

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07245

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を利用した神経分化関連転写因子MIBP1の機能解析

研究課題名(英文) Characterization of the biological functions of the neuronal transcription factor MIBP1 using genome editing

研究代表者

田平 知子 (Tomoko, Tahira)

金城学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：50155230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：MIBP1(HIVEP2)遺伝子はDNA結合能をもつ約270kDaの転写調節因子をコードしている。同遺伝子は脳機能の成熟に関わっていると考えられ、その機能喪失変異が知的障害の原因となっている症例も報告されている。MIBP1タンパク質が結合するDNA配列を解明する目的で、種々の細胞の内在性MIBP1遺伝子にゲノム編集によりFLAGタグ配列を挿入した。HCT116細胞から作製したM15細胞では野生型のアレルとゲノム編集したアレルの両方からのmRNA発現がTNF- $\alpha$ により誘導され、タンパク質の発現も同様に誘導されることが明らかになった。一方、ゲノム編集の影響としてmRNAの安定性の変化が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、転写因子をコードする内在性MIBP1遺伝子に対してゲノム編集によりエピトープタグ配列を導入することで、タグ配列に対する抗体を用いて高感度にタンパク質の解析を行うことが可能となった。これは抗体の品質によってはタンパク質解析の結果の再現性が得られない問題を解決するものである。本研究により、MIBP1タンパク質の発現が炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ により上昇することが明らかになった。一方、ゲノム編集で本来なかった配列を挿入したことによりmRNAの安定性が変化するという副次的な影響もあることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The MIBP1 (HIVEP2) gene encodes a 270 kDa protein that acts as a transcription factor, by binding to specific DNA sequences. Loss of function mutations in the MIBP1 gene have been associated with intellectual disabilities, suggesting that MIBP1 is crucial for proper brain development and function.

To identify target genes for transcriptional regulation by MIBP1 protein, we tried to insert FLAG-tag sequence to endogenous MIBP1 gene by genome editing of various cell lines. One of established cell lines, M15, which is derived from HCT116 colon cancer cells have both wild type and edited allele. MIBP1 expression was induced immediately after TNF-alpha treatment from the edited allele as well as the wild type allele. Increased mRNA expression was accompanied by enhanced expression of FLAG-tagged MIBP1 protein. As a result of genome editing, changes in mRNA stability were observed.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写因子 ゲノム編集

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

MIBP1 タンパク質は全長 2446 アミノ酸からなり、N 末端側と C 末端側の 2 か所にダブル Zn フィンガーからなる DNA 結合配列をもつ巨大転写因子である。結合する DNA 配列は NF- $\kappa$ B 認識配列と類似であるという報告以外に、TC リッチな配列であるという報告もあり、報告により結合配列に違いが見られ不明な点が多い。

MIBP1(別名 HIVEP2、Schnurri-2)をノックアウトすると、マウスにおいて免疫細胞の分化の異常や、行動異常が起きることが国内外の研究者によって明らかにされてきた。また、最近のエクソーム解析により知的障害の患者においてこの遺伝子の *de novo* 変異がまれに検出され、ハプロ不全による発症機構が考えられている。我々は、MIBP1 が胎児脳の分裂を終えた神経細胞で発現が高いことを見出しており、脳での神経分化に MIBP1 が重要な機能を果たしていると予想した。しかし、転写因子として、このタンパク質がどのような遺伝子の発現調節に関わっているかについて分子的機構はほとんどわかっていなかった。

転写因子の結合配列をゲノムワイドに検出する方法として、米国の Mendenhall らにより開発された CETCh-seq (CRISPR Epitope Tagged CHIP-seq, Savic *et al.* Genome Res. 2015)と呼ばれる方法がある。これはゲノム編集により転写因子にエピトープタグを挿入し、そのタグに対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降-超並列シーケンス (CHIP-seq) によりその転写因子の結合配列を網羅的に同定する手法である。CHIP-seq 解析において、抗体の品質あるいは抗原認識部位によっては実験結果の再現性が得られないという問題を解決するために開発された CETCh-seq 法は国際 ENCODE 計画においても利用されている。本研究の対象としている MIBP1 タンパク質についても適切な抗体は市販されていなかったため、この手法を利用して MIBP1 タンパク質の転写因子としての機能を解析することを考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、ゲノム編集を利用して培養細胞の内在性 MIBP1 タンパク質に 3xFLAG タグを付加することにより、MIBP1 タンパク質の発現を抗 FLAG 抗体により高感度に検出することができる実験系を確立する。これにより、どのような条件で MIBP1 タンパク質の発現が誘導されるのか、またその細胞内局在がどう変化するかを検出することが可能になる。さらに MIBP1 が発現誘導された細胞を用いて、転写調節の標的遺伝子群を見出すことを目指す。MIBP1 タンパク質の機能を解明することにより、ヒトの脳機能の成熟において MIBP1 遺伝子が果たす役割を明らかにし、MIBP1 機能不全が引き起こす病態を解明する手がかりを得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

ゲノム編集により転写因子 MIBP1 (HIVEP2) の C 末端に FLAG タグ配列をノックインした方法の概略を図 1 に示す。MIBP1 遺伝子の終止コドン付近の非翻訳領域で DNA 二本鎖を Cas9 により切断し、相同組換え修復によってカセット配列を組み込む。それにより、MIBP1 の終止コドンの代わりに FLAG-P2A-NeoR をコードする mRNA が発現する。翻訳の段階で P2A の部分でペプチドが切断され、FLAG タグのついた MIBP1 タンパク質と抗生物質 G418 を分解するアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼが同時に発現される。これによりゲノム編集された細胞は G418 耐性になるので薬剤耐性をマーカーとして選択できる。

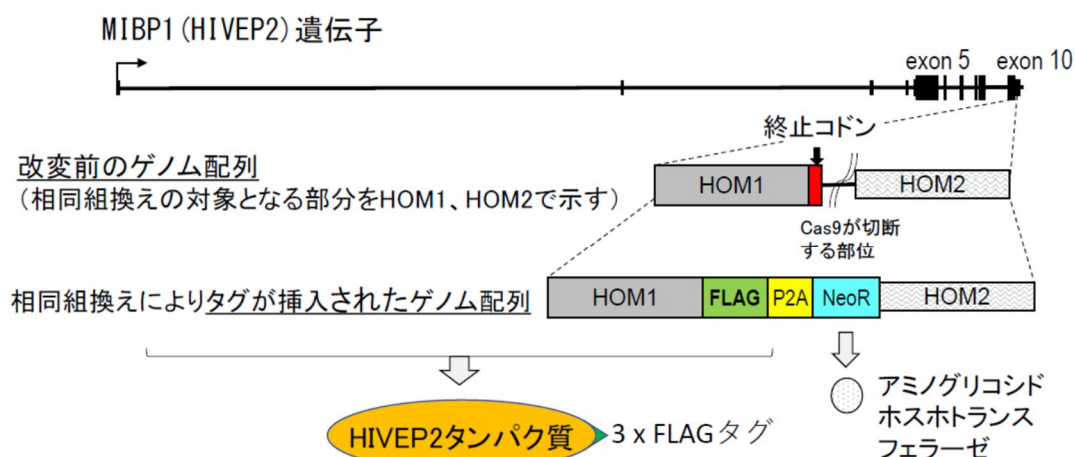


図 1 MIBP1 遺伝子のゲノム編集による FLAG タグ配列のノックインの模式図  
FLAG と表記された部分には、リンカー配列と 3xFLAG タグ配列がコードされている。

この実験を行うための CRISPR ガイド RNA および Cas9 を発現するためのプラスミド (PX458; Feng Zhang 博士より提供) およびエピトープタグ挿入用ドナープラスミド (pFETCh\_Donor; Eric M. Mendenhall 博士より提供) は AddGene より入手した。PX458 に Cas9 のターゲット配列として MIBP1 遺伝子終止コドン近辺の配列を挿入し、ガイド RNA として発現されるようにした。pFETCh\_Donor は図 1 の FLAG-P2A-NeoR からなるカセット配列を持つプラスミドであるが、そのカセット配列の両側に HOM1 および HOM2 で示されるホモロジーアーム配列を挿入した。これらは相同組換えを起こさせるために必要な配列で、本研究では MIBP1 遺伝子の終止コドン周辺のそれぞれ約 1 kb の配列を用いた。これらの配列を、ヒト HT1080 細胞の DNA から PCR により増幅し、シーケンス解析により配列を確認し、In-Fusion クローニングによって pFETCh\_Donor プラスミドに挿入した。

作製したこれら 2 種類のプラスミドをリポフェクション法により培養細胞に導入した。G418 に対し薬剤耐性を示すクローンを選択し、その細胞から DNA を精製して PCR 法で解析することにより相同組換えを起こして目的のゲノム編集が行われた細胞を選別した。これらの細胞を用いて、タグのついた MIBP1 mRNA およびタンパク質の発現を解析した。

#### 4. 研究成果

ゲノム編集を行うために作製した 2 種類のプラスミド (CRISPR ガイド RNA および Cas9 を発現するプラスミド、エピトープタグ挿入用ドナープラスミド) を培養細胞 (HT1080 線維肉腫細胞、HCT116 大腸がん由来細胞、HEK293 細胞) に導入し、薬剤耐性により選択したクローンを PCR およびシーケンス解析することにより、MIBP1 遺伝子の末端に相同組換えにより FLAG 配列がノックインされたクローンを選別した。ここでまず HT1080 細胞を用いたのは我々のグループの先行研究により内在性 MIBP1 遺伝子の発現を検出していたためであるが、さらにゲノム編集による相同組換えが起きやすいことが報告されている HCT116 細胞を改変し、HCT116-M15 と名付けたクローンを得た。両方の細胞株はほぼ 2 倍体であるとされているが片側のアレルにのみ FLAG タグのノックインが検出された。それらの細胞をウエスタンブロット解析することにより、全長約 270 kD の MIBP1-FLAG 融合タンパク質の発現を確認した。最終年度には、さらに HEK293 細胞のゲノム編集も行った。これはヒト胎児の腎細胞に アデノウイルス 5 を切断した DNA を導入することにより作製された細胞であるが、未成熟の神経細胞の性質を持つことと内在性 MIBP1 遺伝子の発現が HT1080 細胞より高い点に着目しゲノム編集の対象とした。HEK293 細胞からは相同組換えを起こしたクローンが 4 つ得られたが、そのうち 2 つでは全長 MIBP1 タンパク質に加えてそれよりサイズの小さいバンドも検出され、意図しないゲノム編集が起こっている可能性があった。残りの 2 クローン (2C3、2D8) では全長 MIBP1 タンパク質のみが検出された。ただ、HEK293 細胞は染色体数が 2 倍体より多いため、染色体異常の可能性も考慮しながら解析を進めている。

MIBP1 の mRNA 発現は HCT116 細胞を炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  で処理することにより上昇するが、ゲノム編集された HCT116-M15 細胞において MIBP1-FLAG mRNA 発現も同処理により上昇した。このことから、一連のゲノム編集操作後もこの細胞で MIBP1 遺伝子発現調節機構が維持されていると考えられた。TNF- $\alpha$  処理をした細胞と処理していない細胞を核画分と細胞質に分画し、ウエスタンブロットにより解析した。TNF- $\alpha$  処理により、転写因子である NF- $\kappa$ B については核への移行が確認できた。MIBP1 タンパク質の発現は処理の有無にかかわらず核画分と細胞質の両方で認められ、いずれにおいても上昇した。このことから TNF- $\alpha$  処理は MIBP1 タンパク質の発現レベルは上げるものの核移行には影響しないと考えられた。

抗 FLAG 抗体をもちいて MIBP1-FLAG 融合タンパク質を免疫沈降すると、O 結合型 -N-アセチルグルコサミン転移酵素 (OGT) が共沈し、これまでラット MIBP1 cDNA 過剰発現の系で見出した MIBP1 タンパク質と OGT との相互作用 (Iwashita et al. J. Biol. Chem. 2012) が確認できた。一方、本来の目的としていた ChIP-seq に関しては今のところ確実なデータは得られておらず、今後も検討を重ねていく予定である。

ゲノム編集が遺伝子発現に及ぼす影響として、M15 細胞で 3'-非翻訳配列 (UTR) に外来配列が挿入されることにより、MIBP1 mRNA の分解が抑制されることも見出した。MIBP1 mRNA は半減期が短い mRNA であるが、その分解の制御に 3'-UTR が重要な役割を担っていることが示唆された。

最近の報告で MIBP1 (HIVEP2) タンパク質がドーパミン輸送体遺伝子である SLC6A3 のプロモーターに結合するという報告もあるため、ドーパミンニューロンの分化モデルとして使われるヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞における MIBP1 の発現解析を行った。この細胞をレチノイン酸で処理すると 1 日後に MIBP1 mRNA およびタンパク質の発現が顕著に上昇することを見出した。SH-SY5Y 細胞は HEK293 細胞などと比較すると著しく遺伝子導入効率が低いこともありゲノム編集はできていないが、この細胞を用いた MIBP1 遺伝子の機能の解析も今後行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyazawa Daisuke, Lee Yeonjoo, Tsuchiya Mao, Tahira Tomoko, Mizutani Hideki, Ohara Naoki	4. 巻 45
2. 論文標題 Docosahexaenoic Acid Increases Vesicular Glutamate Transporter 2 Protein Levels in Differentiated NG108-15 Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1385 ~ 1388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00132	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizutani H, Shiga C, Imai M, Ikemura K, Kitamura Y, Ohta K, Miyazawa D, Sakanashi M, Tahira T, Maeda T, Hiraku Y, Kawanishi S.	4. 巻 40
2. 論文標題 Idarubicin, an Anthracycline, Induces Oxidative DNA Damage in the Presence of Copper (II).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5399-5404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.14548	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本蒼、中川朱里、米田幸香、川原侑奈、須田櫻、高田真衣、夏目佳乃、水谷百合江、山本真菜、宮澤大介、田平知子
2. 発表標題 脳神経機能に關与するHIVEP2遺伝子の転写および転写後調節の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮澤大介、李妍周、土屋茉央、田平知子、水谷秀樹、大原直樹
2. 発表標題 ドコサヘキサエン酸が分化誘導下NG108-15細胞の小胞グルタミン酸トランスポータータンパク質発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田平知子、関川万里子、曾根実里、北村真央、丹羽夏希、宮澤大介、林健志
2. 発表標題 ゲノム編集によりFLAGタグを付加したHIVEP2タンパク質の発現解析
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮澤大介、李妍周、土屋茉央、北森一哉、水谷秀樹、田平知子、大原直樹
2. 発表標題 ドコサヘキサエンがNG108-15細胞のシナプス小胞関連タンパク質に及ぼす影響
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野友理香、横井直芽、小西紗矢、紅露友梨樺、宮澤大介、林健志、田平知子
2. 発表標題 ゲノム編集技術を利用した転写因子MIBP1の機能解析
3. 学会等名 第31回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井直芽、小野友理香、小西紗矢、紅露友梨樺、宮澤大介、林健志、田平知子
2. 発表標題 ゲノム編集技術を利用した転写因子MIBP1の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田有希、中野貴恵、明村あられ、杉沢奏音、小栗帆乃香、宮澤大介、林 健志、田平知子
2. 発表標題 ゲノム編集技術を利用した転写因子MIBP1の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	林 健志  (HAYASHI KENSHI)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------