

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14998

研究課題名(和文) 遺伝子ノックアウトによる網羅的薬物トランスポーター探索法の開発

研究課題名(英文) Development of a comprehensive drug transporter identification method by gene knockout

研究代表者

楠原 洋之 (Kusuhara, Hiroyuki)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：00302612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ほ乳類細胞でのCRISPR-Cas9システムによる遺伝子発現抑制をトランスポーターの同定ツールとして確立することを目的として研究を行った。ヒト全SLCトランスポーターに対するguide RNAの設計を終え、複数のトランスポーターの同時ノックアウトに成功した。一方でウイルスの作製には成功したものの、発現抑制を確認できなかった遺伝子も存在し、guide RNAの設計方法の改善等が今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research was to establish inhibition of transporter gene expression by CRISPR-Cas9 system in mammalian cells as transporter identification tool. We designed guide RNA for all human SLC transporters and succeeded in simultaneous knockout of multiple transporters. On the other hand, we failed to suppress expression of some genes in the host cells after infection of viruses. Improvements in the design method of guide RNA are future subjects.

研究分野：分子薬物動態学

キーワード：トランスポーター CRISPR-Cas9システム 発現抑制 オーフアントランスポーター

1. 研究開始当初の背景

トランスポーターは薬物を初めとした種々低分子化合物の膜輸送に働き、その基質選択性・輸送能力が薬物の尿・糞中への排泄や、血液脳関門など関門機構を介した透過など組織分布の決定要因となる。正常組織のほか、がん細胞では抗がん剤の細胞内取り込みや排出に働くことで、抗がん剤に対する感受性因子でもあり、さらには、肝特異的胆汁酸トランスポーター(NTCP)が B 型肝炎ウイルスの受容体になる(Yan H et al Elife 1:e00049, 2012)など、本来の“膜輸送”とは異なる役割も解明されている。申請者も含めて、複数の研究グループがトランスポーターを介した膜輸送の特徴である飽和性や阻害を示しながら、未だトランスポーター遺伝子の同定に至っていない薬物の膜透過機構も存在する。このようなトランスポーター分子を解明するためには、効率的かつゲノムワイドな遺伝子ノックアウト法の開発が不可欠である。そこで近年提案された新規ゲノム編集技術である CRISPR-Cas9 システムに着目した。本システムを適用することにより、対象遺伝子の標的配列近傍を切断し、その修復の際に高頻度で変異を導入することができる。その結果、フレームシフトにより対象遺伝子の機能を欠損させることが可能である。またトランスポーターの基質認識には重複が認められることがしばしばあり、単一の遺伝子の欠損ではリダンダンシーによって補完されてしまう可能性がある。そこでレンチウイルスを用いた CRISPR-Cas9 システムを適用することにより、複数のトランスポーターの発現を同時に発現抑制を達成し、対象とする物質輸送の包括的な分子機構同定につながるものと期待される。以上より、本研究では、レンチウイルスにより導入した CRISPR-Cas9 システムを中心として、ゲノムワイドでの網羅的なトランスポータースクリーニングシステム構築することを計画した。

2. 研究の目的

Solute carrier (SLC)トランスポーター、ABCトランスポーター(V-type ATPase)および P-type ATPase に対して、CRISPR-Cas9 システムを用いたレンチウイルスノックアウトライブラリーを構築する。既知遺伝子をすべて対象とした遺伝子ノックアウト法とし、ほ乳類細胞に適用して、薬物輸送能力ならびに抗がん剤などに対する薬剤感受性に関連したトランスポーター遺伝子を同定する。この際、単一のトランスポーターに限ることなく、レンチウイルスを用いた CRISPR-Cas9 システムの適用によりトランスポーターの同時発現抑制が可能かどうかを検証し、着目する事象を制御する分子機構の包括的な理解にも取り組む。

3. 研究の方法

1. sgRNA 配列のデザインとトランスポーター遺伝子ノックアウトライブラリー構築

CRISPR-Cas9 システムに用いる guide RNA の設計を行う。設計には頻用される web サービスである CRISPR direct (<https://crispr.dbcls.jp/>) を用いる。CRISPR-Cas9 システムの導入を 1 つのベクターで可能にするオールインワンベクターに設計した guide RNA を導入する。

2. CRISPR-Cas9 システムによるノックアウト細胞の構築

デザインと平行して、レンチウイルスを用いたノックアウトシステムの作動性を実証するために、当研究室で保有しているほ乳類細胞を宿主細胞としたヒト薬物トランスポーター高発現細胞に適用し、ノックアウトの有効性を検証、並びにノックアウト効率の最適化を行う。

3. トランスポーター遺伝子ノックアウト細胞を用いた薬物動態関連因子ならびに抗がん剤感受性因子の探索

CMEC/D3、HEK293 細胞では、clonidine や nicotine、diphenhydramine や varenicline などカ

チオン性薬物は飽和性を示し、H⁺との交換輸送体の関与が示唆されている（申請者未発表データを含む）。本ライブラリーを適用後、細胞内蓄積量が減少するトランスポーター遺伝子を探索する。

4. 研究成果

本研究では、担体依存的な輸送の存在が示唆されているものの分子機構が不明となっている薬物や内因性物質の輸送担体の同定、および予測されている全トランスポーターのうち2-3割を占める機能が未知となっているオーファントランスポーターの機能同定を目的としている。

(1) guide RNA の設計

CRISPR-Cas9 システムは細菌や古細菌による適応免疫機構を元にしたゲノム編集技術の一つであり、cas9 タンパク質が標的遺伝子中の PAM 配列とこれに隣接した RNA 配列 (guide RNA) とを認識し、標的遺伝子近傍を切断することを利用したものである。そのため初年度はまず、全 SLC トランスポーターの PAM 配列の同定とそれに対応する guide RNA の設計に取り組んだ。設計には頻用される web サービスである CRISPR direct (<https://crispr.dbcls.jp/>) を用いた。設計した guide RNA のうち、機能欠損の確実性をあげるため、比較的遺伝子上流に位置する PAM 配列を標的としたものを選びオリゴヌクレオチドの作製を行った。作製自体は受託サービスを活用し、オリゴヌクレオチドの作製を完了した。

(2) スクリーニングに向けた CRISPR-Cas9 システムの最適化

(2a) 蛍光によるセレクションの検証

Guide RNA の設計およびオリゴヌクレオチドの作製と並行してスクリーニングに向けた CRISPR-Cas9 システムの最適化に取り組んだ。CRISPR-Cas9 システムを特定の細胞に導入するためには、Cas9 タンパク質を発

現する遺伝子と guide RNA との双方を細胞に導入する必要がある。スクリーニング系において false negative を減らすために抑えるために導入効率のばらつきできる限り減らしたい。そこで Cas9 タンパク質と guide RNA を一つのベクターにて同時に導入可能なオールインワンベクターを採用した。オールインワンベクターは現状いくつかのものが購買可能であるが、導入判定・選別の方法論に着目すると大きく二つのタイプに分けられる； GFP などの蛍光を元にセレクションする方法論、 puromycin などの薬剤耐性を元にセレクションする方法論。後者では感染後単一コロニーを取得するまでに時間を要するため、前者のタイプである pL-CRISPR.EFS.GFP を採用した (addgene, #57818)。

(1) で作製した guide RNA のうち、当研究室で内因性に高発現する細胞を既に見出している SLC35F2 および SLC2A6 に着目し、これらを標的とした guide RNA を導入したベクターを用いて実際にレンチウイルスを調整した。当該 SLC35F2 および SLC2A6 の高発現細胞 (それぞれ PC3 細胞、RAW264.7 細胞) に対し調整したレンチウイルスを導入したところ、GFP の発現が確認され、レンチウイルスの調整に成功したことがわかった。一方、レンチウイルスの導入に成功した GFP ポジティブな細胞はほとんどが死滅してしまい、SLC35F2 および SLC2A6 の発現量変化は mRNA レベル・タンパク質レベルとも確認することはできなかった。原因として宿主細胞のウイルスに対する耐性が低かった可能性や、標的とした遺伝子が宿主細胞の生存において重要だった可能性が考えられたが、どちらの細胞もレンチウイルスを導入した報告があり、また SLC35F2 に関してはノックアウトによる細胞死は認められておらずその他の可能性が考えられる。

(2b) 薬剤耐性によるセレクションの検証

前年度までに蛍光によるセレクションの方法論では原因不明の細胞死により運用が難しいことがわかったため、レンチウイルスは100%感染しているという仮定の下、puromycin でセレクションをかけた後の細胞を、単一細胞株にせずそのままポピュレーションの状態で使用することにより解決することを目指した。本法論により PC3 細胞において CRISPR-Cas9 による SLC35F2 のノックアウトが可能であることは既に報告があるため、まずはその検証を行った。Puromycin 耐性によるセレクションを可能とする lenti-CRISPR v2 (addgene, #52961) に対し(1)で作製した SLC35F2 を標的とする guide RNA をサブクローニングし、本ベクターを用いてレンチウイルスの調整、PC3 細胞へのインフェクション、そして puromycin によるセレクションを行った。3 週間ほどの puromycin 暴露の後、セイン損している細胞を、コロニー化することなく、ポピュレーションの状態で解析したところ、対象遺伝子である SLC35F2 の顕著な発現量低下を確認することができた。輸送機能の低下としても確認しており、mRNA レベルおよびタンパク質レベルで、本方法によりトランスポーター機能を探索することが可能であることを確認した。

(3) トランスポーターの同時発現抑制の検証 SLC35F ファミリーに属するトランスポーターはそのほとんどが機能未知なトランスポーターである。(2)で最適化した CRISPR-Cas9 システムによる標的遺伝子の発現抑制が複数のトランスポーターを標的とした際にも同時に達成できるか否かを検証するべく、本ファミリーを対象に解析を行った。既に当研究室で SLC35F2 の発現が確認されていることから、HEK293T 細胞を用いてまず SLC35F ファミリーの発現を検証したところ、SLC35F1、F2、F5 および F6

の発現が認められた。このうち F1、F2 は細胞膜に、F6 はミトコンドリアへの局在が認められた。各トランスポーター遺伝子に対するレンチウイルスを調製し、それぞれ単独あるいは複数のウイルスを感染させた。puromycin 耐性細胞における各トランスポーター遺伝子の発現を real-time PCR 法により確認した。結果、耐性細胞であっても、対象遺伝子の発現低下が認められない場合もあり、また遺伝子によってノックアウト効率が大きく異なった。SLC35F1、F2 に対しては顕著な低下が認められ、かつ同時にノックアウトすることに成功したが、同じ細胞で F5 および F6 に対してはほとんど抑制効果が認められなかった。これらのトランスポーターに対しては guide RNA のデザインの見直しが必要である。F1 および F2 をノックアウトした細胞は順調に増えており、リダンダントなシステムにより機能が補完されている可能性もある。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

望月 達貴、水野 忠快、楠原 洋之
第32回日本薬物動態学会 2016年10月13-15日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠原 洋之 (KUSUHARA, Hiroyuki)
東京大学大学院・薬学系研究科・教授
研究者番号：00302612;

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし