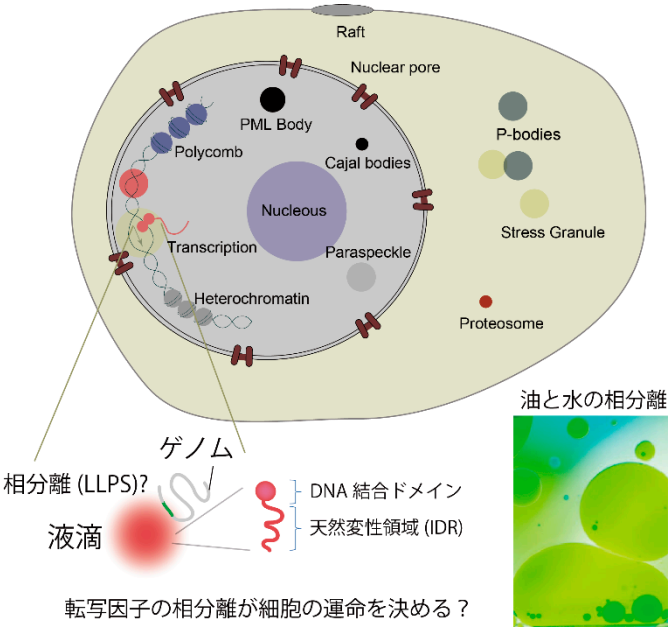
172　細胞内相分離現象を基盤とした遺伝子発現の光操作	下林　俊典

【目的】2009 年に Brangywnne Hyman らが線虫の初期胚でみられる P グラニュールが相分離液滴であることを報告して以来、細胞内の分子は自発的に集まり脂質膜に包まれないオルガネラ（しばしば、「biomolelcular condensates」とよばれる）を形成し、細胞内の至るところで重要な役割を果たしていることが明らかになってきている（下図）。この研究の目的は、非膜オルガネラにおける相分離現象の基礎理解を深めるとともに、光技術を応用して転写因子の時空間制御を可能にする新たな技術の開発である。

【方法】我々は細胞内オルガネラでみられる相分離現象に関する基礎学理の構築に世界をリードする成果を上げてきた（2020, Nat. Cell Biol., 2020 Nat. Comm., 2021 Nature など）。特に、核内の転写因子を時空間操作する光技術を用いて非膜型オルガネラが生成する初期過程のメカニズムを世界で初めて解明した研究（Shimobayashi, et al., Nature, 2021）は、当該分野において国際的に高く評価されている。そこで、本研究ではこのような光技術を応用し、転写を操作する光技術の開発と細胞リプログラミングへの応用に取り組んだ。

【結果】本研究期間中に PiggyBac システムを用いた巨大 DNA の核内の取り込みや MS2-MCP 技術などを用いることで、転写因子を時空間制御できる光操作システムのプロトタイプを構築することができた。今後、様々なパラメータを変えながら遺伝子発現を計測することで、転写活性化のプロセスを分子数の解像度で明らかにすることができるだろう。

相分離に駆動される細胞内非膜オルガネラ



172. 細胞内相分離現象を基盤とした遺伝子発現の光操作

下林　俊典

京都大学 iPS 細胞研究所

Key words：液液相分離，転写，ソフトマター，オプトジェネティクス

緒　言

2009 年に Brangywnne Hyman らが線虫の初期胚でみられる P グラニュールが相分離液滴であることを報告して以来［1］、細胞内の分子は自発的に集まり脂質膜に包まれないオルガネラ（しばしば、「biomolelcular condensates」とよばれる）を形成し、細胞内の至るところで重要な役割を果たしていることが明らかになってきている（図 1）。

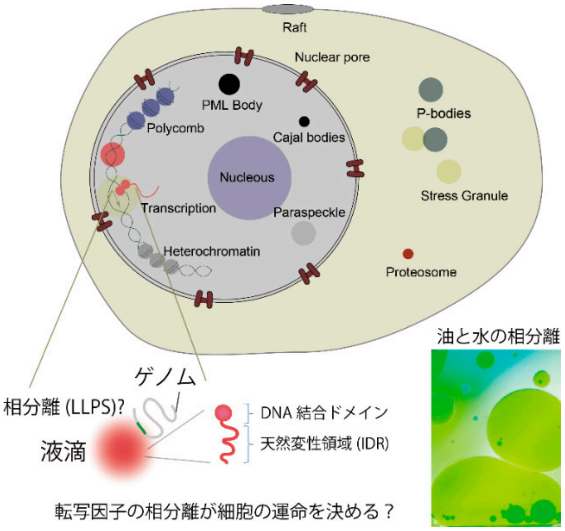


図 1. 相分離に駆動される細胞内非膜オルガネラ

細胞内には、さまざまな非膜型オルガネラが存在している。非膜型オルガネラは分子の集合体であり、このような分子の集合体は、まるで水の中の油滴のようなものである。水と油を混ぜて置いておくと、油の部分と水の部分に分かれるのはよく知られているが、このような現象を物理学では「液液相分離」と呼ぶ。細胞の転写に関わる転写因子も、それらがゲノム上で油滴のように液滴を形成することで転写を引き起こしているのではないかと言われている。

細胞内の RNA とタンパク質はホモまたはヘテロオリゴマー化することで、多価的に相互作用し液液相分離（LLPS）する。例えば、リボソーム合成が行われる核小体では五量体化した NPM1 が RNA を介して多価的に相互作用することで、高次構造を形成する。非膜オルガネラはその非膜性ゆえに外部との物質交換が容易であり、その性質を利用して構造がダイナミックに調節されている。例えば、核小体やカハールボディは、細胞周期に従って、生成と消滅を繰り返す。また、DNA の損傷部位には、53BP1 によって制御される DNA 修復液滴が可逆的に集合し、細胞質においてはストレスに反応して、ストレス顆粒が動的に形成される。これらの非膜オル

ガネラを「細胞内オルガネラ」という観点から考えると、その構造の応答性は、膜オルガネラに比べて極めて鋭敏であるといえる。非膜オルガネラは、細胞の環境や状態に応じて、迅速にその構造と機能を変化させる特徴をもっている。このように細胞内部の成り立ちに対する見方が変化しつつある現代において、我々は細胞内オルガネラでみられる相分離現象に関する基礎学理の構築に世界をリードする成果を上げてきた［2］。特に、核内の転写因子を時空間操作する光技術を用いて非膜型オルガネラが生成する初期過程のメカニズムを世界で初めて解明した研究は、当該分野において国際的に高く評価されている。

非膜オルガネラの構造形成のメカニズムを探ると共に、その細胞内での機能を解明するために、さまざまな液滴操作技術が開発されてきた［3〜5］。その中で我々は、光を利用した液滴操作技術、Corelets システムを活用して研究を進めてきた［2，3］。図 2a で示されているように、Corelet システムは特定のタンパク質が細胞内でオリゴマーを形成するプロセスを模倣する技術である。このオリゴマー化は、核小体タンパク質 Npm1 の五量体形成など、非膜オルガネラを構成する分子で頻繁にみられる。システムは「Core」と「IDR」という二つの主要モジュールから成り立つ。“Core”モジュールは 24 量体を形成するフェリチンの性質を利用して、細胞内で自己集合する。各モノマーには光に反応する iLID タンパク質が融合されており、24 量体コアの表面に iLID が表出するよう設計されている。一方、“IDR” モジュールは天然変性領域（IDR）に、iLID の相手役である SspB が融合している。iLID が光により活性化すると、SspB を持つ IDR がフェリチンコアの表面に引き寄せられ、これが IDR 同士の多価相互作用を促進することで液液相分離を引き起こす。図 2b に示すように、このシステムの利用により、核生成やスピノーダル分解といった、マテリアルサイエンスで広く認知されている数理的・物理的基盤に立脚した相分離パターンが、生物学的コンテクストで観察される。我々はこのシステムを活用して液滴形成のダイナミクスとメカニズムを数理的・物理的に解析し、液滴形成に関する新たな知見を見出してきた［2］。そこで、本研究ではこのような光技術を応用し、転写を操作する光技術の開発と細胞リプログラミングへの応用に取り組んだ。

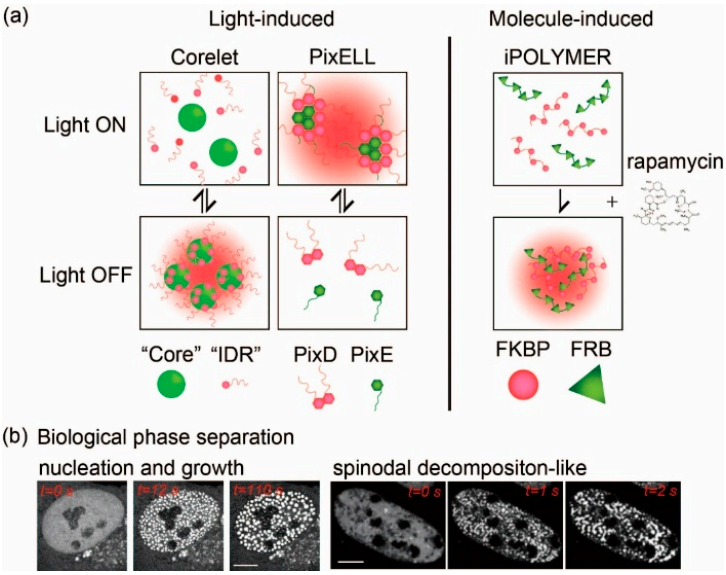


図 2. 光を用いた細胞内相分離の光制御

a）相分離制御の模式図。左側に示すのは光を用いたCoreletとPixELLのもので、光のON／OFFに伴ってどのように分子同士の結合が変化するかを示している。右側はiPOLYMERのもので、rapamycinという物質の添加により分子が集合して構造を制御することができる。

b）実際にCoreletを細胞内に誘導し、光によって細胞内に構造を作っているところである。分子の結合のしやすさを制御することによって、その構造が出来ていく様子が変化していることがわかる。スケールバーは10 mm。

方法および結果

本研究で開発する新しい光技術は、図 3 に示すように特定のゲノム上に光で転写因子を集積させ、それによって遺伝子発現を制御しようとするものである。技術開発の工程は 3 つのパートに分類した。1. 特定ゲノムの可視化、2. 転写因子をリクルートするゲノム領域の構築、3. 転写の可視化である。本研究期間中に、それぞれ 3 つのパートを構築することができた。ゲノムの可視化については、図 4a に示すように Lac/TetO arrays を核内に取り込み、LacO-LacI の結合を用いてゲノムの可視化を行った。また、これらの巨大ゲノムを核内に取り込むため、PiggyBac 技術の構築や Crispr-Cas9 についても技術確立を進めることができた。転写プロセスの可視化についても図 4b に示すように MS2-MCP システムを用いて転写バースティングをイメージングすることに成功した。筆者がこれまでに確立してきた転写因子の時空間光操作技術［2］をこれらの技術と融合することで、光操作システムの完成にむけて現在も研究を進めている。

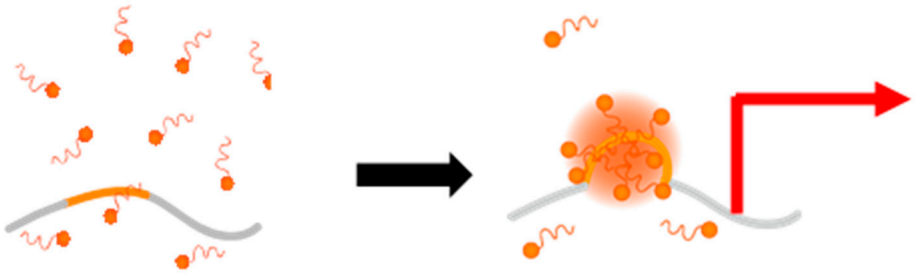


図 3. 転写プロセスの光制御の概念図
転写因子を光制御することで転写を引き起こす。この転写因子の集まるべきゲノム領域（オレンジの部分）やそのゲノム領域に光制御した転写因子が集まるようなシステムを構築することで、転写を制御できる。

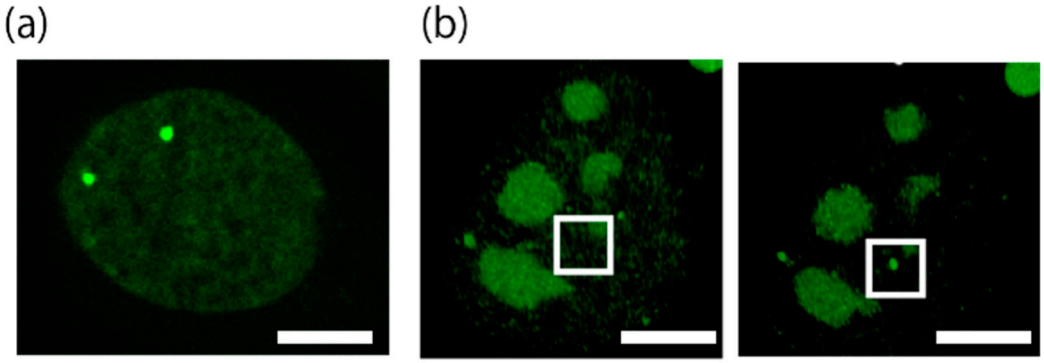


図 4. 巨大繰り返しゲノムと転写過程のイメージング
本研究によって可視化された巨大繰り返しゲノム (a) と転写プロセス (b) の可視化を行った。スケールバーは 10 mm。

考　察

本研究期間中に転写因子をいつ、どこに、どのように集めるかを制御できる光操作システムのプロトタイプを構築することができた。今後、様々なパラメータを変えながら遺伝子発現を計測することで、転写活性化のプロセスを分子数の解像度で明らかにすることができる。また、多くの転写因子は、IDR と DNA 結合ドメインを持ち合わせている［6, 7］。これらの因子は、IDR を介した分子間の相互作用で転写因子同士の分子集合を促進するとともに、Mediator などのコファクターをリクルートし、転写を活性化するハブとしての機能も示唆されている［8, 9］。また、特定の DNA 配列をテンプレートにすることで、ゲノムに“力”を及ぼしながら、核内のゲノム再構築を促進する役割も担っているかもしれない。さらには、細胞内の液滴は、ゲノムだけでなく、細胞膜や細胞骨格など他のオルガネラとも相互作用しながら協奏的に機能を発揮しているだろう。細胞内の多様なオルガネラと連携させながら、相分離を精密に操作する技術が開発されれば、非膜オルガネラの機能解明は大幅に進展し、新たな治療法や医薬品の開発にも繋がるだろう。

共同研究者・謝辞

この度はこのような貴重な助成を頂戴し、公益財団法人上原記念生命科学財団に心より御礼を申し上げます。

文　献

1） Brangwynne, C. P., et al. (2009). "Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation."Science,324(5935), 1729-1732. PMID: 19460965 DOI: 10.1126/science.1172046

2） Shimobayashi, S. F., et al. (2021). "Nucleation landscape of biomolecular condensates." Nature, 599, 503–506 PMID: 34552246 DOI: 10.1038/s41586-021-03905-5

3） Bracha, D., et al. (2018). "Mapping local and global liquid phase behavior in living cells using photo-oligomerizable seeds." Cell, 175, 1467–1480. PMID: 30500534 PMCID: PMC6724719 DOI: 10.1016/j.cell.2018.10.048

4） Dine, E., et al. (2018). "Protein phase separation provides long-term memory of transient spatial stimuli." Cell Systems, 6, 655-663. PMID: 29859829 PMCID: PMC6023754 DOI: 10.1016/j.cels.2018.05.002

5） Nakamura, H., et al. (2018). "Intracellular production of hydrogels and synthetic RNA granules by multivalent molecular interactions." Nat. Mat., 17, 79-89. PMID: 29115293 PMCID: PMC5916848 DOI: 10.1038/nmat5006

6） Morin, J. A., et al. (2022). "Sequence-dependent surface condensation of a pioneer transcription factor on DNA."NaturePhysics,18,271–276.PMID:35787038PMCID:PMC9282234DOI:10.1073/pnas.2202222119

7） Kar, M., et al. (2022). "Phase-separating RNA-binding proteins form heterogeneous distributions of clusters in sub-saturated solutions." Proceedings of the National Academy of Sciences, 119, e2202222119. PMID: 35787038 PMCID: PMC9282234 DOI: 10.1073/pnas.2202222119

8） Wei, M. T., et al. (2020). "Nucleated transcriptional condensates amplify gene expression." Nat Cell Biol, 22(10), 1187-1196. PMID: 32929202 DOI: 10.1038/s41556-020-00578-6

9） Sabari, B. R., et al. (2018). "Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control ."Science,361(6400),eaar3958. PMID:29930091 PMCID: PMC6092193 DOI:10.1126/science.aar3958