

令和元年6月12日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01931

研究課題名(和文) ゲノム編集技術によるタグ導入を利用した新生タンパク質初期動態観察法の構築

研究課題名(英文) Development of tagged protein imaging during translation and folding steps by using genome editing

研究代表者

野村 渉 (Nomura, Wataru)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：80463909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：タグ-プローブシステムを活用して細胞内の反応をミリ秒単位で観測できる手法を開発することを目的とした。標的タンパク質として膜受容体やヒストンタンパク質を選択して、それぞれにタグ配列と蛍光タンパク質を融合したタンパク質の遺伝子を細胞内に導入した。タンパク質発現、局在変化をmKOの蛍光観察によって確認を行った。翻訳開始コドン直後にタグ配列遺伝子が導入されるようにデザインしてゲノム編集を行った。導入をより効率化するために細胞の薬剤選択を利用する系を構築した。この手法はさまざまな遺伝子をゲノムに導入する際にも適応可能な汎用的手法である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内に存在するタンパク質はその機能自体の解明も重要であるが、細胞の中にどれだけの量が存在し、どこに存在するのか、存在場所は機能とともに変化するか、などを顕微鏡で観察することが必要になる。それを解決する手段として、細胞のゲノムに存在するタンパク質を定義している遺伝子に目印となるタグを付けることで細胞内のタンパク質の絶対量や動きを正確に観察することができる。本研究では独自のタグをゲノムに組み入れる方法を確立することができた。

研究成果の概要(英文)：In this project, a method to observe processes of protein translation, folding, and translocation was developed using our tag-probe system. Membrane receptor and histone protein were chosen as targets and their fusion with fluorescent protein were expressed in cells. Expression and localization of target proteins were observed by fluorescent microscopy. To introduce tag gene after starting codon, guide RNA was designed and genome editing by CRISPR-Cas9 was performed. We have established a method to select cells with drug-resistant marker to increase editing efficiency. The method can widely applied to introduce various gene to genome.

研究分野：生物化学

キーワード：ゲノム編集 蛍光イメージング ペプチド タンパク質 タグ-プローブ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内に存在するタンパク質は翻訳過程からフォールディング過程を経て機能し、さらに分解によって一生を終える。生体高分子や代謝産物などを標的とした蛍光イメージングは非侵襲的に細胞や個体を観察可能なことから、それまで明らかでなかった細胞内イベントを解明することに役立っている。蛍光イメージング技術は発展的に進化しており、より高精度な観察手法の開発に向けて研究が進められている。本研究でもう一つの鍵となるゲノム編集技術ではゲノム上の標的配列をヌクレアーゼによる配列特異的切断によって変異導入されることから、タンパク質のノックアウトに利用される。ここ数年で CRISPR-Cas9 システムが開発され、従来のジंकフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) や TALEN といった技術と比較して研究期間の大幅な短縮が実現されてきている。それと同時にタンパク質のノックアウトだけでなくゲノム上でのタンパク質配列の改変などこれまでとは異なる利用方法の実現が望まれている。本研究で取り組む蛍光イメージング法とゲノム編集技術を組み合わせ、より高性能なタンパク質挙動観察の手法はそれぞれの分野における技術を融合させた新たな取り組みとなる。

2. 研究の目的

本研究ではゲノム編集技術によってゲノム上の標的タンパク質遺伝子にタグ遺伝子を導入してタグ付加した標的タンパク質が遺伝子発現によって生産される細胞を構築する。ゲノム上でコードされたタグ付加型標的タンパク質は発現量が細胞の状態を反映する。また、タグ-プローブの組み合わせに関してヘリックスバンドル形成から蛍光増大が飽和するまでの時間経過をストップフロー法によってミリ秒単位で解析する。タグ配列をタンパク質 N 末端に導入することでタンパク質翻訳過程の初期段階でタグ-プローブペアを形成させることができると考えられる。従って、タグ-プローブペア形成による蛍光を追跡することで細胞質におけるタンパク質翻訳の過程からタンパク質特有の細胞内局在までの過程を経時的に追跡することが可能になる。

3. 研究の方法

3 年間の研究期間中に細胞質環境において翻訳を受けるタンパク質の合成から局在変化までを捉えることのできる仕組みを構築する。これまでに開発してきたタグ-プローブシステムについては速度論的解析を進め、蛍光増大による観察が可能な時間を詳細に明らかにする。また、恒常状態でのタンパク質発現を反映させるためにゲノム編集技術を用いてゲノム上の標的タンパク質遺伝子に直接タグ配列を導入する手法を確立する。これによって細胞内タンパク質に関する真の動態解明を目標とする。細胞内におけるタンパク質新生から局在化までをタイムラプス観測する技術としてヘリックスバンドル型タグ-プローブシステムを利用する。ペプチド合成で作製したタグ、プローブペプチドを用いてストップフロー法により蛍光増大に要する時間をミリ秒単位で測定する。タンパク質翻訳過程から局在化までを追跡するために tet-on プロモーターをもつプラスミドを用いて細胞内で観察を行う。次の段階ではゲノム編集技術 (CRISPR-Cas9 システム) を利用して両アレルの標的タンパク質遺伝子 N 末端部位にタグ遺伝子を導入した細胞を樹立する。1-ピレンブチレートで細胞を前処理して効率的にプローブを細胞に導入する。蛍光観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いる。観察に必要な蛍光強度が不足する場合は導入するタグ配列をリピート化する。プローブ添加後に生成するタンパク質を追跡するために翻訳開始阻害剤で細胞を処理する方法について条件を最適化する。

4. 研究成果

蛍光イメージング技術はより高精度な観察手法の開発に向かっていく。ヘリックスバンドル型タグ-プローブシステムは会合に伴う蛍光増大が観察されるため、細胞内の反応をミリ秒単位で観測することが出来ると期待される。本研究ではゲノム上の標的タンパク質遺伝子にタグ遺伝子を導入して、恒常的なタンパク質発現という条件下での観察手法を開発する。この手法では、会合後にミリ秒単位以内で蛍光が増大するタグ-プローブシステムにより、タンパク質の翻訳過程から局在部位への移動までを高精度に追跡できると考えられる。細胞内におけるタンパク質新生から局在化までをタイムラプス観測する技術としてヘリックスバンドル型タグ-プローブシステムを利用する。初年度ではペプチド合成で作製したタグ、プローブペプチドを用いてストップフロー法により蛍光増大に要する時間をミリ秒単位で測定する。タンパク質翻訳過程から局在化までを追跡するために tet-on プロモーターをもつプラスミドを用いて細胞内で観察を行う計画を立てた。ストップフロー装置を利用した蛍光強度変化の測定ではプローブ溶液とタグ溶液の混合と同時に蛍光強度の変化

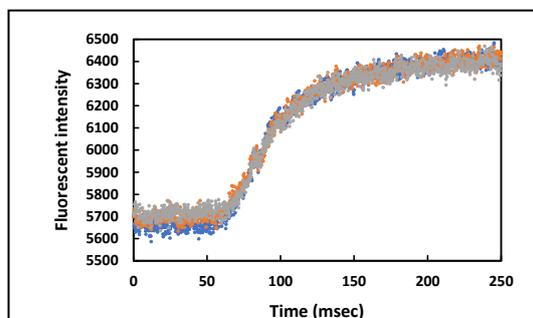


図 1. ストップフローを利用したタグ-プローブ形成速度の定量について 0.5 μ M プローブ in HEPES buffer (pH 7.2, 100 mM NaCl), 0.5 μ M タグ in HEPES buffer (pH 7.2, 100 mM NaCl)を混合し、時間経過による蛍光の増大を測定した。

を追跡した。その結果 100~200 ミリ秒以内での蛍光強度の飽和が観察された (図 1)。

従って、当初予測していた通り、非常に早い反応を追跡する蛍光プローブとして利用することが可能であると判断された。また、tet-on システムで利用するタンパク質発現ベクターの構築も計画通りに行い、GPCR である CXCR4、プロテインキナーゼ C (PKC)、ヒストンタンパク質 H2B に赤色蛍光タンパク質 mKO を融合したマーカータンパク質の発現について検討を行った (図 2)。

H2B-mKO において最も効率的に蛍光を検出でき、時間経過による局在変化も明確に検出できることが明らかになった (図 3)。また、同じ系を利用してタグプローブによる観察も可能であることを確認した (図 4)。

以上のことより、H2B の発現・局在が明確に観察されたことから、以降の研究は H2B を中心に利用することとした。

ゲノム上での H2B コード配列に対してタグ遺伝子をゲノム編集を利用して導入するために CRISPR-Cas の sgRNA を構築し、変異導入効率について検討を行った。標的タンパク質 (H2B) 遺伝子のためのガイド RNA (gRNA) およびドナーテンプレートを翻訳開始コドン直後にタグ配列遺伝子が導入されるようにデザインして構築した。ゲノム上への導入は CRISPR-Cas9 によるゲノム編集で行ったが、HCT116 細胞を利用した場合、ゲノム編集効率は平均して 5% 程度と低いため、293 細胞を利用することにした。これにより、効率的なドナー遺伝子の導入が行えるようになった。さらにドナー遺伝子の導入をより効率化するために、ハイグロマイシン耐性遺伝子を同時に導入し、細胞の薬剤選択後に Cre リコンビナーゼを利用してマーカー遺伝子を除去する系を構築した。これによりシングルセル化したタグ導入細胞を得ることができた。この手法はさまざまな遺伝子をゲノムに導入する際にも適応可能な汎用的手法である。

一方でタグ配列に二本鎖ヘリックスを利用してきたが、小型化を図るためにタグ配列に一本鎖ヘリックスを利用することを検討した。この方法ではタグプローブ形成によって得られる蛍光が十分でない場合に標的タンパク質にヘリックスの繰り返し配列を導入することでタンパク質当りの蛍光量を増強することができると考えられる。二本鎖ヘリックス側に環境応答性蛍光基を導入した場合に、バックグラウンド蛍光の増大が観察されたが、タグプローブ形成速度などへの影響はなく、タグ配列の小型化が必要な場合に利用できるシステムであることが確認された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

1. **Nomura W***, Matsumoto D, Sugii T, Kobayakawa T, Tamamura H Efficient and Orthogonal Transcription Regulation by Chemically Inducible Artificial Transcription Factors. *Biochemistry* 57, 6452-6459, 2018. DOI: DOI: 10.1021/acs.biochem.8b00741.
2. Toyama K, Kobayakawa T, **Nomura W**, Tamamura H* Inhibition of EGFR Activation by Bivalent Ligands Based on a Cyclic Peptide Mimicking the Dimerization Arm Structure of EGFR. *Chem. Pharm. Bull.* 66, 1083-1089, 2018. DOI: 10.1248/cpb.c18-00539.
3. **野村 渉***: 「ゲノム編集がもたらす蛍光バイオイメージングの革新」 Precision Medicine 10 月創刊号 「研究者の最新動向」 1, 80-85, 2018. DOI: なし
4. **Nomura W*** Development of Toolboxes for Precision Genome/Epigenome Editing and Imaging of Epigenetics. *The Chemical Records* 12; 1717-1726, 2018. DOI: 10.1002/tcr.201800036.
5. Toyama K, **Nomura W**, Kobayakawa T, Tamamura H*. Delivery of a Pro-apoptotic Peptide to EGFR-positive Cancer Cells by a Cyclic Peptide Mimicking the Dimerization Arm Structure of EGFR. *Bioconjugate Chem.* 29, 2050-2057, 2018. DOI: 10.1021/acs.bioconjugchem.8b00250.

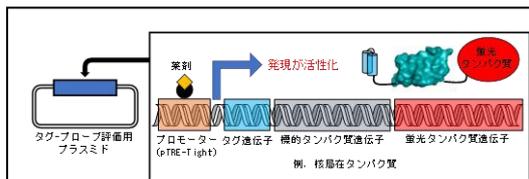


図 2. タグ配列を有する標的タンパク質の観察手法について

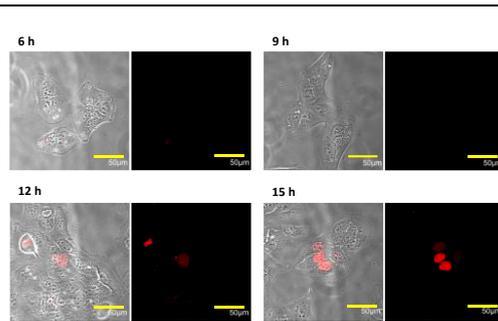


図 3. tet-on を利用した H2B 発現の観察について Dox 添加後、12 時間で発現が見られ始め 15 時間後には核への局在が完了していることが確認された。

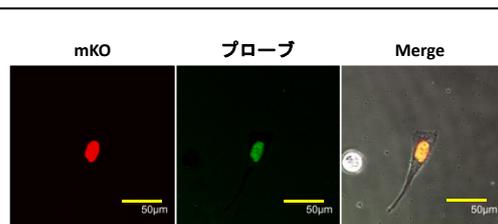


図 4. tet-on プロモーターを利用した H2B-mKO 発現のタグプローブによる観察について

6. Sakyamah MM, Kobayakawa T, Fujino M, Konno M, Narumi T, Tanaka T, **Nomura W**, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H* Design, synthesis and biological evaluation of low molecular weight CXCR4 ligands. *Bioorg Med Chem.* 27, 1130-1138, 2019. DOI: 10.1016/j.bmc.2019.02.013.
7. Matsuda K, Kobayakawa T, Tsuchiya K, Hattori S, **Nomura W**, Gatanaga H, Yoshimura K, Oka S, Endo Y, Tamamura H, Mitsuya H, Maeda K* Benzolactam-related compounds promote apoptosis of HIV-infected human cells via protein kinase C-induced HIV latency reversal. *J. Biol. Chem.* 294, 116-129, 2019. DOI: 10.1074/jbc.RA118.005798.
8. Kobayakawa T, Matsuzaki Y, Hozumi K, **Nomura W**, Nomizu M, Tamamura H*. Synthesis of a Chloroalkene Dipeptide Isostere-Containing Peptidomimetic and Its Biological Application. *ACS Med. Chem. Lett.*, 9, 6-10, 2018. DOI: 10.1021/acsmchemlett.7b00234.
9. Ohashi N, Kobayashi R, **Nomura W**, Kobayakawa T, Czikora A, Herold B, Lewin N, Blumberg PM, Tamamura H*. Synthesis and Evaluation of Dimeric Derivatives of Diacylglycerol-lactones as PKC Ligands. *Bioconjugate Chem.* 28, 2135-2144, 2017. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00299.
10. Takano H, Narumi T, **Nomura W**, Tamamura H*. Microwave-assisted Synthesis of Azacoumarin Fluorophores and the Fluorescence Characterization. *J. Org. Chem.* 82; 2739-2744, 2017. DOI: 10.1021/acs.joc.6b02656.
11. Tanaka T, Aoki T, **Nomura W**, Tamamura H*. Bivalent 14-mer Peptide Ligands of CXCR4 with Polyproline Linkers with Anti-chemotactic Activity against Jurkat Cells. *J. Pept. Sci.* 23, 574-580, 2017. DOI: 10.1002/psc.2946.
12. Mizuguchi T, Ohashi N, Matsumoto D, Hashimoto C, **Nomura W**, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H*. Development of Anti-HIV Peptides Based on a Viral Capsid Protein. *Biopolymers (Pept. Sci.)* 108, e22920, 2017. DOI: 10.1002/bip.22920
13. **野村 渉***: 「DNAメチル化制御から精密エピゲノム編集へ」 *MEDCHEM NEWS* 27; 200-207, 2017. DOI: なし
14. **野村 渉***: 「生体分子間相互作用を基盤とする機能分子の創製とケミカルバイオロジーへの展開」 *Yakugaku Zasshi* 137; 1223-1231, 2017. DOI: 10.1248/yakushi.17-00125.
15. **野村 渉**, 玉村啓和: 「細胞内タンパク質を可視化するタグ-蛍光プローブシステム」 「*生化学*」 ミニレビュー (日本生化学会, 東京), 89 (1), 115-120, 2017.
16. Toyama K, Mizuguchi T, **Nomura W**, Tamamura H*. Functional Evaluation of Fluorescein-labeled Derivatives of a Peptide Inhibitor of the EGF Receptor Dimerization. *Bioorg. Med. Chem.* 24; 3406-3412, 2016. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.05.026.
17. Ohashi N, Harada S, Mizuguchi T, Irahara Y, Yamada Y, Kotani M, **Nomura W**, Matsushita S, Yoshimura K, Tamamura H*. Small Molecular CD4 Mimics Containing Mono-cyclohexyl Moieties as HIV Entry Inhibitors. *ChemMedChem* 11; 940-946, 2016. DOI: 10.1002/cmdc.201500590.
18. Mizuguchi T, Harada S, Miura T, Ohashi N, Narumi T, Mori H, Irahara Y, Yamada Y, **Nomura W**, Matsushita S, Yoshimura K, Tamamura H*. A Minimally Cytotoxic CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26; 397-400, 2016. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.11.103.
19. **野村 渉**, 玉村啓和: 「多価型CXCR4リガンドの創製とがん細胞イメージング・検出」 医学のあゆみ 第5土曜特集「GPCR研究の最前線2016」 (医歯薬出版株式会社 東京), 256 (5), 430-437, 2016. DOI: なし

[学会発表] (計 27 件)

1. 化合物を用いた直交的な内因性遺伝子制御系の構築, ポスター, **野村 渉**, 松本 大亮, 杉井太亮, 小早川 拓也, 玉村 啓和, 第 12 回バイオ関連化学シンポジウム, 大阪, 2018 年 9 月 10 日, 国内.
2. Fluorogenic and genetically encodable tag-probe system for in-cell imaging of protein synthesis, ポスター, **Nomura W**, Kamimura T, Matsumoto D, Tamamura H, 10th International Peptide Symposium, 東京, 2018 年 12 月 6 日, 国際.
3. 標的タンパク質の動きをみるペプチド性蛍光イメージングツール, 口頭, **野村 渉**, 神村拓美, 森あつみ, 小早川拓也, 玉村啓和, 日本薬学会第 138 年会シンポジウム, 金沢, 2018 年 3 月 28 日, 国内.
4. Development of tools for the modification, regulation, and molecular imaging of gene and epigenetic functions, ポスター, **Nomura W**, Tamamura H, NCU Global Young Investigator Forum 2018, 名古屋, 2018 年 3 月 15 日, 国内.
5. Orthogonal differential regulation of endogenous genes by distinct chemically inducible systems, ポスター, **Nomura W**, Matsumoto D, Sugii T, Kobayakawa T, Tamamura H, 武田薬科学シンポジウム, 吹田, 2018 年 2 月 7 日, 国内.
6. Genome editing with a FokI-based chemically inducible nuclease system, ポスター, Matsumoto D, **Nomura W**, Tamamura H, Keystone Symposia Conference A2: Precision Genome Engineering, Keystone resort CO, USA, 2018 年 1 月 29 日, 国外.
7. Distinct chemically inducible system for orthogonal differential regulation of endogenous genes, ポスター, **Nomura W**, Matsumoto D, Sugii T, Kobayakawa T, Tamamura H, Keystone Symposia Conference A2: Precision Genome Engineering, Keystone resort CO, USA, 2018 年 1 月 29 日, 国

- 外.
8. Differential regulation of endogenous genes in an orthogonal manner by distinct chemically inducible systems, 口頭, Nomura W, Matsumoto D, Sugii T, Kobayakawa T, Tamamura H, International Conference on Epigenetics and Bioengineering, Miami FL, USA, 2017年12月14日, 国外.
 9. Development of genome editing and gene regulation systems utilizing specific DNA binding domains, 口頭, Nomura W, 熊本大学 HIGO program seminar, 2017年9月6日, 国内.
 10. 生体分子間相互作用を制御する機能性ペプチド/タンパク質の設計と応用, 口頭, 野村 渉, 熊本大学先端科学研究部セミナー, 熊本, 2017年9月5日, 国内.
 11. Development of chemical-inducible artificial transcription factors based on sequence-specific DNA binders, 口頭, Nomura W, Matsumoto D, Hashimoto T, Sugii T, Tamamura H, The 254th ACS National Meeting and Exposition, Washington DC, USA, Aug 23, 2018, 国外.
 12. FokI を DNA 切断ドメインとして用いた化合物誘導型配列特異的ヌクレアーゼの開発, ポスター, 松本 大亮, 野村 渉, 杉井 太亮, 玉村 啓和, 日本ケミカルバイオロジー学会第12回年会, 札幌, 2017年6月8日, 国内.
 13. 分割型部位特異的ヌクレアーゼを利用した化合物誘導型ゲノム編集技術の開発, ポスター, 松本 大亮, 野村 渉, 玉村 啓和, 日本化学会 第97春季年会. 横浜, 2017年3月19日, 国内.
 14. Chemical-inducible artificial transcription factors based on sequence-specificity of TALE and dCas9, ポスター, Nomura W, Sugii T, Tamamura H, 2017 Keystone Symposia Conference A2: Precision Genome Engineering, Breckenridge, USA, Jan 10, 2017, 国外.
 15. Controllable genome editing by chemically inducible split site-specific nucleases, ポスター, Matsumoto D, Nomura W, Tamamura H, 2017 Keystone Symposia Conference A2: Precision Genome Engineering, Breckenridge, USA, Jan 10, 2017, 国外.
 16. 化合物による誘導が可能な分割型人工ヌクレアーゼの構築とその評価, ポスター, 松本 大亮, 野村 渉, 玉村 啓和, 第39回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016年12月1日, 国内.
 17. 化学誘導二量体形成法を応用したゲノム編集ツールの開発, ポスター, 松本 大亮, 野村 渉, 玉村 啓和, 「細胞を創る」研究会 9.0, 東京, 2016年11月21日, 国内.
 18. 末端架橋型 ZIP タグプローブペアの創製, 口頭, 斉藤 歩, 大橋 南美, 野村 渉, 玉村 啓和, 第60回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2016年9月17日, 国内.
 19. 生体分子間相互作用を基盤とする機能分子の創製とケミカルバイオロジーへの展開, 口頭, 野村 渉, 第60回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2016年9月17日, 国内.
 20. TALE および dCas9 を利用した化合物による標的遺伝子特異的な転写活性制御技術, 口頭, 野村 渉, 杉井 太亮, 玉村 啓和, 第10回 バイオ関連化学シンポジウム, 金沢, 2016年9月7日, 国内.
 21. 化合物による制御可能なゲノム編集を目指した分割型人工ヌクレアーゼの構築, ポスター, 松本 大亮, 野村 渉, 玉村 啓和, 第10回 バイオ関連化学シンポジウム, 金沢, 2016年9月7日, 国内.
 22. 分割型人工ヌクレアーゼを用いた化合物誘導型ゲノム編集系の構築, 口頭, 松本 大亮, 野村 渉, 玉村 啓和, 第48回若手ペプチド夏の勉強会, 八王子, 2016年8月1日, 国内.
 23. Protein dynamics imaging using tag-probe systems, 口頭, Nomura W, Ohashi N, Tamamura H, The 14th Chinese International Peptide Symposium & the 5th Asia-Pacific International Peptide Symposium, Nanjing, China, Jul 6, 2016, 国外.
 24. ケミカルツールを利用した遺伝子発現調節機構の構築と応用, 松本 大亮, 野村 渉, 杉井 太亮, 玉村 啓和, 創薬懇話会 2016 in 蓼科, 蓼科, 2016年6月30日, 国内.
 25. Construction of gene regulation system utilizing chemical tools, 口頭, 野村 渉, 杉井 太亮, 玉村 啓和, 日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会, 京都, 2016年6月15日, 国内.
 26. Chemically-inducible gene regulation system utilizing sequence-specificity of TALE and dCas9, 口頭, Nomura W, Sugii T, Tamamura H, FASEB SRC: Genome Engineering: Cutting-Edge Research and Applications, Lisbon, Portugal, Jun 8, 2016, 国外.
 27. Tag-probe systems for protein dynamics imaging, 口頭, Nomura W, Ohashi N, Tamamura H, The 16th Akabori Conference: Japanese-German Symposium on Peptide Science, Kobe, Japan, May 24, 2016, 国外.

[その他]

ホームページ等

https://www.hiroshima-u.ac.jp/pharm/research/lab/Genome_and_Biomolecular_Engineering_for_Drug_Discovery

6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。