

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14916

研究課題名(和文)アカパンカビゲノム防御機構RIP可視化システムの構築

研究課題名(英文)Visualization of the RIP machinery in living Neurospora

研究代表者

本田 信治 (Honda, Shinji)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：90632167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌のアカパンカビはRIPと呼ばれる独特のゲノム防御機構を持つ。RIPは生殖期に重複配列を検出し、両配列とも変異させ、究極的には遺伝子を破壊する。しかし、この分子機構はまったくわかっていない。本研究では、このRIPを可視化するシステムの構築を目指した。まず、青、緑、赤、近赤外の蛍光蛋白質をアカパンカビに最適化し、これらを用いて異なる核内領域を可視化することに成功した。更に、蛍光蛋白質の検出を高めるために、透明化させた子嚢殻(生殖器)を効率よく作製する手法を確立した。現在、改良した蛍光蛋白質を重複配列へ繋ぎ止めさせて検出する手法の最適化を行っている。

研究成果の概要(英文)：The filamentous fungi *Neurospora crassa* has a unique genome defense system called Repeat Induced Point mutation (RIP). During specific sexual phase, RIP detects duplicated sequences throughout genome and mutates them, ultimately resulting in gene disruption. The mechanism, however, remains almost unknown. This study aimed to label artificial duplicated sequences by fluorescent proteins and to trace the RIP machinery in living cells. We first optimized blue, green, red, and near-infrared fluorescent protein tagging systems and successfully visualized distinct nuclear compartments in *Neurospora*. Furthermore, we established a method to effectively produce transparent perithecia to enhance the detection of fluorescent proteins in sexual phases. We are currently optimizing the visualization of artificial duplicated sequences tethered by our improved fluorescent protein systems.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：ゲノム防御 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

「1 遺伝子 1 酵素説」の研究で有名なアカパンカビは、生殖期に 400bp 以上で 80% 以上相同性のあるすべての重複配列を認識し、両方の配列を高頻度に C:G から T:A へ塩基置換させるゲノム防御機構 Repeat Induced Point mutation (RIP) を持つ。全ゲノム解読の結果、アカパンカビのトランスポゾンはずべて破壊され、重複遺伝子もほぼ例外なく存在しない (Galagan et al., *Nature*, 2003)。生物は遺伝子の数が増えれば (高等生物になれば) ファミリー遺伝子数の割合が比例して多くなるのだが、アカパンカビはこの比例関係から大きく外れる。つまり、アカパンカビは RIP 獲得の対価として、「1 遺伝子 1 酵素説」の成立に欠かせない、機能が重複した遺伝子を持ってなくなったと考えられる。

近年、CRISPER/Cas9、TALEN、ZFN 法と言ったゲノム編集技術が爆発的に利用され始めている。アカパンカビでは RIP をうまく応用した遺伝子改変・破壊法 (ゲノム編集) が長い間利用されてきた (例: 標的遺伝子を人為的に外部導入・重複させて RIP を発動させる)。RIP は既存のゲノム編集技術と異なる作用で働くことが予想され、特に選択性の高さから、CRISPER/Cas9 システムでもっとも問題になっている off-target (目的外の配列を標的する) 効果の心配がないと思われる。そのため、RIP の分子機構の解明は、応用研究へと繋がり、最終的には既存のゲノム編集技術のデメリットを補う新たな技術となる可能性も秘めている。

RIP 現象は、約 30 年前に発見され (Selker et al. *Cell*, 1987)、偶然にも逆遺伝学手法により、生殖期特有の DNA メチル化酵素ドメインを持つ RID-1 (RIP defective-1) が唯一 RIP に関与する遺伝子として同定された (Freitag et al., *PNAS*, 2003)。その他の分子機構はまったく謎である。その理由として、(1) RIP が起きる生殖器官はとても小さく、生化学的手法が困難である、(2) 生殖時には父方・母方の遺伝情報を両方持つ 2 倍体になるため、順遺伝学手法が困難であることが挙げられる。そのため、多くの研究者が 1990 年代前半から RIP 研究を断念している。

2. 研究の目的

アカパンカビの RIP は生殖期において、ゲノム上で偶発的に重複した配列でも人為的に重複させた配列でも探し出し、両方の配列を高頻度に塩基置換する。しかし、RIP に関する研究を含めアカパンカビ生殖期の研究は、無生殖期の研究と比べて非常に困難であったため、その実験系が皆無に近い。そこで本研究では RIP 研究の基盤となる RIP の重複配列探索 (Pairing) と DNA 配列変異 (RIPing) を顕微鏡下で捉える RIP 可視化システムの構築を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、RIP の Pairing、RIPing を捉えるために人為的な重複配列を導入し、この配列に特異的に結合する蛋白質を蛍光標識化することで RIP 可視化システムの構築を目指す。そのために、(1) 特定染色体領域に目的蛋白質を Tethering (繋ぎ止め) するシステムの構築、(2) アカパンカビ生殖系で長時間ライブイメージング用に最適化した蛍光蛋白質の選択、(3) 蛍光蛋白質の発現量を最適化するプロモーターの選択、(4) 蛍光蛋白質のシグナル検出を高めるための生殖器の透明化を行い、これらを組み合わせて行う。

4. 研究成果

アカパンカビの長時間ライブイメージング用として種々の蛍光蛋白質を試した結果、緑色では mNeonGreen、赤色では TagRFP-T が優れていることを見出し、これらのコドンアカパンカビに最適化した。また、緑色と赤色の他に、青色と近赤外も併せた 4 色の蛍光蛋白質で同時にラベル化するシステムもアカパンカビで構築した。これらは、私たちが以前に構築したゲノム上へ自由自在にエピトープタグを挿入するシステム (Honda & Selker, *Genetics*, 2009) を採用したため、コンストラクトの移し替えも簡便になっている。また、この多重蛍光蛋白質のラベル化を用いて、セントロメア領域やテロメア領域といった特定な核内領域を可視化することに成功した (Galazka et al., *Genome Res*, 2016; Klocko et al., *PNAS*, 2016)。

アカパンカビにおいて RIP が発動する生殖期は、光から守る重厚にメラニン化された子嚢殻 (Perithecium) を形成するため、顕微鏡を用いた細胞生物学的解析が限られている。一方、メラニン化合成遺伝子 *per-1* を欠損させると、メラニン化されない透明な子嚢殻ができるが、子孫株の単離が困難である (fgsc.net, Neurospora protocol)。そこで、RIP 可視化システム構築を補助する、再現性良く透明な子嚢殻の単離と遺伝子操作を両立させる実験系を確立した。まず *per-1* をアカパンカビで最近利用可能なことがわかった Nourseothricin 耐性遺伝子 *nat1* を用いて、遺伝子欠損させた。この Nourseothricin 耐性は条件検討の結果、既存の薬剤耐性とは異なり、アカパンカビでもっとも利用されているハイグロマイシン耐性と 2 重選択できることがわかった。つまり、上記の蛍光蛋白質をゲノム上に挿入する Knock-in (KI) にはハイグロマイシン耐性遺伝子を利用しているため、別々に用意した任意の蛍光蛋白質 KI 株と *per-1* 欠損株を交配させ、Nourseothricin とハイグロマイシンを両方添加するだけで、両者の形質を持つ子孫株のみを選び出し、親株のコンタミを防ぐことができる。つまり、この単純な操作で、上記の生殖器の細胞生物学的手法の障害を取り除ける。

次に、本 RIP 可視化システム構築の鍵となる特定なゲノム領域へ目的蛋白質を Tethering する技術を実現させるため、iChIP 法 (Fujita & Fujii, *PLoS One*, 2011) で用いられる LexA DNA 結合ドメイン (LexA DB)-LexA operator 配列 (lexAop) システムを採用し、アカパンカビ版に改良した。その結果、アカパンカビにおいては 1 重の lexAop (20 bp) のみでも特定なゲノム領域へ挿入すれば、LexA DB を有する融合蛋白質をその領域へ導くことがわかった。また、LexA DB を融合させても、その蛋白質が持つ機能を阻害することはほとんどなかった (Honda et al, *PNAS*, 2016)。しかし、他生物で一般的であるシグナル増強のために lexAop を繰返して使用すると、アカパンカビが有する他のゲノム防御システムであるヘテロクロマチン化が発動し、この配列へのアクセスが阻害される。この対処法として、天然の異なる 9 つの lexAop を「1ヌクレオソーム長」毎に配置した人工配列をデザインし直した。また、RIP 可視化システムの構築を成功させるための鍵となる適切なプロモーターとして、アカパンカビのテロメア末端にある短い繰返し配列 (約 20 回) を認識する蛋白質群 Shelterin のプロモーターに着目した。そこで、Shelterin の構成蛋白質を上記で最適した蛍光蛋白質とそれぞれ融合させ、観察した結果、その一つの RAP1 がもっとも蛍光シグナルを発することを発見した。そして、この RAP1 プロモーターと新たな人工配列を組合せた形質変換株を作製したが、残念ながら特定な染色体領域を顕微鏡下で生きたまま可視化することはできなかった。そのため、更なる改良を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Klocko AD, Ormsby T, Galazka JM, Leggett N, Uesaka M, Honda S, Freitag M, and Selker EU. Normal chromosome conformation depends on subtelomeric facultative heterochromatin *Neurospora crassa*. *PNAS*. 113(52):15048-15053 (2016), DOI: 10.1073/pnas.1615546113 査読有
2. Honda S, Bicocca VT, Gessaman JD, Rountree MR, Yokoyama A, Yu EY, Selker JM, and Selker EU. Dual chromatin recognition by the histone deacetylase complex HCHC is required for proper DNA methylation in *Neurospora crassa*. *PNAS*. 113 (41), E6135-E6144 (2016) DOI: 10.1073/pnas.1614279113 査読有
3. Galazka JM, Klocko AD, Uesaka M, Honda S, Selker EU, Freitag M. *Neurospora* chromosomes are organized by blocks of

importin alpha-dependent heterochromatin that are largely independent of H3K9me3. *Genome Research*. 26(8):1069-80 (2016), DOI: 10.1101/gr.203182.115 査読有

[学会発表](計 2 件)

1. Uesaka M, Yokoyama A, Lewis ZA and Honda S. Shelterin is required for telomeric integrity in *Neurospora crassa*. Neurospora meeting 2016 at Asilomar, California, USA, March, 12, 2016
2. Uesaka M, Yokoyama A, Lewis ZA and Honda S. Shelterin is required for telomeric integrity in *Neurospora crassa*. EMBO Conference on Telomere, telomerase and disease, Liege, Belgium, April, 27, 2016

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://chromosome.med.lab.u-fukui.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

本田 信治 (HONDA SHINJI)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教
研究者番号: 90632167

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()