

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	長崎 真治
論文題目	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		
(論文内容の要旨)			
<p>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、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。しかしながら、これまで開発された遺伝子発現の光操作ツールについては、単独で使用された例がほとんどであり、青色光や近赤外光で制御される複数の遺伝子発現の光操作ツールを単一細胞内に導入して、多色光制御に成功した事例は極めて限られている。そのため、申請者は、既存の光作動性転写因子では実現することができない、単一細胞内での異なる複数の目的遺伝子発現の独立な光制御を最終目的とし、青色光作動性 Gal4 転写因子と近赤外光作動性 Tet 転写因子の機能向上を試みた。</p> <p>はじめに、アカパンカビ <i>Neurospora crassa</i> 由来の光受容体 Vivid(VVD)を利用した光作動性 Gal4 転写因子の遺伝子発現の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 Gal4 転写因子 hGAVP0 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。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。</p> <p>次に、機能向上型・近赤外光作動性 Tet 転写因子の開発研究を実施した。これまでに開発されていた近赤外光作動性転写因子は、光照射下における遺伝子発現の誘導レベルが低いことや、遺伝子発現を誘導するには長時間の継続的な光照射が必要なことが課題として挙げられていた。そこで、近赤外光受容体を利用した光スイッチを利用し、これらのタンパク質ドメインと Tet 転写因子の融合タンパク質について、最適な配向性や組み合わせを検証することで、既存の近赤外光作動性転写因子よりも効率的に遺伝子発現を光誘導できる近赤外光作動性 Tet 転写因子を開発することに成功した。特に、申請者が開発した近赤外光作動性 Tet 転写因子は、光照射によって高いレベルで目的遺伝子発現を誘導することができるだけでなく、既存の近赤外光作動性転写因子では困難であるとされていた、数分間の単発光照射でも、効率良く遺伝子発現を誘導できることを確認した。</p> <p>最後に、本研究の最終目的であった、単一細胞内で異なる複数の遺伝子発現の独立な光制御を試みた。申請者が開発した青色光作動性転写因子eGAVと近赤外光作動性Tet転写因子を利用した遺伝子発現の光操作システムを、単一細胞内に共導入することで、異なる目的遺伝子の発現を青色光と近赤外光で、独立に光制御できることを示した。今後、本研究で開発した遺伝子発現の多波長光制御システムを利用し、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、かつ、独立に光操作することで、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。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

現在、遺伝子発現の光操作ツールの開発がいくつか報告されているが、それらは光受容体の応用例を単に示しただけのもの(概念実証)も多く、遺伝子発現の誘導レベルや光応答性の最適化は十分に実施されていなかった。申請者は、青色光または近赤外光作動性の人工転写因子に関して、これらの人工転写因子を構成する各タンパク質ドメインの最適な連結順序を網羅的に検証することで、機能向上型の光作動性転写因子の開発に成功した。更に、既存の光作動性転写因子では実現させることができなかった、単一細胞内で複数の遺伝子の発現を、青色光と近赤外光によって独立に制御できるシステムを新規構築した。

光作動性転写因子が利用される実験系では、高い時間分解能での光制御が求められるが、単発光照射によって効率良く遺伝子発現を誘導できる光作動性転写因子は非常に限られている。また、多くの光作動性転写因子の開発論文では、光応答性転写活性に関して、長時間の継続的な光照射後の時点ではしか評価しておらず、数分間の単発光照射に対する時間特性を評価した事例は数少ない。本論文では、単発光照射に対する光応答性転写活性を経時的に高精度で測定・定量することで、申請者が開発した青色光作動性Gal4転写因子eGAVは、既存のhGAVPOよりも速い転写活性のオン・オフ制御が可能であることを示した。また、申請者が開発した近赤外光作動性Tet転写因子は、3分間の単発光照射で目的遺伝子発現を顕著に誘導できることが分かった。これまでの通説は、近赤外光作動性転写因子は長時間の継続的な光照射を要するというものであり、この通説を覆す光作動性転写因子を開発したといえる。ゆえに、今回開発した2つの機能向上型・光作動性転写因子を併用することで、例えば、周期的な単発光照射によって、短時間周期の振動発現パターンを誘導できるなど、高い時間分解能で複数の目的遺伝子の発現を光制御できることが示唆された。

申請者は今後の研究展開の1つに、本論文で構築した遺伝子発現の多波長光制御システムを利用して、神経幹細胞内で振動発現するbHLH型転写因子群の機能的意義の解明を挙げていた。増殖する神経幹細胞では、複数のbHLH型転写因子が数時間周期で振動発現しており、これらの振動発現パターンによって神経幹細胞の自己複製や分化が制御されていると考えられている。しかしながら、振動発現するbHLH型転写因子間の相互作用については未だ解明されていない。例えば、Hes1とAscl1は、逆位相で振動発現するとされているが、逆位相であることが神経幹細胞の分化運命決定において、どのような機能的意義があるのか実験的な検証はされていない。そこで、遺伝子発現の多波長光制御システムを用い、2種類のbHLH型転写因子の振動発現を、異なる時間周期や、同位相もしくは逆位相で人為的に再構成し、その後の神経幹細胞の表現型を解析することで、振動発現するbHLH型転写因子群の機能的意義の解明が期待される。このように、本論文で構築した遺伝子発現の多波長光制御システムは、既存の手法では着手不可能であった複雑な生命現象の理解に大きく貢献し、今後の生物学・生命科学の研究を推進する上で欠かせない技術基盤であると考えられる。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、光遺伝学における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい技術が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。更に、令和5年2月2日に、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 2023年 6月 15日