

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07416

研究課題名(和文) 発生分化における遺伝子の核内配置と転写の動的挙動の解析

研究課題名(英文) The spatial nuclear arrangement and dynamics of transcription

研究代表者

村本 哲哉 (MURAMOTO, Tetsuya)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：10612575

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)：発生分化過程で遺伝子の転写がオン・オフを繰り返す様子を可視化できる細胞性粘菌において、CRISPR/Cas9技術を応用した遺伝子の核内配置を同時イメージングする技術の確立を目指した。はじめにtRNAの内在性プロモーターを利用したsgRNAの高発現ベクターを作製することで、効率よくゲノム編集可能なシステムを構築した。そこでこの発現系をもとに、ヌクレアーゼ活性を消失させたdCas9や輝点を増強する目的のSunTagを併用することで遺伝子の核内配置の可視化を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個体レベルの形づくりでは精密な制御が知られている一方、同一の機能体を構成する細胞においては多様で不均一な細胞動態が観察されている。このような個々の細胞の振る舞いの違いや精密な多細胞体構築を理解するためには、細胞内動態を細胞集団でとらえる技術の構築が欠かせない。今回の成果は、多細胞体構築の基本原則といった発生生物学の重要な課題の理解につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish a technique for simultaneously imaging the nuclear localisation of a target gene using Dictyostelium that can visualise newly synthesised RNAs during cell differentiation. First, we constructed an efficient genome-editing system by creating high expression vectors of sgRNA using the endogenous promoter of tRNA. Next, based on this expression system, we combined it with dCas9, which abolishes nuclease activity, and SunTag, which aims to highlight the bright spots, to visualise the nuclear arrangement of the gene.

研究分野：発生生物学

キーワード：CRISPR 遺伝子発現動態 ライブイメージング Cas9 Nickase

1. 研究開始当初の背景

生き物のからだを形成する組織や器官は、最小の機能単位である細胞によって構築されている。近年の解析技術の進歩により同一の機能体を構成する細胞集団であったとしても、多様で不均一な細胞動態が観察されている。胚性幹細胞 (ES 細胞) では、同一の条件下で培養しているにも関わらず、その細胞間で mRNA やタンパク質の量の不均一性が観察されるほか、がん細胞は抗がん剤に対する感受性の違いがみられ、がん治療を困難にする要因となっている。このように不均一な振る舞いを示す細胞集団という特徴がさまざまな場面で観察される反面、個体レベルの形作りは精密に制御されており、不均一性をとらえた上で多細胞体構築原理を理解することは発生生物学の重要な課題の一つである。

細胞の不均一性が生じる要因の一つは、細胞の性質を規定する遺伝子発現、特に遺伝情報が読み出される段階で生じている。私は発生分化のモデル生物である細胞性粘菌を用い、生細胞内で起こる遺伝子の転写がオン・オフを繰り返す様子を長時間可視化するシステムを構築することで、転写が不規則な間隔で活性化する転写バーストという現象や細胞ごとに不均一であることを見出してきた。

2. 研究の目的

DNA 分子から遺伝情報が読み出される段階では、時々刻々と変化するクロマチン構造や遺伝子の核内配置などが影響していると考えられている。遺伝子の活性化に際して、その遺伝子が核内の遺伝子発現の「場」に入る例も知られており、こういったクロマチン動態が転写活性の不均一性を引き起こす要因となっているとも考えられる。しかし、生細胞内でクロマチンの動的変化と遺伝子発現動態の関係を明らかにする計測技術や解析技術が不十分であるため、クロマチン動態と転写活性の不均一性への関与は十分に理解されていない。転写の様子を可視化するシステムに加え、遺伝子の核内配置の変化をとらえる技術を実現できれば、これらの相関を明らかにできる。そこで本研究では、細胞性粘菌における CRISPR/Cas9 の確立を行い、さらに CRISPR/Cas9 を応用することで遺伝子の核内配置のライブイメージングを実現し、1 細胞レベルでの遺伝子発現動態と同時解析することで、多細胞体構築過程でのクロマチンの動的変化と不均一な振る舞いを示す転写活性化の相関を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 の効率化

核内配置の可視化で利用する CRISPR/Cas9 は、細胞性粘菌における報告がなかった。そこで、Cas9 および sgRNA の発現系を比較検討することで効率よくゲノム編集可能なシステムの構築を行った。

(2) CRISPR/Cas9 の編集正確性の向上

CRISPR/Cas9 は、標的としないゲノム領域が編集されるオフターゲット効果が指摘されている。そこで、野生型 Cas9 に存在する 2 つのヌクレアーゼドメインの片方に変異を入れたニックナーゼを利用することで、正確性の高いゲノム編集システムの構築を行った。

(3) CRISPR/Cas9 を用いた核内配置の可視化

樹立した CRISPR/Cas9 発現系を利用し、ゲノムの可視化を行った。ヌクレアーゼ活性を消失させた dCas9 に GFP を融合させた dCas9-GFP を利用したほか、輝度を増強する目的で SunTag を併用した。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 の効率化

sgRNA の発現系として U6 プロモーターが広く用いられている。そこで、このプロモーター下に sgRNA をつないだコンストラクトを作製して細胞性粘菌に導入したが、高い発現量が確認できなかった。そこで、tRNA やリボザイムを用いた発現系を検討した。tRNA を利用した場合、U6 プロモーターと比較して約 10 倍の発現量が得られたほか、十分な発現量が得られたときに見られる細胞内での Cas9 と sgRNA の複合体形成が観察できた。そこで、sgRNA の発現系として tRNA の内在性プロモーターを利用することにした。この発現系は、一般的な U6 プロモーターで期待される結果が得られていない生物を利用したゲノム編集の際に検討すべき項目であると考えられる。

次に、sgRNA と Cas9 を恒常的に細胞内で発現させることで、ゲノム編集効率を解析した。ここでは、赤色蛍光タンパク質 tdTomato がノックインされている細胞に対し、この配列を標的としたゲノム編集を行った。その結果、99.4%という高効率でゲノム改変による蛍光消失が確認でき、細胞性粘菌における CRISPR/Cas9 システムの構築に成功した。

恒常的な発現系では、継続的な sgRNA と Cas9 の発現により、オフターゲット効果が増大すると考えられた。そこで、一過的に sgRNA と Cas9 を発現する新たなベクターを構築し、オフターゲットを低減しつつ、高効率でのゲノム編集が可能かどうか解析した。このベクターを用いて 2 つの内在遺伝子に対してゲノム編集を試みたところ、一過的な発現にもかかわらず 70%以上の効率でゲノム編集できることが分かった。

このように高効率でゲノム編集できることが分かったことから、さらに複数遺伝子を同時に編集するシステムの構築を行った。複数遺伝子の同時破壊の問題点として、複数の sgRNA をタンデムにつなげることのわずらわしさがある。そこで、Golden Gate Assembly を応用することで、簡便かつ早いクローニングを実現した。この手法を用いて細胞性粘菌内に存在する 5 つすべての PI3 キナーゼ (PI3K) の遺伝子の同時改変を行うコンストラクトを作製した。このコンストラクトを細胞内で一過的に発現させた結果、5 つの遺伝子に変異が起こっていることが確認でき、高効率な複数遺伝子破壊が可能な一過的発現ベクターの構築に成功した。この方法は、通常 1 年以上かかる 5 遺伝子改変の時間を約 1 か月に短縮できる利点がある。

(2) CRISPR/Cas9 の編集正確性の向上

野生型 Cas9 には 2 つのヌクレアーゼドメインが存在することが知られており、この片方に変異を入れることで Cas9 ニッカーゼが得られる。また、標的領域で 2 種類の sgRNA を近傍に位置するように設計することで、別々の鎖にニックを生じさせることができる。標的以外のところで Cas9 ニッケースによって生じるニックは、ほぼ正確に修復される。したがって、特異性や正確性が向上できる。そこで、2 つの sgRNA と Cas9 ニッカーゼを同時に発現させるベクターを構築し、細胞に導入したところ、約 2 kb の欠失を約 20%以上の高効率で生じさせることがわかった。さらに、塩基置換を加えた一本鎖オリゴ DNA を同時に細胞内へ導入することで、高効率で一塩基置換を誘発することに成功した。この方法は、細胞性粘菌のみならずさまざまな生物において、一塩基多型を導入することや修復することも可能になると考えられる。

(3) CRISPR/Cas9 を用いた核内配置の可視化

細胞性粘菌における CRISPR/Cas9 の効率的な系が確立したことから、次に Cas9 のヌクレアーゼ活性を失わせた dCas9 に GFP を融合した dCas9-GFP を用いて標的配列の核内配置の可視化を試みた。理論上 72 分子の GFP が標的配列に結合する設計にしたが、特定の領域を示す輝点は観察されなかった。そこで、SunTag を利用して GFP を集積させることで、24 倍にシグナルを増強させることが可能なシステムを検討した。しかし、核全体に GFP の蛍光が確認されるのみで、核内に輝点を見出すことができなかった。この原因としては、特定ゲノム領域での継続的な Cas9 の結合効率の低さを考えており、標的領域の可視化に必要な GFP が集積できていない可能性があげられる。この可能性を確かめるため、同様の GFP 分子数の集積により輝点が可視化可能かどうか Cas9 を用いない方法で検討した。MS2 リピートを 48 個つなげた RNA をテトラサイクリン誘導発現系により発現誘導させたところ、発現誘導を行った場合のみ細胞質で輝点が観察された。したがって、Cas9 の結合効率が低いことによって、十分な GFP 分子の集積ができていないことにより、ゲノム領域の可視化が困難になっている可能性を考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sekine Ryoya, Kawata Takefumi, Muramoto Tetsuya	4. 巻 8
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 mediated targeting of multiple genes in Dictyostelium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8471
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-26756-z	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 Muramoto Tetsuya, Iriki Hoshie, Watanabe Jun, Kawata Takefumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Recent Advances in CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Dictyostelium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells8010046	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 Iriki Hoshie, Kawata Takefumi, Muramoto Tetsuya	4. 巻 14
2. 論文標題 Generation of deletions and precise point mutations in Dictyostelium discoideum using the CRISPR nickase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0224128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0224128	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19件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村本哲哉
2. 発表標題 多細胞体構築における転写振動の動的解析とその操作
3. 学会等名 第32回モロシヌス研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島根和哉、村本哲哉
2. 発表標題 光遺伝学を用いた多細胞体形成の操作
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 入来星衣、村本哲哉
2. 発表標題 ダブルニックング法を利用した正確な塩基置換の導入
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊倉あこや、菊地亜紀、村本哲哉
2. 発表標題 世代を超えた遺伝子発現の変動が及ぼす発生分化の早期化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島根和哉、前場ゆい、村本哲哉
2. 発表標題 局在変化の可視化に有用な赤色蛍光タンパクの探索
3. 学会等名 第9回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿沼亮太、清水祐季、菊地亜紀、村本哲哉
2. 発表標題 同調的細胞集団でみられる不均一な転写動態
3. 学会等名 第9回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山航平、飯島知之、深澤汐香、渡邊淳、村本哲哉、R.R. Kay、齊藤玉緒
2. 発表標題 細胞性粘菌 <i>Dictyostelium discoideum</i> が生産するハロゲン化有機化合物
3. 学会等名 第9回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 入来星衣、村本哲哉
2. 発表標題 Cas9 Nickase を用いた正確な遺伝子破壊および塩基置換の導入
3. 学会等名 第9回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊淳、関根僚也、村本哲哉
2. 発表標題 CRISPRを用いた全遺伝子破壊コンストラクトの構築
3. 学会等名 第8回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊倉あこや、菊地亜紀、村本哲哉
2. 発表標題 JmjCドメインをもつタンパクが与えるcAMP伝達経路への影響
3. 学会等名 第8回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 入来星衣、伊藤美緒、村本哲哉
2. 発表標題 オフターゲット低減と変異検出の簡便化を目指したCas9 Nickaseの利用
3. 学会等名 第8回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村本哲哉
2. 発表標題 遺伝子機能解析法～相同組換えからゲノム編集まで～
3. 学会等名 第8回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuya Muramoto
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 mediated targeting of multiple genes
3. 学会等名 Annual International Dictyostelium Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊地亜紀、熊倉あこや、村本哲哉
2. 発表標題 1細胞レベルでみるエピジェネティックな継承の解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 関根僚也、村本哲哉
2. 発表標題 CRISPR/Cas9による複数遺伝子の同時改変
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菊地亜紀、熊倉あこや、渡邊淳、村本哲哉
2. 発表標題 転写の安定化が及ぼす多細胞体形成への影響
3. 学会等名 第7回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清水祐季、菊地亜紀、平岡真奈、村本哲哉
2. 発表標題 転写因子GtaCにより律動的な転写動態を示す遺伝子の解析
3. 学会等名 第7回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 船江聡子、岡野由里、渡邊淳、村本哲哉
2. 発表標題 周期的挙動を示すMYB転写因子のライブイメージング解析
3. 学会等名 第7回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村本哲哉
2. 発表標題 1細胞レベルでみられる転写動態の多様性と秩序形成
3. 学会等名 第4回北陸エビジェネティクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2017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