



公立大学法人

福島県立医科大学  
FUKUSHIMA MEDICAL UNIVERSITY



愛知医科大学



Brain/MINDS



東京大学医科学研究所  
The Institute of Medical Science, The University of Tokyo



大阪大学  
OSAKA UNIVERSITY

令和5年2月1日

公立大学法人 福島県立医科大学

学校法人 愛知医科大学

国立大学法人 東京大学医科学研究所

国立大学法人 大阪大学

## 研究成果の発表について

～ハイスペックな遺伝子スイッチの制御を可能にする新規ベクターシステムの開発に成功～

このたび、公立大学法人福島県立医科大学 医学部生体機能研究部門の加藤成樹准教授、小林和人教授、学校法人愛知医科大学 総合医学研究機構動物実験部門の松下夏樹准教授、国立大学法人東京大学医科学研究所 実験動物研究施設先進動物ゲノム研究分野の真下知士教授、国立大学法人大阪大学 医学部動物実験施設の宮坂佳樹特任研究員らの研究チームの論文が米国科学誌 Cell Reports Methods (2023年2月27日号) に掲載されるのに先立って、オンライン版 (2023年1月18日) に掲載されましたので、お知らせします。本研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) 脳とこころの研究推進プログラム (革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト (Brain/MINDS)) の研究開発課題として実施されたものです。

### 1. 研究者

福島県立医科大学	医学部生体機能研究部門	准教授	加藤	成樹
		教授	小林	和人
		助教	西澤	佳代
		技術補佐	菅原	正晃
愛知医科大学	総合医学研究機構動物実験部門	准教授	松下	夏樹
愛知医科大学	医学部生物学・細胞生物学	教授	武内	恒成
大阪大学	医学部附属動物実験施設	特任研究員	宮坂	佳樹
東京大学	医科学研究所先進動物ゲノム研究分野	教授	真下	知士

## 2. 研究課題名

Highly selective transgene expression through the flip-excision switch system by using a unilateral spacer sequence (片側スペーサー配列を用いた遺伝子スイッチによる高精度な選択的遺伝子発現システムの開発)

### 3. 研究成果のポイント

- (1) Cre 組換え酵素による遺伝子スイッチを高精度で選択的に制御するハイスペックなシステムの開発に世界で初めて成功した。
- (2) 本システムは、特定の細胞種や神経回路を標的として複雑な脳のネットワークの構造や機能の解析に有益な技術を提供し、将来的に目的の細胞種の機能操作による神経・精神疾患の遺伝子治療戦略に結び付く。

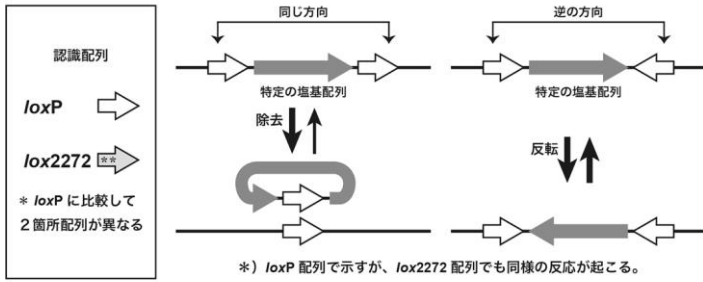
## 4. 研究の背景

医学・生命科学の様々な研究において、特定の細胞種における遺伝子機能を解析するために、DNA 組換え酵素を利用した遺伝子改変技術である「遺伝子スイッチシステム」が近年多く利用されています。特に、このスイッチシステムは、特定の細胞種や神経回路を標的として複雑な脳のネットワークの構造や機能を解析するために重要な研究方法を提供してきました。組換え酵素である Cre は、34 塩基の認識配列を認識し組換え反応を触媒しますが、このスイッチシステムでは、loxP と lox2272 と呼ばれる 2 種類の認識配列のどちらかの配列が一組存在するときに、組換え酵素が組換え反応を触媒する性質を利用しています。認識配列が同じ向きときは、それらの間の特定の塩基配列が除去され、逆の向きときにはその塩基配列の反転が起きます (図 1A) 。loxP と lox2272 配列は 2 塩基のみ異なっており、組換え酵素の反応は、どちらかの組み合わせのときのみで起こります。

遺伝子スイッチシステム (図 1B) では、目的の細胞種でのみ遺伝子の発現を誘導するために、遺伝子発現を駆動するプロモーターという配列の方向に対して、逆向きに導入遺伝子を連結し、その両端に loxP と lox2272 配列の組み合わせから成る二重認識配列を組み込んでおきます。この状態では、導入遺伝子の発現は起きません。しかし、組換え酵素を持つ特定の細胞種では、反転と除去の 2 段階の反応によってプロモーターの方向と導入遺伝子の方向が一致するように再配置され、導入遺伝子の発現が誘導されます。

これまでアデノ随伴ウイルス (AAV) が、この遺伝子スイッチを細胞内に導入するための運び屋 (ベクター) として利用されてきました。しかし、AAV ベクターを使って遺伝子導入をおこなう際、組換え酵素が存在しないにもかかわらず、導入遺伝子の発

(A) 組換え酵素による反応



(B) 組換え反応による遺伝子スイッチ

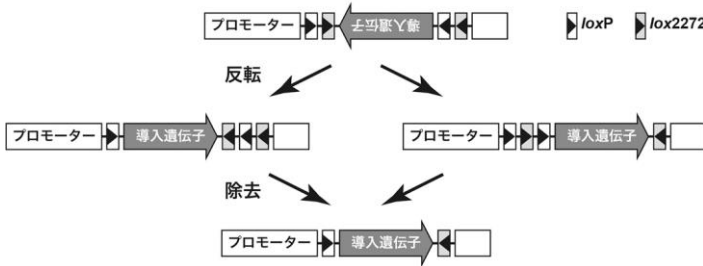


図1：組換え酵素による反応と遺伝子スイッチシステム

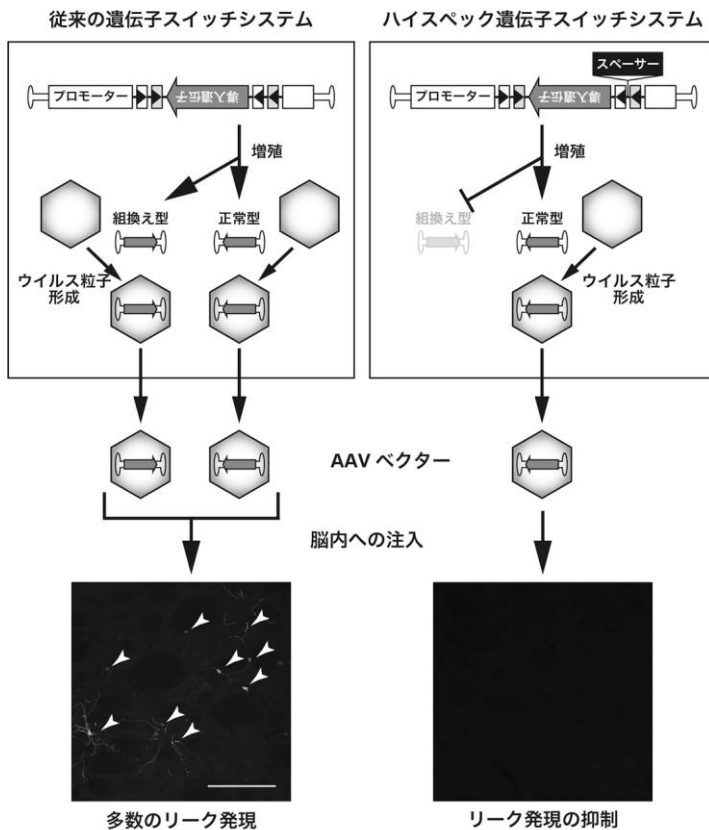


図2：スペーサー配列の挿入による組換え型ベクターの形成と脳内注入後のリーク発現の抑制

現が起きてしまう“リーク”のあることが見出され、深刻な問題となっていました。すなわち、本来発現を目的としていない細胞種で遺伝子が発現してしまうという、スイッチの故障が起こるのです。そのため、導入遺伝子のスイッチを高精度にコントロールする方法の実現が世界的に望まれていました。

### 5. 研究概要

我々の研究グループはリーク発現の問題解決に取り組み、ウイルスベクターにおいて遺伝子発現が起きる原因は、ベクターを作製する過程において組換え酵素が存在しないにも関わらず、認識配列の間で特殊な組換えが生じるためであることを見出しました（図2左上）。この組換えは、短い塩基配列の間での相同組換えと呼ばれる現象ではないかと考えられます。ベクター作製時の組換えを抑えるため、片側スペーサー配列と名付けた塩基配列を、逆向きの導入遺伝子の前側あるいは後側にある二重認識配列の間に挿入しました。特に後側の二重認識配列への挿入によって、酵素の存在しない状態での組換えを顕著に減少させることを明らかにしました（図2右上）。片側スペーサー配列の存在は、組換え反応の原因になると考えられる特殊な

（図2右上）。片側スペーサー配列の存在は、組換え反応の原因になると考えられる特殊な

DNA 構造の形成を抑制するためではないかと考えています。

実際に、片側スペーサー配列を挿入したウイルスベクターを脳内に注入した実験群では、その配列をもたない対照群に比較して、リーク発現が顕著に（対照群の 0.3%）抑えられることがわかりました（図 2 下）。さらに、特定の細胞種のみで組換え酵素を発現する遺伝子改変ラットの脳内に注入した場合には、対照群では酵素を持たない細胞種で多くのリーク発現が観察されますが、片側スペーサー配列を持った実験群では、これらの発現がほとんど起こらなくなることを確認できました。

以上の結果、従来の遺伝子スイッチシステムでは導入遺伝子のリーク発現が深刻な問題でありましたが、導入遺伝子の二重認識配列に片側スペーサー配列を挿入することによって、これまでよりも精密で選択的に遺伝子発現をコントロールするハイスペックな遺伝子スイッチシステムを開発することに成功しました。

## 6. 社会的意義と今後の展開

今回開発したハイスペック遺伝子スイッチシステムは、これまでの課題であった導入遺伝子のリーク発現を防止し、遺伝子発現スイッチの精度を高めることを実現しました。今後、目的の細胞種の可視化や活動の操作技術と組み合わせることで、特に複雑なネットワーク構造を持つ脳において特定の細胞種や神経回路の構造や機能の詳細な理解に繋がることが期待されます。これらの成果は、基礎・臨床医学の両面において応用され、将来、特定の細胞種を標的とした遺伝子治療法の開発などに応用される可能性があります。

## 7. 掲載雑誌

掲載誌：米国科学誌 Cell Reports Methods 2023 年 2 月 27 日号

論文タイトル：Highly selective transgene expression through the flip-excision switch system by using a unilateral spacer sequence

著者：Natsuki Matsushita\*, Shigeki Kato\*, Kayo Nishizawa, Masateru Sugawara, Kosei Takeuchi, Yoshiki Miyasaka, Tomoji Mashimo, and Kazuto Kobayashi\*\*

(\* Equally contributed author, \*\* Corresponding author)

Cell Reports Methods 3: 100393 (2023)

DOI: 10.1016/j.crmeth.2022.100393

URL:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667237522002983?via%3DiHub>

## 8. 問い合わせ先

### <研究に関すること>

福島県立医科大学 医学部附属生体情報伝達研究所 生体機能研究部門

准教授 加藤 成樹

教授 小林 和人

<https://www.fmu.ac.jp/home/molgenet/>

愛知医科大学 総合医学研究機構 動物実験部門

准教授 松下 夏樹

[https://www.aichi-med-u.ac.jp/su10/su1007/su100701/1188165\\_2741.html](https://www.aichi-med-u.ac.jp/su10/su1007/su100701/1188165_2741.html)

### <広報に関すること>

福島県立医科大学 医療研究推進課

<https://www.fmu.ac.jp/>

愛知医科大学 医学部事務部庶務課

<https://www.aichi-med-u.ac.jp/>