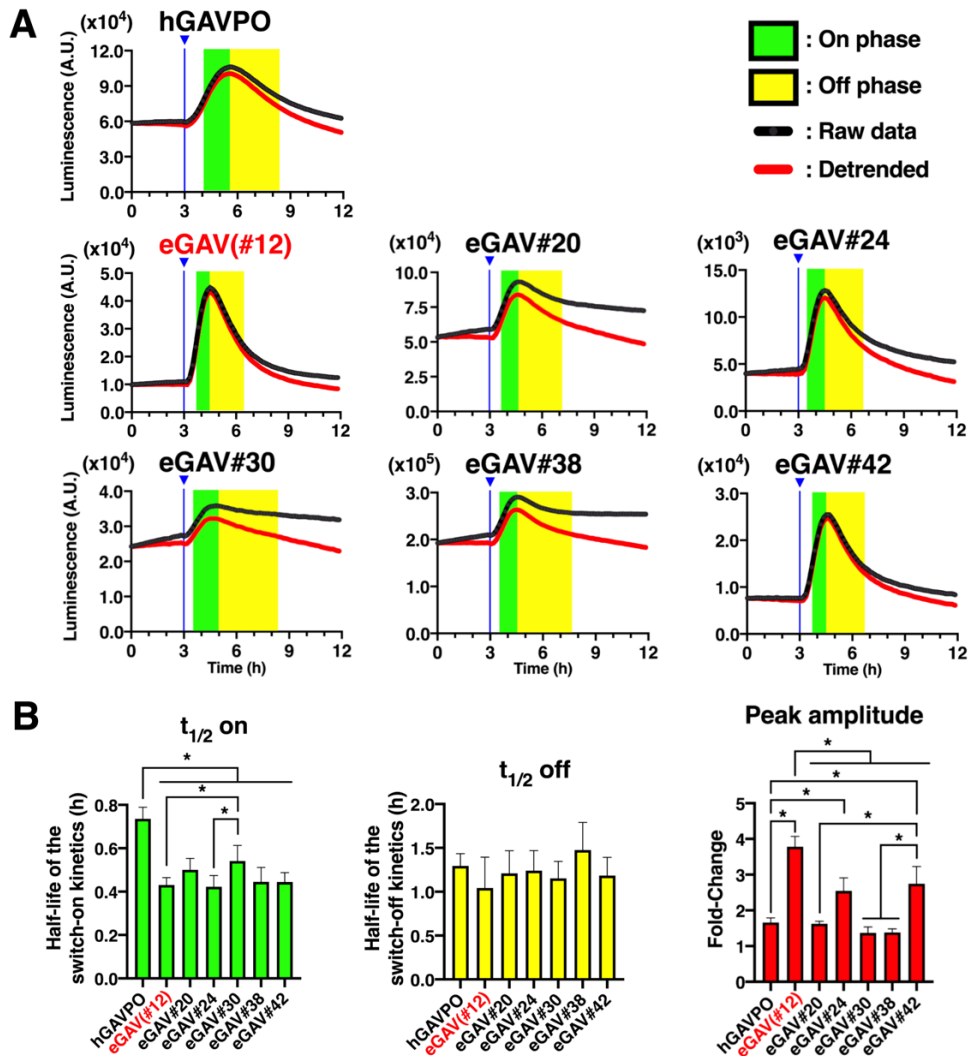


図 10. 単発の光照射に対する eGAV 候補コンストラクトの遺伝子発現の光誘導能の時間的な評価

- (A) eGAV 候補コンストラクトと 5x UAS-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR レポーターを一過性トランスフェクションした HEK293T 細胞に、青色光を 2 分間照射し、発光シグナルの経時的な変化を測定した。青色光照射のタイミングは、縦の青線で示した。1 サンプルの測定結果を示しており、グラフ中の黒線は生データを、赤線は Detrend 処理したデータを示している。光誘導された遺伝子発現の On phase と Off phase は、それぞれ緑色と黄色でハイライトした。同じ実験を 3 回繰り返して、同様の結果が得られた ( $n = 6$ )。
- (B) 単発の光照射に対する eGAV 候補コンストラクトの遺伝子発現の switch-on/off kinetics の半減期を定量した結果。振幅の解析には、光照射直前の値と光照射後の最大値を用いて、変化倍率を求めた。値は平均値  $\pm$  標準偏差を示す ( $n = 6$ )。統計解析には、多群を比較するために、one-way ANOVA 後に Tukey-Kramer's *post hoc* test を行った ( $*p < 0.05$ )。

3 時間の周期で青色光を照射した結果、hGAVPO では明確な振動発現パターンは誘導されず、特に 2 回目以降の光照射に対する遺伝子発現誘導の光応答性が低かった(図 11)。一方で、eGAV#12 と #42 では、各光照射によって明確な振動発現パターンが誘導された。また、遺伝子発現の switch-on が比較的遅い eGAV#30、あるいは光照射下におけるレポーター活性が低い eGAV#24、あるいはバックグラウンド活性が高い eGAV#20 と eGAV#38 では、レポーター発現の段階的な上昇が確認された。これらの結果と、eGAV#12 (1,506 bp) は、hGAVPO (1,527 bp) と eGAV#42 (2,244 bp) よりも遺伝子サイズが小さく、暗所と光照射下で高い変化倍率を持つことから、遺伝子発現の光操作ツールとしての性質が最も優れていると考えた。よって、以降の実験では eGAV#12 を eGAV として採用した。

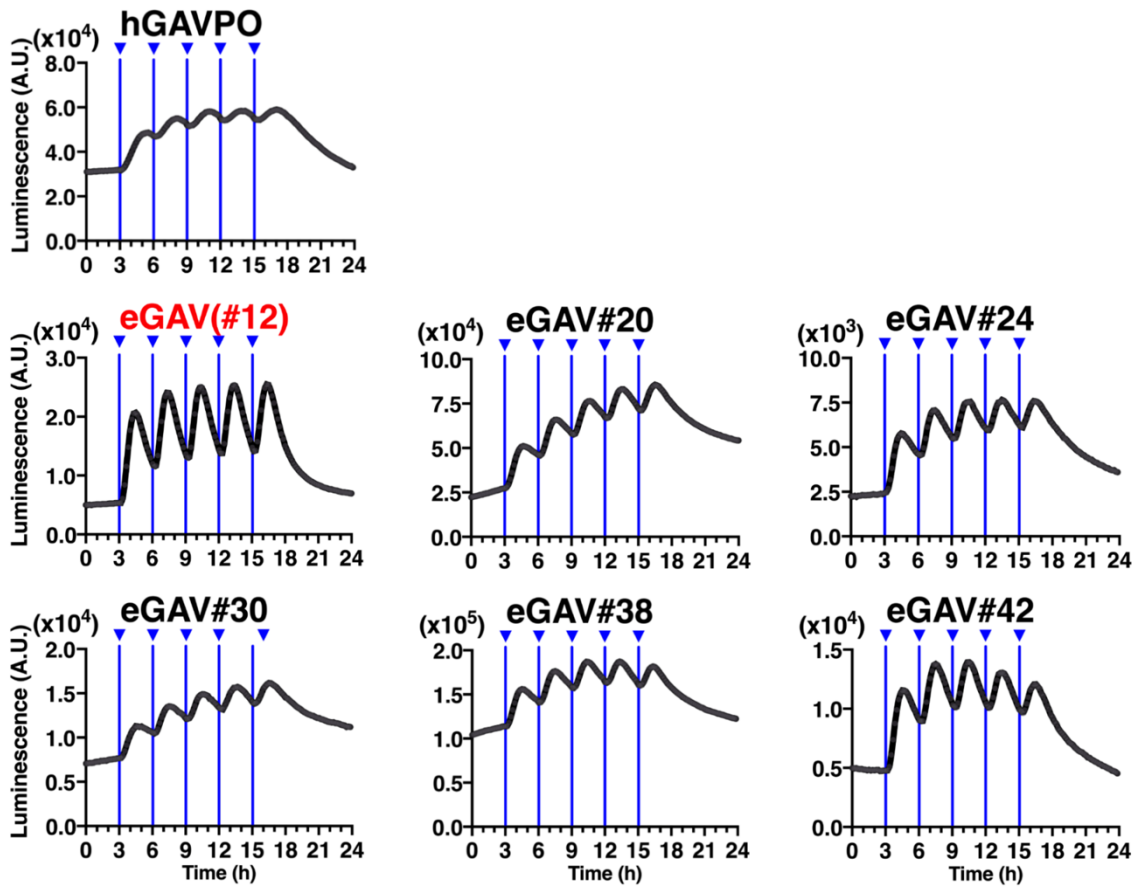


図 11. 3 時間周期の光照射に対する eGAV 候補コンストラクトの光応答性転写活性の時間的な評価

eGAV 候補コンストラクトと 5x UAS-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR レポーターを一過性トランスフェクションした HEK293T 細胞に、3 時間間隔で青色光 (2 分間) を照射し、発光シグナルの経時的な変化を測定した。青色光照射のタイミングは、縦の青線で示した。グラフは 1 サンプルの測定結果を示している。同じ実験を 3 回繰り返して、同様の結果が得られた ( $n = 6$ )。

### 3-3. eGAV の光スイッチを eMag に置き換えても光作動性転写因子としての性能は向上しない

VVD は青色光に応答してホモ二量体を形成する。近年、VVD に変異導入を行うことで、青色光依存的にヘテロ二量体を形成する Magnet システムが報告され、様々な光遺伝学ツールに利用されている (Kawano et al., 2015; Benedetti et al., 2020; di Pietro et al., 2021)。更に、Magnet は二量体形成効率の向上や、光照射後のヘテロ二量体形成速度が非常に速いことが示されている。そこで、eGAV の光スイッチとして VVD の代わりに Magnet を利用した場合、遺伝子発現の光操作性がより向上するのではないかと考え、eGAV の VVD を、Magnet の熱安定性改良型 enhanced Magnets (eMags) (Benedetti et al., 2020) に置き換えた eGAV-eMag コンストラクトを作製した (図 12A)。これらの候補コンストラクトによる遺伝子発現の光誘導能を luc assay で評価した結果、eMags を利用した eGAV-eMag のいずれのペアも、暗所におけるバックグラウンド活性が極めて高く、暗所と光照射下における変化倍率は非常に低かった (図 12B,C)。この結果から、eMag を用いた青色光作動性 Gal4 転写因子の開発は困難と判断し、以降の実験では、eGAV-eMag ではなく、光スイッチとして VVD を利用した eGAV を使用した。

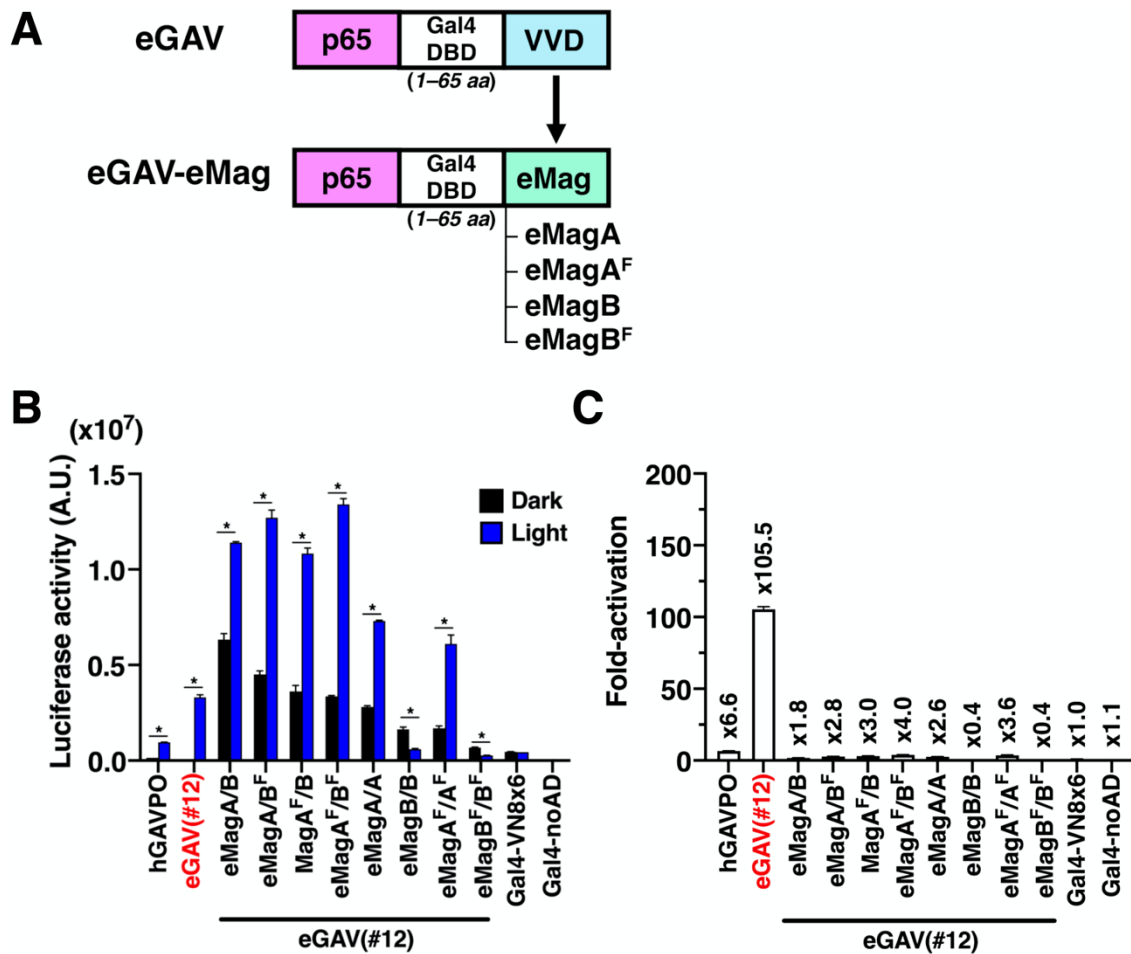


図 12. eGAV-eMag コンストラクトの光応答性転写活性の評価

- (A) eGAV-eMag コンストラクトの模式図。eGAV の光スイッチ VVD を eMags に置き換えた。
- (B) HEK293T 細胞を用いて、各候補コンストラクトを一過性トランスフェクションし、光照射下と暗所におけるレポーター活性を luc assay で評価した。統計解析には、各光作動性 Gal4 転写因子のコンストラクトにおける暗所と光照射下のレポーター活性を比較するために、two-tailed Student's t test を用いた (\* $p < 0.05$ )。
- (C) 光照射下と暗所におけるレポーター活性の変化倍率を示した。値は 1 回の実験からの平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n = 3$ ) を示している。同じ実験を 3 回繰り返し、同様の結果が得られた。

### 3-4. eGAV は光量依存的な転写活性を示す

eGAV による遺伝子発現の光誘導は、光量依存的な特性を持っているかどうかを評価した。eGAV を一過性トランスフェクションした HEK293T 細胞を、 $0.71 \text{ W m}^{-2}$ 、 $1.40 \text{ W m}^{-2}$ 、あるいは、 $7.10 \text{ W m}^{-2}$  の異なる光量で照射後、luc assay によってレポーター活性を測定した (図 13)。その結果、eGAV では光量依存的なレポーター活性の上昇が観察でき、光量を変えることにより、目的遺伝子の発現量を制御可能であることがわかった。一方、hGAVPO に関しては、これまでに報告された結果通り (Yamada, et al., 2020b)、光量依存的なレポーター活性の上昇は観察されなかった。この結果から、eGAV による遺伝子発現の光誘導は、光量を調整することで目的遺伝子の発現量を制御でき、hGAVPO よりも高精度で遺伝子発現の光制御できることが示唆された。

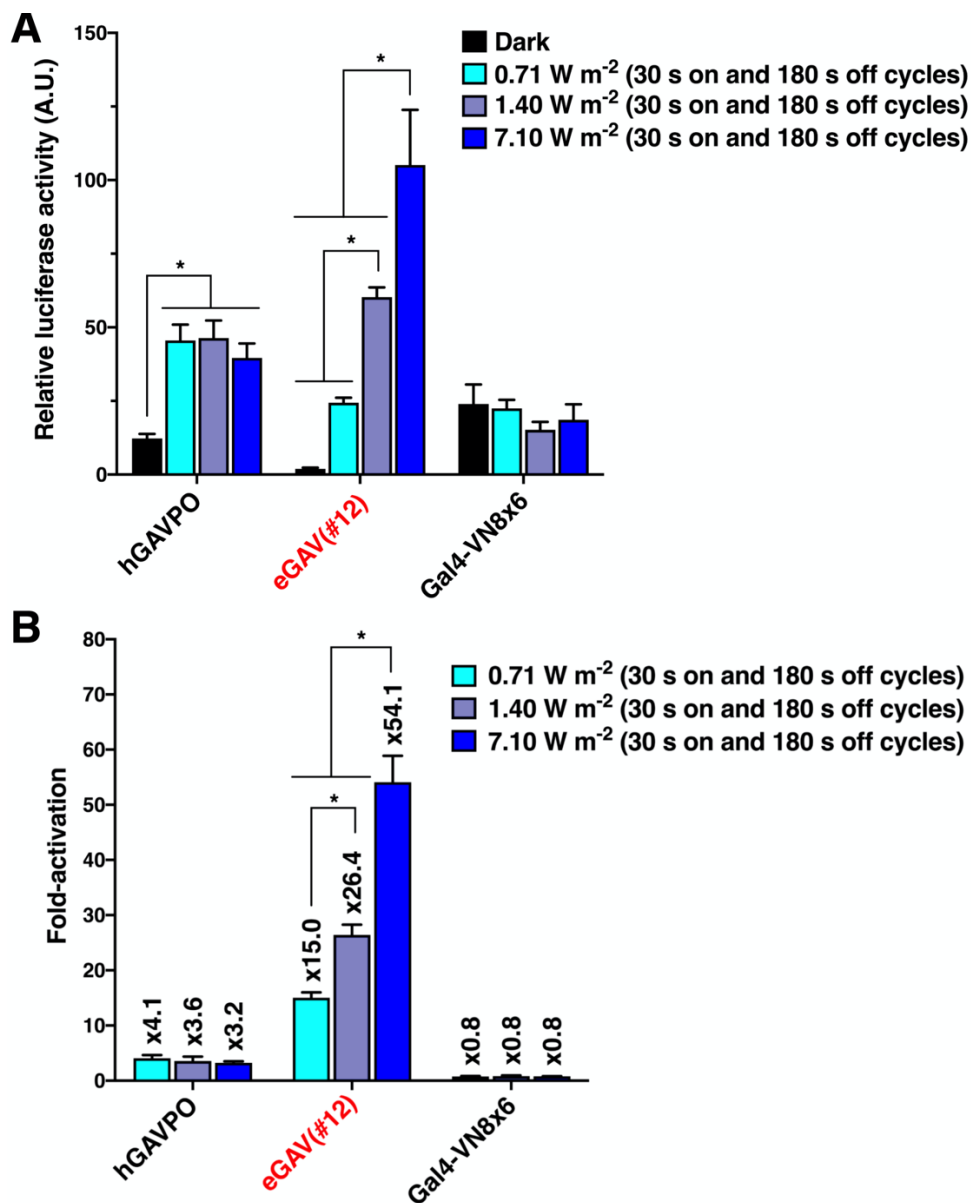


図 13. eGAV による光量依存的な転写活性

- (A) HEK293T 細胞に eGAV コンストラクトと 5x UAS-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR レポーターを一過性トランスフェクションし、luc assay によって光量依存的な eGAV の転写活性を評価した。光量は、0.71 W m<sup>-2</sup>、1.40 W m<sup>-2</sup>、7.10 W m<sup>-2</sup> とし、30 秒オン、180 秒オフのサイクルで 24 時間、光照射した。
- (B) 暗所と光照射下におけるレポーター活性の変化倍率を示した。値は 1 回の実験からの平均値 ± 標準偏差 (n = 3) を示している。同じ実験を 3 回繰り返し、同様の結果が得られた。統計解析には、多群を比較するために、one-way ANOVA 後に Tukey-Kramer's *post hoc* test を行った (\*p < 0.05)。



### 3-5. 目的遺伝子の安定性によって遺伝子発現の光誘導パターンを変化させることができる

遺伝子発現の光操作において、目的遺伝子の mRNA やタンパク質の安定性の違いによって、誘導される遺伝子発現パターンがどのように変化するのか調べた。レポーターコンストラクトとして、5x UAS-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR に加え、タンパク質分解を促進する Ub を Luc2 に付加しない 5x UAS-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR と、mRNA の安定性が高い SV40pA (Simian virus 40 polyA) を用いた 5x UAS-Ub-NLS-Luc2-SV40pA を使用し、3 時間周期での光照射条件下における eGAV による転写活性を経時的に測定した (図 14)。その結果、5x UAS-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR レポーターでは明瞭な振動発現パターンが観察された (図 14A,B)。一方で、レポータータンパク質の安定性が高い 5x UAS-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR レポーターと、mRNA の安定性が高い 5x UAS-Ub-NLS-Luc2-SV40pA では、振動発現パターンは観察されたが、段階的な上昇と持続的な発現パターンを伴っていた (図 14C-F)。また、hGAPVO を発現する細胞では、eGAV を発現する細胞と比較して、いずれのレポーターコンストラクトにおいても、振動発現パターンが不明瞭であり、基底発現が高かった。

これらの結果から、eGAV を利用することで、同じ光照射プロトコルでも、目的遺伝子のタンパク質と mRNA の半減期を変えることによって、振動発現や段階的な上昇パターン、あるいは持続発現といった、異なる遺伝子発現パターンを誘導できることが示された。

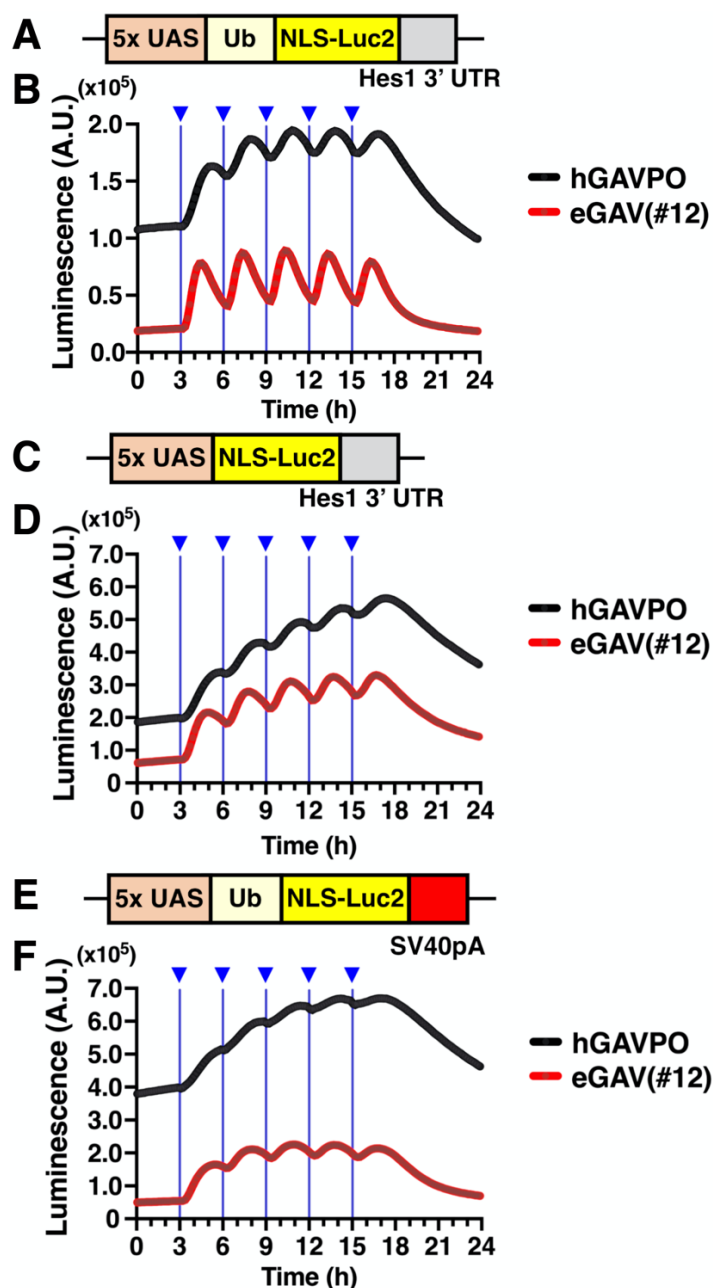


図 14. 異なるレポーターコンストラクトを用いた遺伝子発現の光操作性の評価

(A–F) HEK293T 細胞に eGAV または hGAVPO を一過性トランスフェクションし、3 時間周期で青色光を照射した。レポーターコンストラクトには、5x UAS-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR reporter (A, B)、5x UAS-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR reporter (C, D)、あるいは、5x UAS-Ub-NLS-Luc2-SV40pA reporter (E, F) を使用した。青色光照射のタイミングは、青線で示した。グラフは 1 サンプルの測定結果を示している。同じ実験を 3 回繰り返し、同様の結果が得られた ( $n = 6$ )。

### 3-6. eGAV を安定発現する哺乳類培養細胞における遺伝子発現の光応答性の評価

ここまでの評価は、すべて一過性トランスフェクションによって遺伝子導入を実施した。そこで、本実験ではレンチウイルスベクターを用い、eGAV とレポーターコンストラクトを安定発現させた細胞で、遺伝子発現の光操作が可能かどうかを評価した。CAG-eGAV-IRES2-mCherry-NLS-WPRE と 5x UAS-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3'UTR のレンチウイルスベクターを使用し、安定発現 EpH4 細胞 (Eph4 mouse mammary epithelial cell) を樹立した (図 15A)。光照射後の遺伝子発現パターンを蛍光イメージングした結果、一過性トランスフェクションと同様に、光照射後にレポーター活性の顕著な上昇が観察できた (図 15B, C)。また、PEST 配列を利用した不安定化蛍光レポーター 5x UAS-Achilles-NLS-PEST-Hes1 3' UTR のレンチウイルスベクターを用い、蛍光レポーターで eGAV による遺伝子発現誘導が観察可能な安定発現 HEK293T 細胞を樹立した (図 16A)。3 時間周期で青色光を照射すると、蛍光レポーターの振動発現パターンを観察することができた (図 16B, C)。また、488 nm の Argon laser を用い、特定の領域に存在する細胞に対して限局照射することで、狙った細胞のみに遺伝子発現を誘導することができた (図 17)。以上の結果より、レンチウイルスベクターを用いて eGAV とレポーターコンストラクトを遺伝子導入した安定発現細胞株は、時空間的に遺伝子発現の光操作できることがわかった。

また、Cry2/CIB1 などの VVD 以外の光受容体を利用した光作動性転写因子の場合、その安定発現細胞株の樹立には、複数回のレンチウイルスベクターによる遺伝子導入や、細胞セレクションが必要であることが報告されている (Yamada et al., 2020b)。この理由としては、これらの光作動性転写因子の遺伝子サイズが大きく、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入効率が低いことが挙げられる。一方、本研究では 1 回のレンチウイルスベクターによる遺伝子導入と細胞セレクションで、eGAV 安定発現細胞株を効率良く樹立することができた。これは光受容体として分子サイズが小さい VVD を利用したことで、hGAVPO 同様に、eGAV においても高効率でレンチウイルスベクターによる遺伝子導入ができたと考えられる (Isomura et al., 2017)。

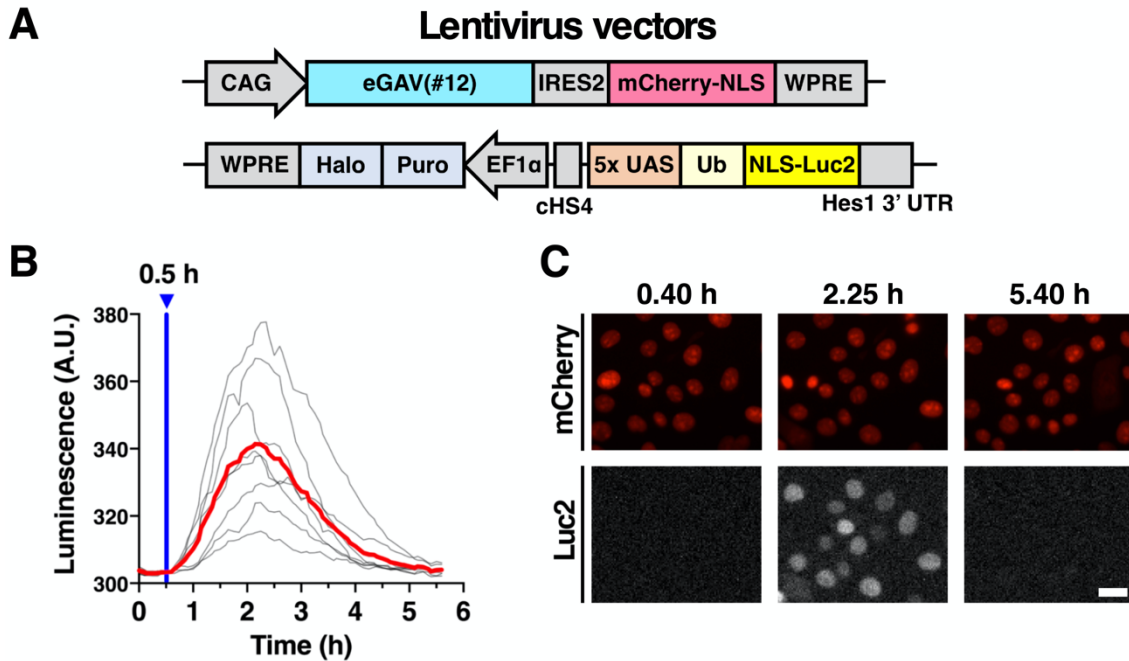


図 15. eGAV と発光レポーターのレンチウイルスベクターを導入したマウス EpH4 細胞の評価

- (A) レンチウイルスベクター CAG-eGAV-IRES2-mCherry-NLS-WPRE と 5x UAS-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR レポーターの模式図。これらを用いて、eGAV 安定発現マウス EpH4 細胞を樹立した。
- (B) 4 分間の青色光照射 (6.0  $\mu$ W) をし、7 個の細胞のそれぞれのレポーター活性の変化を定量した。灰色線は各細胞におけるシグナル値、赤色線は平均値を示す。
- (C) 青色光照射によって変化する発光レポーターのライブイメージング。スケールバーは 50  $\mu$ m を示す。

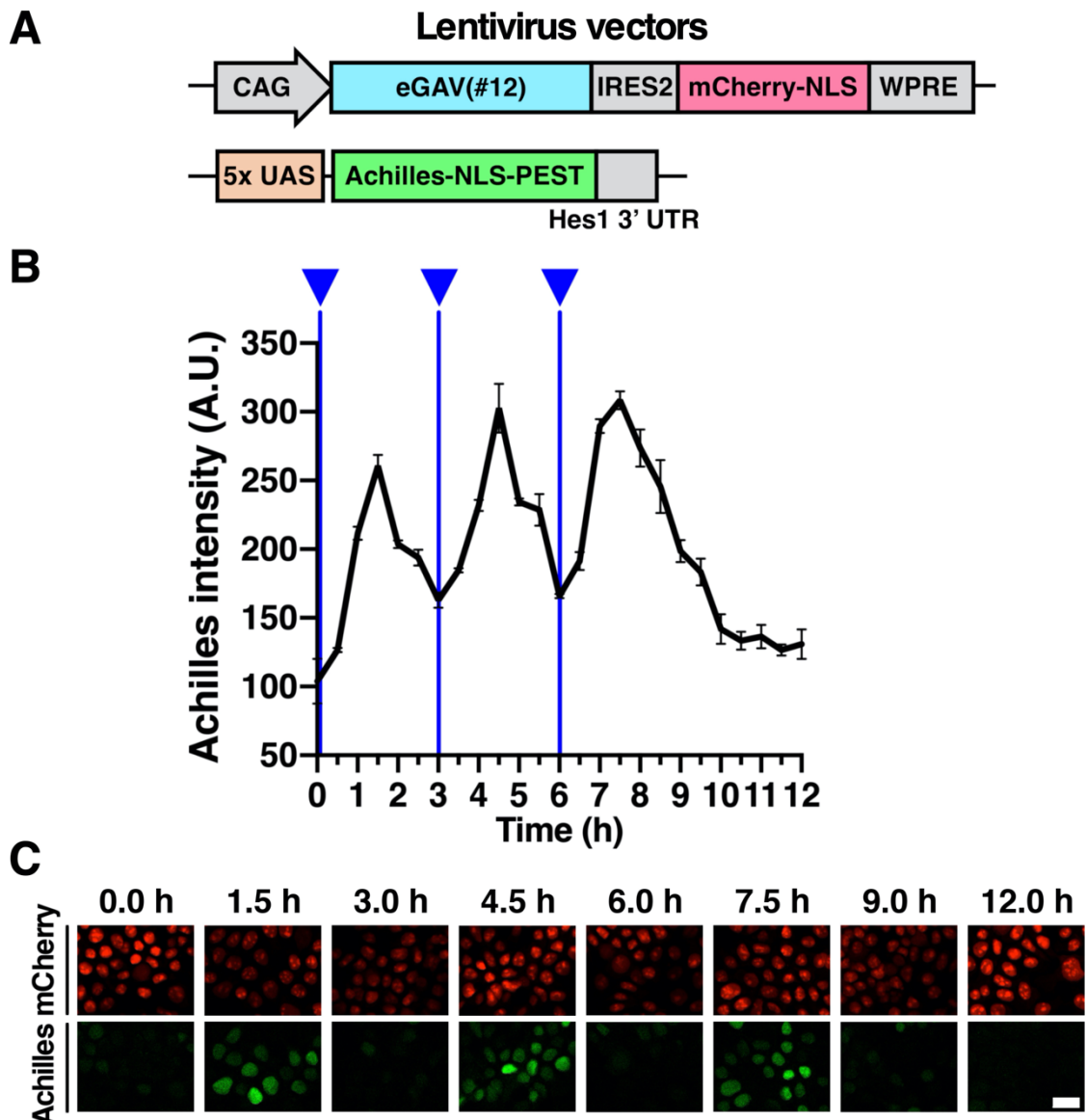


図 16. 蛍光タンパク質レポーターを用いた振動発現パターンの光誘導

(A) レンチウイルスベクター CAG-eGAV-IRES2-mCherry-NLS-WPRE と 5x UAS-Achilles-NLS-PEST-Hes1 3' UTR の模式図。これらを用いて、安定発現 HEK293T 細胞を樹立した。

(B) 蛍光レポーター発現の経時的な変化を調べるために、各時点でサンプルを回収し、フローサイトメーターで Achilles の蛍光シグナルを測定した。光照射のタイミングは、青色の縦線で示した。値は平均値 ± 標準偏差を示す ( $n = 3$ )。

(C) 各時点における HEK293T 細胞の蛍光画像を示した。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を示す。

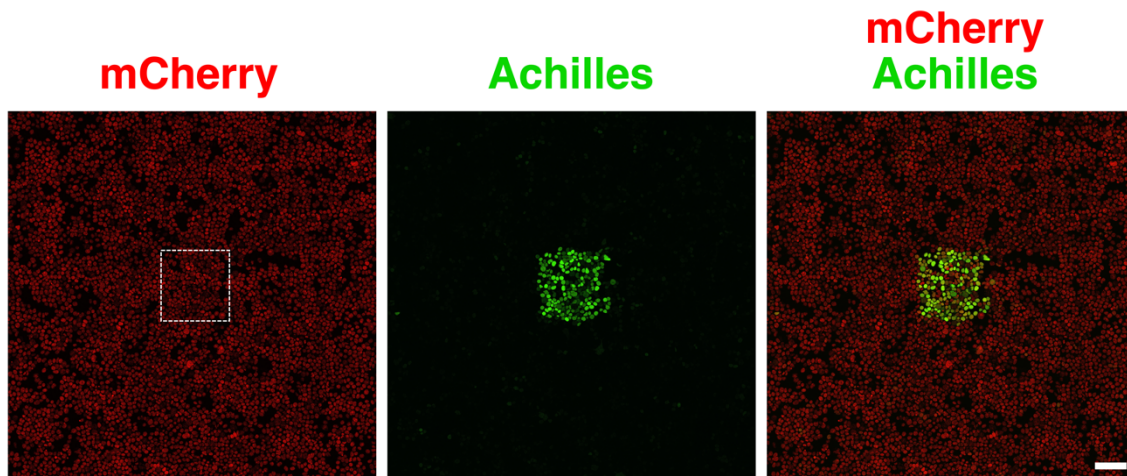


図 17. 限局照射による空間的な遺伝子発現の光操作

CAG-eGAV-IRES2-mCherry-NLS-WPRE と 5x UAS-Achilles-NLS-PEST-Hes1 3' UTR のレンチウイルスベクターによって遺伝子導入した安定発現 HEK293T 細胞を実験に用いた。488 nm の Argon laser (0.8  $\mu$ W) を用いて、212.13  $\mu$ m  $\times$  212.13  $\mu$ m の範囲 (左画像内の白枠) を 3 分間隔で 10 時間光刺激した。その後、光刺激した周囲の領域を含め、蛍光画像を取得した。スケールバーは 100  $\mu$ m を示す。

## 生体組織における eGAV を利用した遺伝子発現の光操作

### 3-7. 発生期マウスの脳スライスにおける遺伝子発現の光操作

動物の生体組織で、eGAV による遺伝子発現の光操作が行えるのか評価した。 *Ex utero* エレクトロポレーションによって eGAV 発現ベクターと 5x UAS-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3' UTR レポーター、トランスフェクションマーカーとして mCherry 発現ベクターを、発生期マウスの脳内の神経幹細胞および神経前駆細胞に遺伝子導入した (図 18A, B)。その後、脳スライス培養を実施し、3 時間周期で青色光照射したところ、神経幹細胞と神経前駆細胞が存在する脳室 (Ventricular zone, VZ) および脳室下帯 (Subventricular zone, SVZ) において、発光レポーターの振動発現パターンを観察することができた (図 18C, D)。この結果から、発生期マウス脳内の神経幹細胞と神経前駆細胞において、振動発現パターンを示す運命決定転写因子の遺伝子発現を高い時間分解能で光操作する実験系に、eGAV が応用できる可能性が示唆された。

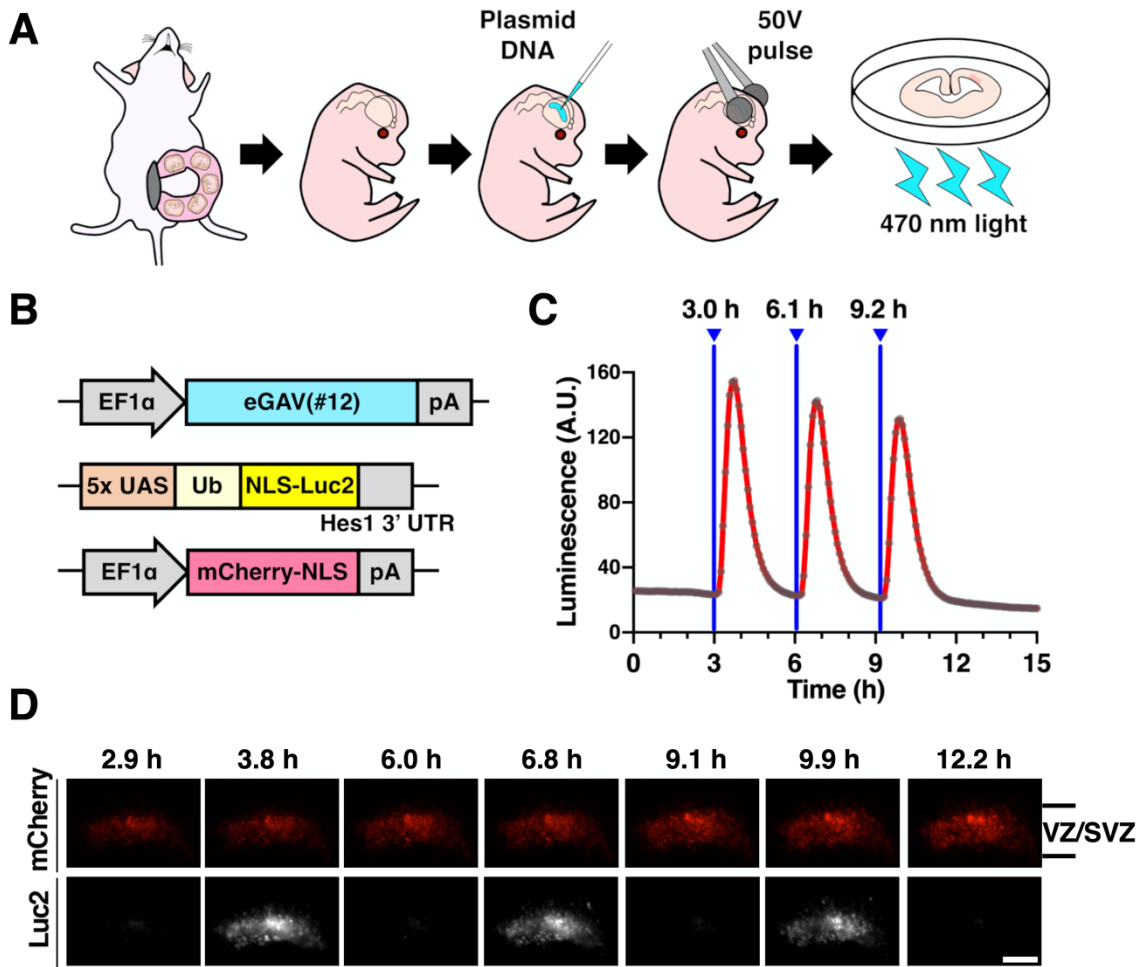


図 18. *Ex utero* エレクトロポレーションによる発生期マウス脳への遺伝子導入と脳スライス培養下における遺伝子発現の光操作

(A) 実験プロトコルの模式図。胎生 14 日目の発生期マウス脳に *ex utero* エレクトロポレーションによって遺伝子導入をし、脳スライス培養下で遺伝子発現の光操作系を評価した。

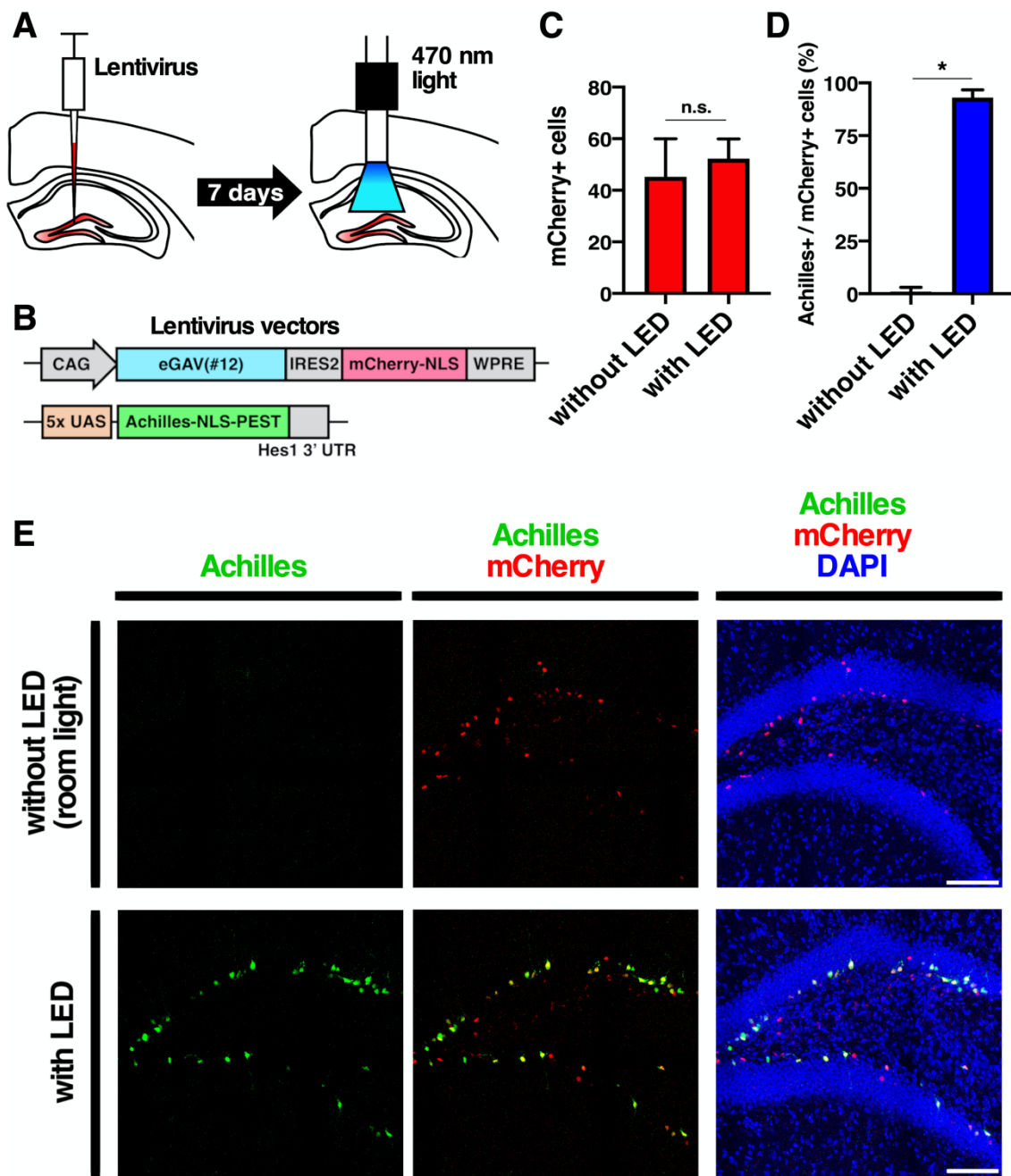
(B) 遺伝子導入したコンストラクトの模式図。

(C, D) 脳スライス培養下で、青色光 ( $6.0 \mu\text{W}$ ) を 4 分間、3 時間周期で照射し、レポーター活性を発光イメージングした。レポーター活性は、脳室および脳室下帯 (VZ/SVZ) の神経幹細胞および神経前駆細胞で観察された。同じ実験を 3 回繰り返し、同様の結果が得られた。スケールバーは  $200 \mu\text{m}$  を示す。



### 3-8. 成体マウスの海馬・歯状回における遺伝子発現の光操作

次に、成体マウスの海馬・歯状回の神経幹細胞と神経前駆細胞において、遺伝子発現の光操作ができるかどうか評価した。成体マウスの海馬・歯状回の顆粒細胞下層には、神経幹細胞と神経前駆細胞が存在しており、レンチウイルスベクターを用いることで、これらの細胞に遺伝子導入できる (van Hooijdonk et al., 2009; Imayoshi et al., 2014ab; Sueda et al., 2019; Kaise et al., 2021)。そこで、CAG-eGAV-IRES2-mCherry-NLS-WPRE と 5x UAS-Achilles-NLS-PEST-Hes1 3' UTR のレンチウイルスベクターを、成体マウス脳の花馬・歯状回に注入した (図 19A, B)。ウイルスベクターの注入から 7 日後に、光ファイバーを介して、海馬・歯状回に青色光を 12 時間照射し、蛍光レポーターの活性を評価した (図 19C–E)。レンチウイルスベクターの遺伝子導入マーカーである mCherry の陽性細胞数に関しては、暗所と光照射下のサンプル間で有意な差はなかった (図 19C, E)。一方で、暗所のサンプルよりも、光照射下のサンプルの方が、Achilles 陽性細胞/mCherry 陽性細胞の比率が有意に高いことから、遺伝子導入した細胞に対して、遺伝子発現を効率良く光誘導できたことがわかった (図 19D, E)。この結果から、eGAV 発現レンチウイルスベクターを用いることで、成体マウスの海馬・歯状回の神経幹細胞と神経前駆細胞において、遺伝子発現の光操作が可能であることを示した。

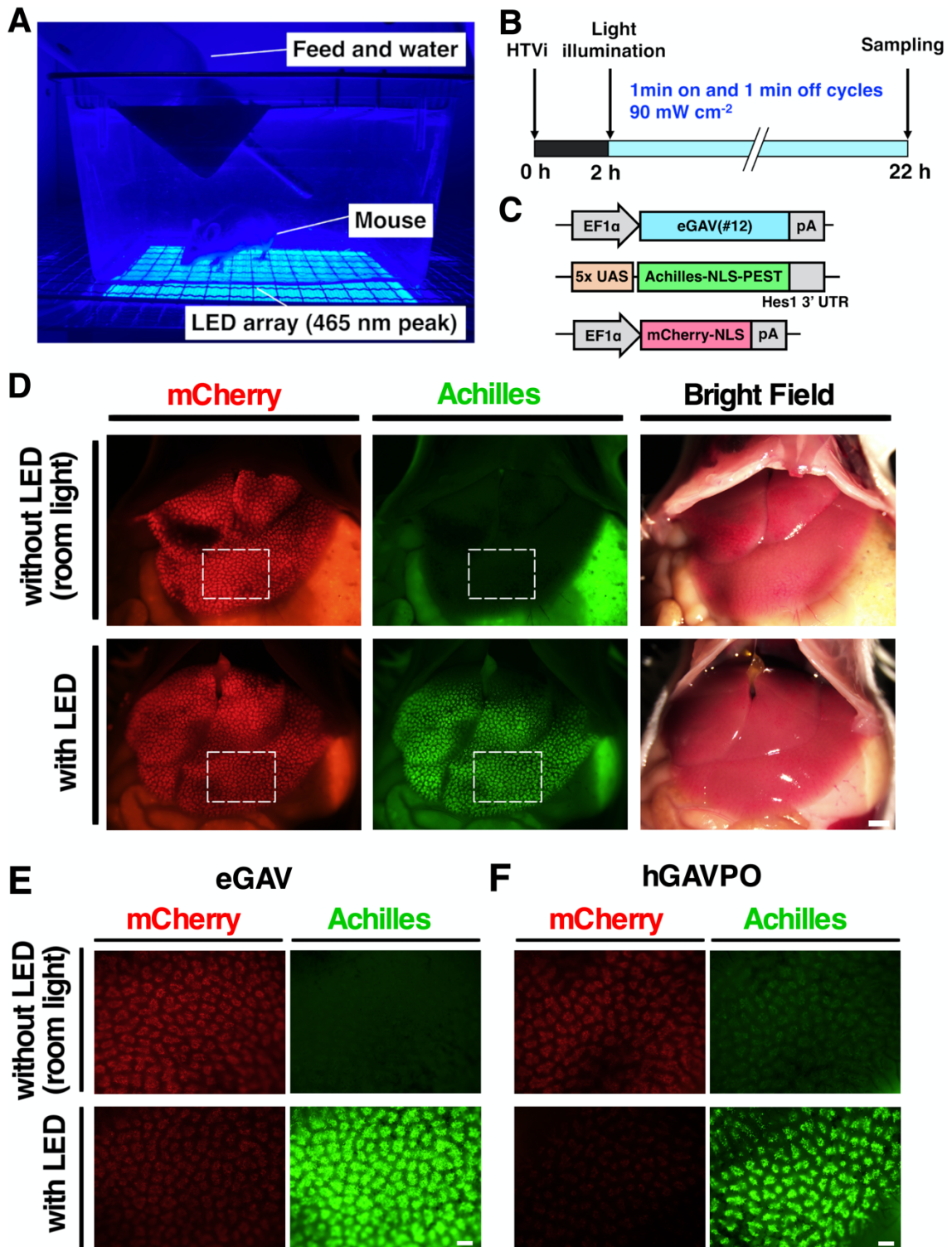


## 図 19. レンチウイルスベクターを用いた成体マウスの海馬・歯状回における遺伝子発現の光操作

- (A) 実験の模式図。レンチウイルスベクターを成体マウスの海馬・歯状回に注入し、7 日後に光ファイバーを介して、30 秒オン、180 秒オフのサイクルで 12 時間、青色光 (12  $\mu$ W) を照射した。その後、海馬・歯状回に存在する神経幹細胞と神経前駆細胞における蛍光レポーターの発現を評価した。
- (B) レンチウイルスベクターの模式図。CAG-eGAV-IRES2-mCherry-NLS-WPRE および 5x UAS-Achilles-NLS-PEST-Hes1 3' UTR レポーターを用いた。遺伝子導入された細胞には、mCherry の発現が確認できる。
- (C) 海馬・歯状回の神経幹細胞と神経前駆細胞における mCherry 陽性細胞 (mCherry+) の数をカウントした。値は平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n=4$ ) を示した。統計解析には、暗所および光照射下のサンプルにおける、レンチウイルスベクターによって遺伝子導入された細胞数を比較するために、two-tailed Student's t test を用いた (\* $p < 0.05$ , n.s.: not significant)。
- (D) 海馬・歯状回の神経幹細胞と神経前駆細胞の mCherry 陽性細胞における Achilles 陽性細胞の比率を示した。値は平均値  $\pm$  標準偏差を示す ( $n=4$ )。統計解析には、暗所および光照射下のサンプルにおいて、ウイルスベクターが導入された細胞 (mCherry 陽性細胞) の内、蛍光レポーター Achilles 陽性細胞の数を比較するために、two-tailed Student's t test を用いた (\* $p < 0.05$ , n.s.: not significant)。
- (E) 海馬・歯状回の蛍光顕微鏡画像。レンチウイルスベクターを用いることで、神経幹細胞と神経前駆細胞に遺伝子導入でき、eGAV によって Achilles の遺伝子発現を光操作できたことを示した。スケールバーは 100  $\mu$ m を示す。

### 3-9. 生体マウスの肝細胞における遺伝子発現の光操作

次に、eGAV を用いることで生体マウスの肝臓において遺伝子発現の光操作が可能かを評価した。ハイドロダイナミクス法を用い、eGAV 発現ベクターと、5x UAS-Achilles-NLS-PEST-Hes1 3' UTR レポーター、トランスフェクションマーカーとして mCherry 発現プラスミドを、生体マウスの尾静脈から急速に注入し、肝細胞に一過性トランスフェクションした。ハイドロダイナミクス法による遺伝子導入してから 2 時間後に、光照射されるサンプルは、腹部を除毛し、非侵襲的に青色光を 20 時間照射した (図 20A-C)。その結果、暗所のマウス肝細胞では、蛍光レポーター Achilles の発現が観察されなかったが、光照射下のマウス肝細胞では、Achilles の高発現が観察された (図 20D, E)。この結果から、eGAV を用いることで、生体マウスの肝細胞における遺伝子発現を、腹部からの非侵襲的な光照射によって光誘導できることが示された。また、同様のプロトコルを用い、hGAVPO についても評価したところ、暗所のマウス肝細胞において、遺伝子発現誘導のバックグラウンド活性が観察された (図 20F)。この結果から、培養細胞を用いた実験結果同様、マウス生体組織においても、hGAVPO の暗所におけるバックグラウンド活性は eGAV よりも高く、eGAV の光操作ツールとしての有用性が示された。



**図 20. ハイドロダイナミクス法による生体マウスの肝細胞への遺伝子導入と、非侵襲的な光照射による遺伝子発現の光操作**

- (A)** ハイドロダイナミクス法による遺伝子導入してから 2 時間後、マウスの腹部を脱毛して、LED アレイを用いて非侵襲的に青色光を照射した。
- (B)** 実験のタイムコースと光照射条件。1 分オン、1 分オフのサイクルで 20 時間、マウスの腹部から非侵襲的に光照射 ( $90.0 \text{ mW cm}^{-2}$ ) した。
- (C)** 遺伝子導入したコンストラクトの模式図。マウス肝細胞に eGAV 発現ベクター、5x UAS-Achilles-NLS-PEST-Hes1 3' UTR レポーター、トランスフェクションマーカーとして mCherry 発現ベクターを、マウス肝細胞に一過性トランスフェクションした。
- (D–F)** 暗所、もしくは、光照射後の eGAV を導入したマウス肝細胞 **(D, E)** と hGAVPO を導入したマウス肝細胞 **(F)** の明視野と蛍光画像。**(E)** の画像は、**(D)** の画像における白枠内の拡大図である。**(F)** hGAVPO は暗所におけるバックグラウンド活性が eGAV よりも高く、hGAVPO の暗所サンプルでは Achilles の蛍光シグナルが確認された。同じ実験を 3 回繰り返し、同様の結果が得られた ( $n = 3$ )。スケールバーは **(D)** 2 mm、**(E, F)** 500  $\mu\text{m}$  を示している。

### 3-10. ニワトリ胚の脊髄における遺伝子発現の光操作

eGAV による遺伝子発現の光操作は、哺乳類細胞だけでなく、鳥類細胞においても可能かどうか評価した。*In ovo* エレクトロポレーションによって、ニワトリ胚の脊髄神経幹細胞に、eGAV 発現ベクターとレポーターコンストラクト、および、トランスフェクションマーカーとして赤色蛍光タンパク質 mRuby3 発現ベクターを遺伝子導入した (図 21A)。遺伝子導入してから 24 時間後、卵内のニワトリ胚に対して、非侵襲的に青色光を 24 時間照射した (図 21B)。その後、ニワトリ胚の脊髄において、遺伝子導入された神経前駆細胞と新生神経細胞を観察した。その結果、暗所のサンプルでは、蛍光レポーター Achilles の発現は確認できなかったが、光照射下のサンプルでは、Achilles のシグナルが確認できた (図 21C, D)。この結果から、eGAV を用いることで、哺乳類細胞だけでなくニワトリ胚においても遺伝子発現の光操作が可能であることがわかった。

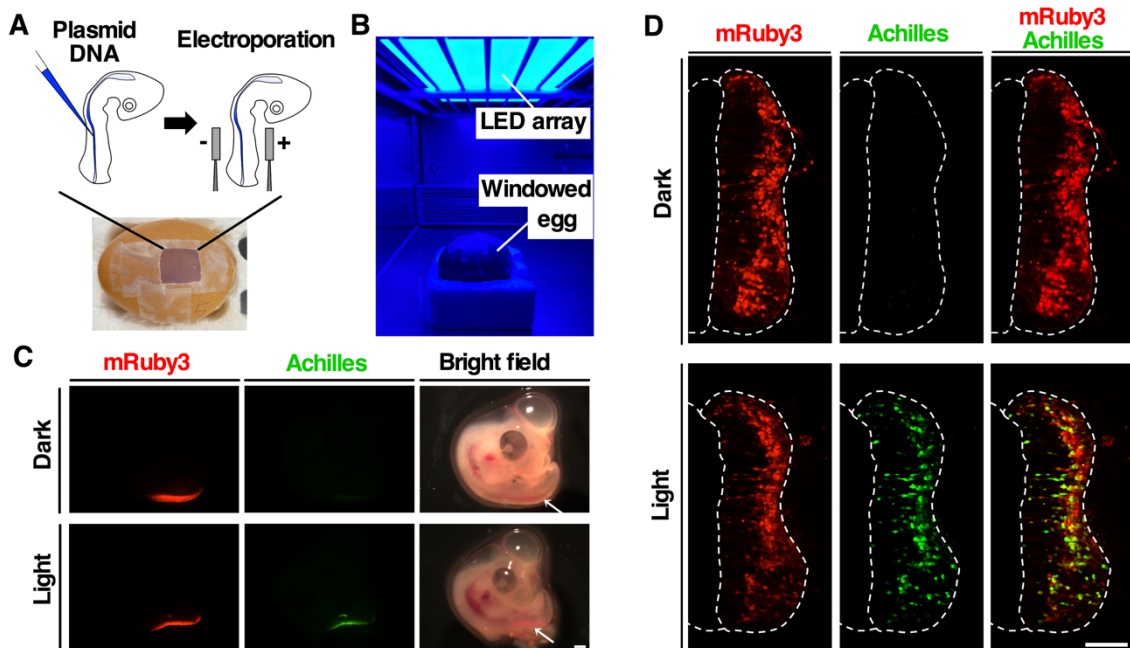


図 21. ニワトリ胚の脊髄における eGAV を用いた遺伝子発現の光操作

- (A) eGAV 発現ベクター、5x UAS-Achilles-NLS-PEST-Hes1 3' UTR レポーターおよびトランスフェクションマーカーとして mRuby3 発現ベクターの混合溶液を、Hamburger and Hamilton stage (HH) 17–18 ニワトリ胚の脊髄中心管に注入し、エレクトロポレーションした。
- (B) 卵殻の窓を塞いだ半透明のセロハンテープを介し、LED アレイを用いてニワトリ胚に非侵襲的な光照射をした。
- (C) 光照射下のサンプルでは、mRuby3 の蛍光シグナルが確認できるトランスフェクション領域において、Achilles の発現が確認できた (白矢印)。一方で、暗黒のサンプルでは、Achilles の発現は確認できなかった。
- (D) ニワトリ胚の脊髄を切片にし、蛍光画像を取得した。光照射下のサンプルでは、mRuby3 陽性細胞において、Achilles の発現が確認できた。スケールバーは 1 mm (C)、100  $\mu$ m (D) を示している。



## 第四章

### 考察

## 青色光作動性 Gal4 転写因子 eGAV の開発とその機能特性について

青色光作動性転写因子の開発では、光受容体 VVD を利用した光作動性 Gal4 転写因子の遺伝子発現の信頼性と光誘導能の向上を目的とし、VVD、Gal4 DNA 結合ドメイン、様々な転写活性化ドメインの最適な連結順序を評価した。その結果、既存の青色光作動性転写因子 hGAVPO と比較して、暗所でのバックグラウンド活性が非常に低い、かつ、光照射下での転写活性が高い特徴を持った、機能向上型・青色光作動性 Gal4 転写因子 eGAV の開発に成功した。さらに、eGAV は、hGAVPO と比較して光照射後の転写反応が速い上に、光量依存的な遺伝子発現量の調節が可能であった。hGAVPO では、このような光量依存的な遺伝子発現調節は不可能であり、eGAV は、これまで報告されている他の光応答性転写因子に比べて、遺伝子発現を光操作することの利点をより発揮できるような特性を持っていた。したがって、eGAV の開発は、遺伝子発現の光操作ツールの進歩に大きく貢献しており、種々の生物学的な問題に適応されることが期待される。

eGAV の特徴の 1 つとして、一過性トランスフェクションによって、高いレベルで eGAV が発現する、かつ、細胞間で遺伝子導入効率が異なる条件下においても、暗所のバックグラウンド活性が非常に低いことが挙げられる。特に、本研究で示されたように、マウス胎仔脳 (図 18)、ニワトリ胚の脊髄 (図 21) をモデルにした神経幹細胞・神経前駆細胞の細胞増殖・分化・成熟の研究においては、エレクトロポレーション法を用いた一過性トランスフェクションが広範に用いられている。このような実験系で光作動性転写因子を利用する場合、細胞間で光作動性転写因子の発現量が異なり、暗所でのバックグラウンド活性が大きく異なってしまうのは、実験系の信頼性を大きく損ねる。しかしながら、今回開発した eGAV は、様々な遺伝子導入法においても、暗所でのバックグラウンド活性が常に低く保たれており、これまで多くの光作動性転写因子では困難であった、一過性性遺伝子導入を用いた動物実験モデルにおける実験系へも高い信頼性をもって適用可能であると考えられる。また、成体脳を含めて、動物実験モデルの種々の臓器における特異的遺伝子発現誘導においては、アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus, AAV) ベクターやレンチウイルスベクターが広範に使用されている。この点においても、eGAV の低バックグラウンド活性や高い光誘導能は優位性があることが示された (図 19)。また、eGAV は、これまで報告されてきた青色光作動性転写因子よりも、遺伝子サイズが 1,506 bp であり、小型化に成功している。それに比べて、他の青色光作動転写因子である、Photoactivatable

(PA)-Tet-ON/OFF は 3,612 bp (Yamada et al. 2018)、hGAVPO は 1,527 bp (Imayoshi et al. 2013)、PA-Gal4cc は 2,304 bp (Yamda et al., 2020)、CRY-GalVP16l (B694) は 2,529 bp (Pathak et al., 2017)、GI-Gal4 DBD と LOV-VP16 はそれぞれ 3,981 bp と 678 bp (Yazawa et al., 2009)、LexA-CIB1-biLINuS と CRY2PHR (photolysate homology region)-VPR はそれぞれ 1,725 bp と 3,243 bp (Huang et al., 2020) と遺伝子サイズが大きい。このため、eGAV は、AAV ベクターなど、搭載できる遺伝子サイズの大きさに上限があるベクターにも適応できる可能性があり、高力価のウイルス溶液を精製しやすく、目的細胞への導入効率の向上と、光照射下における十分な遺伝子発現誘導に寄与すると考えられる。

以上のように、eGAV は、青色光作動性転写因子の生物学・生命科学研究への応用に必要な機能特性を大きく向上させたものであるが、さらなる機能向上の余地も残されていると考えている。例えば、eGAV の開発過程において、eGAV、hGAVPO、あるいはその他の eGAV 候補コンストラクトでは、同じ光受容体 VVD (N56K および C71V) を利用しているにも関わらず、これらの光応答性転写活性は異なっていた。一般的に、光依存的な二量体形成の効率や時定数は、内包している光受容体の特性によって主に決定されると考えられている。しかしながら、今回の研究結果から、光応答性転写因子の機能特性には、各タンパク質ドメインの配置、転写活性化ドメインやリンカー配列の選択などが、総合的に寄与することが示唆された。このことは、他の先行研究 (Yamada et al., 2018; Yamda et al., 2020b) においても示されており、立体構造モデリング等を用いた考察が今後必要であると考えられる。また、本研究では、各タンパク質ドメイン間のリンカー配列に関しては 1 通りしか評価していない。したがって、eGAV のリンカー配列を最適化することで、さらなる機能向上が期待できる。

また、VVD の代わりに eMags を利用することで、二量体形成効率の向上や、光照射後のヘテロ二量体形成速度の向上を期待したが、いずれの組み合わせも、暗所におけるバックグラウンド活性が極めて高く、暗所と光照射下における変化倍率は非常に低かった。この理由としては、VVD は光照射によってホモ二量体を形成するが、eMags はヘテロ二量体を形成するという光スイッチとしての違いが影響していると考えられる。加えて、eMags を利用する場合は、光作動性転写因子のコンポーネントが

2 つになる。よって、本実験では 2 種類のモノシストロニックベクターを利用したことで、細胞への遺伝子導入効率の低下や、各コンポーネントの発現比率が細胞間で不均一となったことも、光応答性が低下した理由として考えられる。今後の検証としては、バイシストロニックベクターを利用することで、これらの問題を解決できる可能性がある。

本研究では、機能向上型青色光作動性 Gal4 転写因子として、eGAV#12 を採用したが、目的の実験系によっては、他の候補コンストラクトも有用であると考えられる。例えば、目的遺伝子の発現パターンが、振動発現を伴いながら段階的に上昇するのであれば、eGAV#20、eGAV#24、eGAV#30、eGAV#38 の利用が考えられる。また、基底発現レベルが高い遺伝子の発現パターンを細胞内で再構成する場合は、eGAV#38 のようにバックグラウンド活性が高い方が eGAV#12 よりも適している可能性がある。また、目的遺伝子がコードするタンパク質の安定性や、本研究で検討した SV40pA や Hes1 3' UTR といった polyA の種類を変えることで、誘導する遺伝子発現パターンを調整することができる。よって、目的の実験系に最適な光作動性転写因子の選択には、本研究で行った発光やレポーター遺伝子による時間的な評価が肝要である。

上述したように、青色光作動性転写因子のバックグラウンド活性を限りなくゼロに近づけることは、遺伝子発現の光操作実験の信頼性の向上と、適応範囲の拡張に寄与する。しかしながら、安定発現株を用いるような培養細胞レベルでの研究や、染色体の決められた領域に一定のコピー数をノックインするような遺伝子改変動物を用いた実験系では、実験材料の準備段階で、実験計画にとって理想的な光作動性転写因子の発現量やバックグラウンドレベルを事前にスクリーニングすることができる。例えば、ある程度の基底発現レベルが認められている遺伝子の発現を光操作し、基底発現レベルからの変動と細胞表現型との関係を議論するような実験系においては、eGAV#12 よりも、eGAV#38 などの、ある程度のバックグラウンド活性をもつコンストラクトの適用を優先的に考えるべき状況も存在する。一般的に、暗所バックグラウンド活性と光照射時の誘導遺伝子発現レベルはトレードオフの関係にあり、光操作ツールを適応する実験系の特性と検証の目的をよく吟味し、最適なツールを選択することが肝要である。

## 結語

本研究では、光受容体 VVD を利用した青色光作動性 Gal4 転写因子の機能向上を目的に開発研究を実施した。その結果、既存の光操作ツール hGAVPO よりも遺伝子発現の光誘導能が高い、かつ、暗所でのバックグラウンド活性が非常に低い特徴を持った、機能向上型・青色光作動性 Gal4 転写因子 eGAV を開発した。eGAV の応用例として、哺乳類由来の培養細胞や、発生期マウス脳、あるいは成体マウスの海馬・歯状回に存在する神経幹細胞と神経前駆細胞において、遺伝子発現の光操作が可能であることを示した。更に、生体マウスの肝細胞に、非侵襲的な光照射によって遺伝子発現の光操作が可能であることを示した。また、哺乳類由来の細胞だけでなく、ニワトリ胚の脊髄に存在する神経前駆細胞や新生神経細胞においても、eGAV を用いることで遺伝子発現を光操作できることを示した。

今後、本研究で開発した eGAV を利用し、目的の遺伝子の発現を時空間的に光操作することで、これまで使用されてきた既存の遺伝子発現制御法では検証不可能であったような、発生組織や成体組織における、複雑な遺伝子発現動態が担う細胞表現型発現や形態形成・恒常性維持の新規メカニズムの発見に繋げていきたいと考えている。

## 引用文献

- AOKI, K., KONDO, Y., NAOKI, H., HIRATSUKA, T., ITOH, R. E. & MATSUDA, M. 2017. Propagating Wave of ERK Activation Orients Collective Cell Migration. *Dev Cell*, 43, 305-317.e5.
- BAERISWYL, T., MAUTI, O. & STOECKLI, E. T. 2008. Temporal control of gene silencing by in ovo electroporation. *Methods Mol Biol*, 442, 231-44.
- BAJAR, B. T., WANG, E. S., LAM, A. J., KIM, B. B., JACOBS, C. L., HOWE, E. S., DAVIDSON, M. W., LIN, M. Z. & CHU, J. 2016. Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting. *Sci Rep*, 6, 20889.
- BALLEZA, E., KIM, J. M. & CLUZEL, P. 2018. Systematic characterization of maturation time of fluorescent proteins in living cells. *Nat Methods*, 15, 47-51.
- BARNA, J., CSERMELY, P. & VELLAI, T. 2018. Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response. *Cell Mol Life Sci*, 75, 2897-2916.
- BEERLI, R. R., SEGAL, D. J., DREIER, B. & BARBAS, C. F., 3RD 1998. Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 14628-33.
- BENEDETTI, L., MARVIN, J. S., FALAHATI, H., GUILLÉN-SAMANDER, A., LOOGER, L. L. & DE CAMILLI, P. 2020. Optimized Vivid-derived Magnets photodimerizers for subcellular optogenetics in mammalian cells. *Elife*, 9.
- BRAND, A. H. & PERRIMON, N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118, 401-15.
- CHAN, Y. B., ALEKSEYENKO, O. V. & KRAVITZ, E. A. 2015. Optogenetic Control of Gene Expression in Drosophila. *PLoS One*, 10, e0138181.
- CHAVEZ, A., SCHEIMAN, J., VORA, S., PRUITT, B. W., TUTTLE, M., E, P. R. I., LIN, S., KIANI, S., GUZMAN, C. D., WIEGAND, D. J., TER-OVANESYAN, D., BRAFF, J. L., DAVIDSOHN, N., HOUSDEN, B. E., PERRIMON, N., WEISS, R., AACH, J., COLLINS, J. J. & CHURCH, G. M. 2015. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*, 12, 326-8.

- CHRISTIAN, M., CERMAK, T., DOYLE, E. L., SCHMIDT, C., ZHANG, F., HUMMEL, A., BOGDANOVA, A. J. & VOYTAS, D. F. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186, 757-61.
- CONG, L., RAN, F. A., COX, D., LIN, S., BARRETTO, R., HABIB, N., HSU, P. D., WU, X., JIANG, W., MARRAFFINI, L. A. & ZHANG, F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339, 819-23.
- DI PIETRO, F., HERSZTERG, S., HUANG, A., BOSVELD, F., ALEXANDRE, C., SANCÉRE, L., PELLETIER, S., JOUDAT, A., KAPOOR, V., VINCENT, J. P. & BELLAÏCHE, Y. 2021. Rapid and robust optogenetic control of gene expression in *Drosophila*. *Dev Cell*, 56, 3393-3404.e7.
- DUNSING, V., LUCKNER, M., ZÜHLKE, B., PETAZZI, R. A., HERRMANN, A. & CHIANTIA, S. 2018. Optimal fluorescent protein tags for quantifying protein oligomerization in living cells. *Sci Rep*, 8, 10634.
- FISCHER, J. A., GINIGER, E., MANIATIS, T. & PTASHNE, M. 1988. GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature*, 332, 853-6.
- GOSEN, M. & BUJARD, H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5547-51.
- GUNTAS, G., HALLETT, R. A., ZIMMERMAN, S. P., WILLIAMS, T., YUMEREFENDI, H., BEAR, J. E. & KUHLMAN, B. 2015. Engineering an improved light-induced dimer (iLID) for controlling the localization and activity of signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 112-7.
- HALLETT, R. A., ZIMMERMAN, S. P., YUMEREFENDI, H., BEAR, J. E. & KUHLMAN, B. 2016. Correlating in Vitro and in Vivo Activities of Light-Inducible Dimers: A Cellular Optogenetics Guide. *ACS Synth Biol*, 5, 53-64.
- HAMBURGER, V. & HAMILTON, H. L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*, 88, 49-92.
- IMAYOSHI, I., ISOMURA, A., HARIMA, Y., KAWAGUCHI, K., KORI, H., MIYACHI, H., FUJIWARA, T., ISHIDATE, F. & KAGEYAMA, R. 2013. Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors. *Science*, 342, 1203-8.
- IMAYOSHI, I. & KAGEYAMA, R. 2014a. bHLH factors in self-renewal, multipotency, and fate choice of neural progenitor cells. *Neuron*, 82, 9-23.
- IMAYOSHI, I. & KAGEYAMA, R. 2014b. Oscillatory control of bHLH factors in neural progenitors. *Trends Neurosci*, 37, 531-8.

- ISOMURA, A., OGUSHI, F., KORI, H. & KAGEYAMA, R. 2017. Optogenetic perturbation and bioluminescence imaging to analyze cell-to-cell transfer of oscillatory information. *Genes Dev*, 31, 524-535.
- JUNG, H., KIM, S. W., KIM, M., HONG, J., YU, D., KIM, J. H., LEE, Y., KIM, S., WOO, D., SHIN, H. S., PARK, B. O. & HEO, W. D. 2019. Noninvasive optical activation of Flp recombinase for genetic manipulation in deep mouse brain regions. *Nat Commun*, 10, 314.
- KAISE, T., FUKUI, M., SUEDA, R., PIAO, W., YAMADA, M., KOBAYASHI, T., IMAYOSHI, I. & KAGEYAMA, R. 2022. Functional rejuvenation of aged neural stem cells by *Plagl2* and anti-*Dyrk1a* activity. *Genes Dev*, 36, 23-37.
- KARIMOVA, M., BAKER, O., CAMGOZ, A., NAUMANN, R., BUCHHOLZ, F. & ANASTASSIADIS, K. 2018. A single reporter mouse line for *Vika*, *Flp*, *Dre*, and *Cre*-recombination. *Sci Rep*, 8, 14453.
- KAWANO, F., SUZUKI, H., FURUYA, A. & SATO, M. 2015. Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins. *Nat Commun*, 6, 6256.
- KAWASHIMA, T., KITAMURA, K., SUZUKI, K., NONAKA, M., KAMIJO, S., TAKEMOTO-KIMURA, S., KANO, M., OKUNO, H., OHKI, K. & BITO, H. 2013. Functional labeling of neurons and their projections using the synthetic activity-dependent promoter E-SARE. *Nat Methods*, 10, 889-95.
- KENNEDY, M. J., HUGHES, R. M., PETEYA, L. A., SCHWARTZ, J. W., EHLERS, M. D. & TUCKER, C. L. 2010. Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat Methods*, 7, 973-5.
- KIM, Y. G., CHA, J. & CHANDRASEGARAN, S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 1156-60.
- KUNII, A., HARA, Y., TAKENAGA, M., HATTORI, N., FUKAZAWA, T., USHIJIMA, T., YAMAMOTO, T. & SAKUMA, T. 2018. Three-Component Repurposed Technology for Enhanced Expression: Highly Accumulable Transcriptional Activators via Branched Tag Arrays. *Crispr j*, 1, 337-347.
- LIU, F., SONG, Y. & LIU, D. 1999. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther*, 6, 1258-66.
- LU, C. C., JENG, Y. Y., TSAI, C. H., LIU, M. Y., YEH, S. W., HSU, T. Y. & CHEN, M. R. 2006. Genome-wide transcription program and expression of the *Rta* responsive gene of Epstein-Barr virus. *Virology*, 345, 358-72.



- LUKER, G. D., PICA, C. M., SONG, J., LUKER, K. E. & PIWNICA-WORMS, D. 2003. Imaging 26S proteasome activity and inhibition in living mice. *Nat Med*, 9, 969-73.
- MAKAROVA, K. S., GRISHIN, N. V., SHABALINA, S. A., WOLF, Y. I. & KOONIN, E. V. 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*, 1, 7.
- MASAMIZU, Y., OHTSUKA, T., TAKASHIMA, Y., NAGAHARA, H., TAKENAKA, Y., YOSHIKAWA, K., OKAMURA, H. & KAGEYAMA, R. 2006. Real-time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 1313-8.
- MIYOSHI, H. 2004. Gene delivery to hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. *Methods Mol Biol*, 246, 429-38.
- MIZUSHIMA, S. & NAGATA, S. 1990. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res*, 18, 5322.
- MOTTA-MENA, L. B., READE, A., MALLORY, M. J., GLANTZ, S., WEINER, O. D., LYNCH, K. W. & GARDNER, K. H. 2014. An optogenetic gene expression system with rapid activation and deactivation kinetics. *Nat Chem Biol*, 10, 196-202.
- NAGY, A. 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 26, 99-109.
- NIHONGAKI, Y., FURUHATA, Y., OTABE, T., HASEGAWA, S., YOSHIMOTO, K. & SATO, M. 2017. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription systems to induce neuronal differentiation. *Nat Methods*, 14, 963-966.
- NODA, N. & OZAWA, T. 2018. Light-controllable Transcription System by Nucleocytoplasmic Shuttling of a Truncated Phytochrome B. *Photochem Photobiol*, 94, 1071-1076.
- PATHAK, G. P., SPILTOIR, J. I., HÖGLUND, C., POLSTEIN, L. R., HEINE-KOSKINEN, S., GERSBACH, C. A., ROSSI, J. & TUCKER, C. L. 2017. Bidirectional approaches for optogenetic regulation of gene expression in mammalian cells using Arabidopsis cryptochrome 2. *Nucleic Acids Res*, 45, e167.

- QUEJADA, J. R., PARK, S. E., AWARI, D. W., SHI, F., YAMAMOTO, H. E., KAWANO, F., JUNG, J. C. & YAZAWA, M. 2017. Optimized light-inducible transcription in mammalian cells using Flavin Kelch-repeat F-box1/GIGANTEA and CRY2/CIB1. *Nucleic Acids Res*, 45, e172.
- REGIER, J. L., SHEN, F. & TRIEZENBERG, S. J. 1993. Pattern of aromatic and hydrophobic amino acids critical for one of two subdomains of the VP16 transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 883-7.
- SADOWSKI, I., MA, J., TRIEZENBERG, S. & PTASHNE, M. 1988. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature*, 335, 563-4.
- SALGHETTI, S. E., MURATANI, M., WIJNEN, H., FUTCHER, B. & TANSEY, W. P. 2000. Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 3118-23.
- SANO, H. & YOKOI, M. 2007. Striatal medium spiny neurons terminate in a distinct region in the lateral hypothalamic area and do not directly innervate orexin/hypocretin- or melanin-concentrating hormone-containing neurons. *J Neurosci*, 27, 6948-55.
- SEIPEL, K., GEORGIEV, O. & SCHAFFNER, W. 1992. Different activation domains stimulate transcription from remote ('enhancer') and proximal ('promoter') positions. *Embo j*, 11, 4961-8.
- SHAO, J., WANG, M., YU, G., ZHU, S., YU, Y., HENG, B. C., WU, J. & YE, H. 2018. Synthetic far-red light-mediated CRISPR-dCas9 device for inducing functional neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E6722-e6730.
- SHIMOJO, H., ISOMURA, A., OHTSUKA, T., KORI, H., MIYACHI, H. & KAGEYAMA, R. 2016. Oscillatory control of Delta-like1 in cell interactions regulates dynamic gene expression and tissue morphogenesis. *Genes Dev*, 30, 102-16.
- STRICKLAND, D., LIN, Y., WAGNER, E., HOPE, C. M., ZAYNER, J., ANTONIOU, C., SOSNICK, T. R., WEISS, E. L. & GLOTZER, M. 2012. TULIPs: tunable, light-controlled interacting protein tags for cell biology. *Nat Methods*, 9, 379-84.
- SUEDA, R., IMAYOSHI, I., HARIMA, Y. & KAGEYAMA, R. 2019. High Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent vs. active neural stem cells in the adult mouse brain. *Genes Dev*, 33, 511-523.

- TASLIMI, A., ZOLTOWSKI, B., MIRANDA, J. G., PATHAK, G. P., HUGHES, R. M. & TUCKER, C. L. 2016. Optimized second-generation CRY2-CIB dimerizers and photoactivatable Cre recombinase. *Nat Chem Biol*, 12, 425-30.
- VAN ESSEN, D., ENGIST, B., NATOLI, G. & SACCANI, S. 2009. Two modes of transcriptional activation at native promoters by NF-kappaB p65. *PLoS Biol*, 7, e73.
- VAN HOOIJDONK, L. W., ICHWAN, M., DIJKMANS, T. F., SCHOUTEN, T. G., DE BACKER, M. W., ADAN, R. A., VERBEEK, F. J., VREUGDENHIL, E. & FITZSIMONS, C. P. 2009. Lentivirus-mediated transgene delivery to the hippocampus reveals sub-field specific differences in expression. *BMC Neurosci*, 10, 2.
- VOON, D. C., SUBRATA, L. S., BALTIC, S., LEU, M. P., WHITEWAY, J. M., WONG, A., KNIGHT, S. A., CHRISTIANSEN, F. T. & DALY, J. M. 2005. Use of mRNA- and protein-destabilizing elements to develop a highly responsive reporter system. *Nucleic Acids Res*, 33, e27.
- VORA, S., CHENG, J., XIAO, R., VANDUSEN, N. J., QUINTINO, L., PU, W. T., VANDENBERGHE, L. H., CHAVEZ, A. & CHURCH, G. 2018. Rational design of a compact CRISPR-Cas9 activator for AAV-mediated delivery. *bioRxiv*, 298620.
- WANG, X., CHEN, X. & YANG, Y. 2012. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. *Nat Methods*, 9, 266-9.
- YAMADA, M., SUZUKI, Y., NAGASAKI, S. C., OKUNO, H. & IMAYOSHI, I. 2018. Light Control of the Tet Gene Expression System in Mammalian Cells. *Cell Rep*, 25, 487-500.e6.
- YAMADA, M., NAGASAKI, S. C., OZAWA, T. & IMAYOSHI, I. 2020a. Light-mediated control of Gene expression in mammalian cells. *Neurosci Res*, 152, 66-77.
- YAMADA, M., NAGASAKI, S. C., SUZUKI, Y., HIRANO, Y. & IMAYOSHI, I. 2020b. Optimization of Light-Inducible Gal4/UAS Gene Expression System in Mammalian Cells. *iScience*, 23, 101506.
- YAZAWA, M., SADAGHIANI, A. M., HSUEH, B. & DOLMETSCH, R. E. 2009. Induction of protein-protein interactions in live cells using light. *Nat Biotechnol*, 27, 941-5.

- YOSHIOKA-KOBAYASHI, K., MATSUMIYA, M., NIINO, Y., ISOMURA, A., KORI, H., MIYAWAKI, A. & KAGEYAMA, R. 2020. Coupling delay controls synchronized oscillation in the segmentation clock. *Nature*, 580, 119-123.
- ZHOU, Y., KONG, D., WANG, X., YU, G., WU, X., GUAN, N., WEBER, W. & YE, H. 2022. A small and highly sensitive red/far-red optogenetic switch for applications in mammals. *Nat Biotechnol*, 40, 262-272.
- ZOLTOWSKI, B. D., SCHWERDTFEGER, C., WIDOM, J., LOROS, J. J., BILWES, A. M., DUNLAP, J. C. & CRANE, B. R. 2007. Conformational switching in the fungal light sensor Vivid. *Science*, 316, 1054-7.
- ZOLTOWSKI, B. D. & CRANE, B. R. 2008. Light activation of the LOV protein vivid generates a rapidly exchanging dimer. *Biochemistry*, 47, 7012-9.
- ZOLTOWSKI, B. D., VACCARO, B. & CRANE, B. R. 2009. Mechanism-based tuning of a LOV domain photoreceptor. *Nat Chem Biol*, 5, 827-34.

## 謝辞

本研究は、京都大学大学院生命科学研究科 高次生命科学専攻 脳機能発達再生制御 今吉研究室にて実施させて頂きました。今吉格教授と議論を重ねることで、数多くの知見を深めることができました。また実験技術をご指導して頂いたことに加え、自身の研究アイデアを積極的に試すことができる素晴らしい環境を与えてくださったことに、心より御礼申し上げます。山田真弓講師（現・京都大学 医生物学研究所、特定准教授）には、数多くの研究手法やアドバイスを親切丁寧にご指導していただきました。今後の研究活動の基盤となる技術を伝授して頂いたことを深く感謝致します。また、鈴木裕輔助教には、光作動性転写因子の時間的な定量に関してサポートして頂き、GUY Adam Tsuda 准教授には、ニワトリ胚における eGAV の遺伝子導入に関してサポートして頂きました。eGAV-eMag の実験では、福田智徳大学院生にサポートして頂きました。本研究の迅速な遂行にご助力頂いたことを深く感謝致します。

今吉研究室と影山研究室（元・医生物学研究所、現・理化学研究所 脳神経科学研究センター）のメンバーと定期的に議論させていただいたことは、自身の研究を客観的に捉える機会に繋がりました。また、京都大学大学院 生命科学研究科/医学研究科 松田道行教授、寺井健太准教授（現・京都大学 医学研究科、准教授）、小鉢健樹大学院生、基礎生物学研究所 定量生物学研究部門 青木一洋教授、宇田耀一博士、理化学研究所 脳神経科学研究センター 宮脇敦史教授には、本研究の迅速な遂行にご助力頂きました。深く感謝致します。

本研究は、日本学術振興会特別研究員制度（DC1）のご支援を賜りましたこと、深く感謝申し上げます。

最後になりましたが、本研究に携わってくださった皆様に心より感謝申し上げます。

本学位論文は、以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

NAGASAKI, S. C., FUKUDA, T. D., YAMADA, M., SUZUKI, Y., III, KAKUTANI, R., GUY, A. T. & IMAYOSHI, I. 2023. Enhancement of Vivid-based photo-activatable Gal4 transcription factor in mammalian cells. *Cell Structure and Function*, 48, 31-47.