

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：26402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06267

研究課題名(和文) 発生における分化スイッチを担うSoxパートナー因子複合体のin vivo作用機構

研究課題名(英文) In vivo function analysis of Sox-partner factor complexes in cell fate switch

研究代表者

蒲池 雄介 (Kamachi, Yusuke)

高知工科大学・環境理工学群・教授

研究者番号：90263334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： Sox転写因子群は、胚発生過程において様々な組み合わせのSox-パートナー因子複合体をつくり、細胞の分化状態の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、Sox-パートナー因子複合体のin vivoでの解析を進めるため、ゲノム編集を用いたノックインにより、ゼブラフィッシュの内在のSoxならびにパートナー因子に複合タグ配列を付加した。CRISPR-Cas9によるゲノムの切断、それに引き続く長鎖ssDNAドナーを用いた修復を引き起こすことで、sox3、sox11a、pax6a遺伝子への複合タグ配列のノックインが効率的に行えることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPR-Cas9などを用いたゲノム編集による正確なゲノム改変、特に特定のDNA配列の正確な挿入(ノックイン)は効率が低いため、幅広く利用されていない。本研究では、約60アミノ酸からなる複合タグ配列をコードするDNAの正確で効率的なノックインが、長鎖ssDNAドナーを用いることで可能になることを示した。また、タンパク質の機能解析に複数のタグからなる複合タグが有用であることを示した。これらの成果は、タグのノックインを利用することによる遺伝子機能の研究の進展に大きく寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)： The Sox transcription factors are thought to play an important role in regulating cell differentiation states by forming various combinations of Sox-partner factor complexes during embryonic development. By inducing genome cleavage by CRISPR-Cas9 followed by DNA repair using a long ssDNA donor, we were able to efficiently knock-in the composite tag sequences into the sox3, sox11a, and pax6a genes.

研究分野：分子発生生物学

キーワード：ノックイン 複合タグ 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

胚発生過程における細胞の特異化や分化は、複数の転写因子がつくる複合体がスイッチ機能を果たすことによって進行している場合が知られている。Sox 転写因子群は、このような機能を担う複合体を形成する中核因子の一つであり、その代表的な複合体として ES 細胞や iPS 細胞の幹細胞性と密接に関係した Sox2-Oct4 複合体があげられる。胚発生の過程では、様々な組み合わせの Sox-パートナー因子複合体が、異なる分化状態の制御に重要な役割を果たしていると考えられるが、in vivo における複合体の分子構成(組合せ)とそれらの標的配列・標的遺伝子に関しては不明な点が多く残されている。

転写因子複合体の各因子は、相互にパートナー因子を取り替えることで、制御標的遺伝子群が大きく変更され、細胞の分化状態が切り替わる。例えば、Sox2 などの SoxB1 グループ因子(Sox1,-2,-3,-19)の場合は、眼の発生過程では SoxB1-Pax6 複合体を形成し、水晶体の分化に重要な役割を果たす。また、申請者の予備的な実験から SoxB1 と Pax2 の複合体も胚内で活性をもつ可能性がわかった。しかし、実際の胚においてこれらの複合体がどのような配列を標的とし、どのような遺伝子の発現に関わることで分化スイッチとして機能するのかについては未解決の問題として残されている。

2. 研究の目的

本研究は、SoxB1-パートナー因子複合体の in vivo での作用機構を詳細に解析することで、これらの複合体がどのようにして細胞の分化状態を変化させるスイッチとして機能するのかを明らかにすることを最終的な目的とする。これには、まず複合体ごとのゲノムとの相互作用や因子間の相互作用を詳細に調べる必要がある。近年 ChIP-seq 法(クロマチン免疫沈降法とそれに続く次世代型シーケンサーによる DNA 配列の解読)が普及し、個々の転写因子についてはゲノム上での結合部位が判明しつつある。しかし、転写因子に対する ChIP に適用可能な親和性と特異性が高い抗体を得ることは簡単ではない。したがって、本研究課題では、複合タグを開発し、そのタグ配列を SoxB1 ならびにパートナー因子の内在遺伝子へ導入することにより、効率よく ChIP 法を行うことができるとともに、タンパク質間の相互作用の解析が容易になるシステムを確立することを目指す。このためには、まず ChIP 法や相互作用解析を効率よく行える複数のタグと抗体の組み合わせが必要となる。したがって、さまざまなタグを比較検討し、本研究の対象となる転写因子の解析に適した複合タグを開発することを第一の目的とする。さらに、複合タグ配列は、ゲノム編集技術(CRISPR-Cas システム)を用いてゼブラフィッシュゲノム上の目的遺伝子に挿入する必要がある。したがって、複合タグの効率的なノックイン法の確立を第二の目的とする。ノックインラインの樹立と、これらのライン由来の胚を用いた SoxB1-パートナー因子複合体の作用機構の解明を第三の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 胚を材料として ChIP を行うには、効率よく複合体を回収できる手法が重要であると考え、エピトープタグの適用性を検討した。高親和性のモノクローナル抗体(10⁷ 間の差が無く、実験の再現性が高い)が利用できる、ホルムアルデヒド固定の影響が少ない、などを指標として FLAG タグ、HA タグ、V5 タグ、PA タグ、Ty1 タグを候補とした。これらのエピトープタグを含む複合タグを N 末および C 末に付加した転写因子をコードするコンストラクトを作成した。これらをコードする mRNA をゼブラフィッシュ胚へ顕微注入し、タンパク質の発現を調べると共に、試験的な ChIP を行った。

(2) CRISPR-Cas9 システムに基づくゲノム編集技術を用いて、複合タグ配列をゼブラフィッシュゲノム上の目的遺伝子に効率よく挿入する方法を開発した。CRISPR-Cas9 システムとしては、crRNA と tracrRNA の二つの合成 RNA からなる guide RNA と Cas9 タンパク質のリボ核酸タンパク質(RNP)複合体を試験管内で調製して、その複合体をゼブラフィッシュに顕微注入する方法を用いた。まず、挿入部になるべく近い部位で切断可能な guide RNA を探索するため、それぞれの標的部位につき複数の crRNA を設計・合成し、それらの切断効率を調べた。さらに、CRISPR-Cas9 RNP 複合体と複合タグ配列をノックインするための相同組換えドナーを共導入し、ドナーの構造毎のノックイン効率を PCR あるいは qPCR で調べた。

(3) 複合タグ配列がゼブラフィッシュゲノム上の目的遺伝子に挿入されたノックインラインの樹立を行った。CRISPR-Cas9 RNP 複合体と 1 本鎖 DNA ドナーを顕微注入した胚を成魚になるまで育て、次世代に複合タグ配列を伝える F0 ファウンダー魚を同定した。さらに、野生型の成魚と交配し、F1 魚を得た。これらのノックインラインを用いて、タグ配列がタンパク質の検出に利用できるかを確認した。

4. 研究成果

(1) エピトープタグとして FLAG タグ、HA タグ、V5 タグ、PA タグ、Ty1 タグの五つを選び、これらのタグがタンパク質発現に与える影響を調べた。タグは、モノマー、ダイマー、あるいはトライマーとして用いた。これらのエピトープタグを Sox3 の C 末に付加し、ゼブラフィッシュ胚

におけるタグ付きタンパク質の発現をウェスタンブロットで調べたところ、タグの種類と多量体化が発現レベルに影響を与えることがわかった。HA 以外では、タグの多量体化はタンパク質の安定化に寄与する傾向が見られた(図1)。同様の実験を Sox2, Sox19b, Sox11a, Pax6a, Pou2 で行ったところ、いずれの場合も HA の付加はタンパク質の不安定化をもたらした。また、FLAG はどのタンパク質に付加しても不安定化を引き起こすことはなかったが、それ以外のタグは融合するタンパク質による違いが見られた。これらのエピトープタグは、HiBiT タグあるいは His タグを連結した複合タグとして用いたが、HiBiT タグはタンパク質によっては発現レベルの低下をもたらすことがわかった。さらに、エピトープタグの多量体が ChIP へ与える影響を調べたところ、トライマーとして用いた場合の方が効率よくターゲット DNA を回収できることがわかった(図2)。

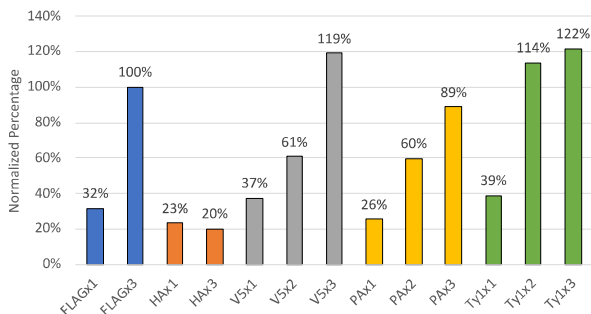


図1. タグを付加したSox3タンパク質の発現レベルの比較

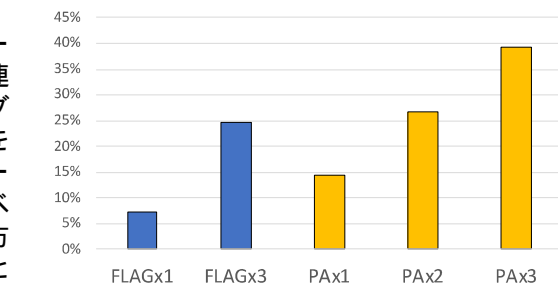


図2. エピトープタグの多量体化がChIP効率へ与える影響

(2) CRISPR-Cas9 システムを用いて、複合タグ配列をゼブラフィッシュゲノム上の目的遺伝子に効率よくノックインするには、切断効率が高い guide RNA が必要になる。そこで、ノックインで複合タグを挿入する部位になるべく近いゲノム領域で複数の crRNA を設計し、それらの切断効率を調べた。CRISPR-Cas9 RNP 複合体を顕微注入した胚からゲノム DNA を回収し、切断部位前後を PCR で増幅し、そのサンガーシーケンスデータを使用して ICE 法で切断率を解析した(図3)。野生型 Cas9 と特異性が高い HiFi Cas9 で調べたところ、半数程度は効率よく標的配列を切断可能であることがわかった。

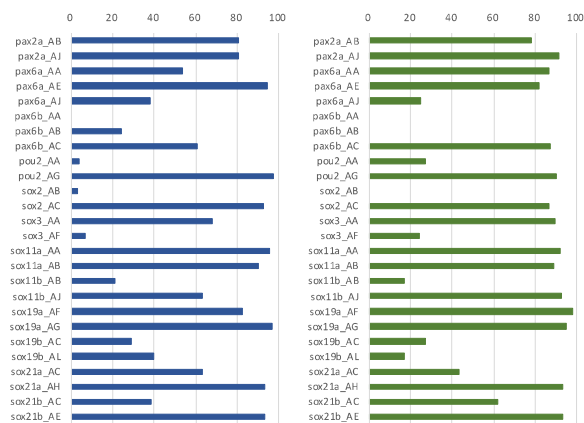


図3. crRNAの切断効率(左, WT Cas9; 右, HiFi Cas9)

(3) 複合タグ配列をノックインするための相同組換えドナーとして、どのような形状の DNA が効率が良いのかを *sox3*, *pax6a*, *sox11a* をターゲットとして調べた。まず、dsDNA 断片、プラスミド DNA, ssDNA の比較を行ったところ、ssDNA を用いた場合に効率よくノックインが起こることがわかった。次に、ssDNA の鎖選択とホモロジー領域の長さの違いがノックインに与える影響を qPCR を用いて定量的に調べたところ、ターゲット遺伝子により影響が異なることがわかった。*sox11a* に関して調べた結果を図4に示す。

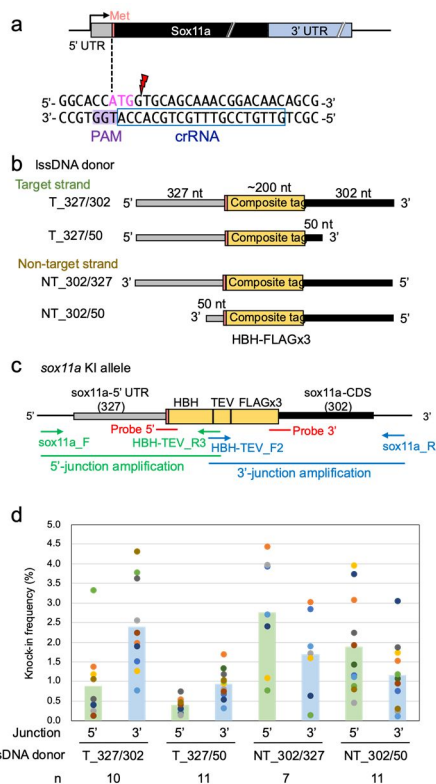


図4. ssDNAドナーの構造がノックインへ与える影響

(4) *sox3*, *pax6a*, *sox11a* に関して CRISPR-Cas9 RNP 複合体と 1 本鎖 DNA ドナーを顕微注入した胚を成魚になるまで育て、次世代に複合タグ配列を伝える F0 ファウンダー魚を同定した。ファウンダー魚が得られる割合は、ターゲット遺伝子、ssDNA ドナー構造により異なっていた。最も効率よく得られたのは *sox3* の場合で、ssDNA によっては 21% という高い値を示した。*pax6a* の場合は相対的に低い効率(約 5%)であったが、これにはノックイン部位と切断部位の距離が影響している可能性が考えられた。ファウンダー魚と野生型の成魚とを交配し F1 魚を得た。*sox3* に関して F1 魚同士を交配し、F2 胚におけるタグ付き Sox3 の発現を調べたところ、野生型 Sox3 と同程度の発現レベルで、かつ同様の発現パターンであることが、ウェスタンブロットとホルマウント免疫染色で確認できた。これらの胚を用いた ChIP 実験を現在進めている。

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 Ranawakage Deshani C., Okada Keita, Sugio Kota, Kawaguchi Yuya, Kuninobu-Bonkohara Yuki, Takada Takuya, Kamachi Yusuke	4. 巻 8
2. 論文標題 Efficient CRISPR-Cas9-Mediated Knock-In of Composite Tags in Zebrafish Using Long ssDNA as a Donor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 598634
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.598634	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 Ranawakage Deshani C., Takada Takuya, Kamachi Yusuke	4. 巻 9
2. 論文標題 HiBiT-qIP, HiBiT-based quantitative immunoprecipitation, facilitates the determination of antibody affinity under immunoprecipitation conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6895
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-43319-y	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Keita Okada, Takuya Takada, Kanae Aoki, Teruyuki Tabei, Katunori Imai, Yuki Bonkohara, Deshani C. Ranawakage, Yusuke Kamachi
2. 発表標題 Sequence features of efficient CRISPR-Cas9 crRNAs for zebrafish genome editing using crRNA-tracrRNA-Cas9 ribonucleoprotein complex
3. 学会等名 11th EUROPEAN ZEBRAFISH MEETING
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keita Okada, Takuya Takada, Kanae Aoki, Teruyuki Tabei, Katunori Imai, Yuki Bonkohara, Yusuke Kamachi
2. 発表標題 Sequence features of efficient CRISPR-Cas9 crRNAs for zebrafish genome editing using crRNA-tracrRNA-Cas9 ribonucleoprotein complex
3. 学会等名 26th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田 啓汰、高田 拓也、青木 伽奈枝、田部井 輝侑、今井 捷智、國信 友希、Deshani C. Ranawakage、蒲池 雄介
2. 発表標題 crRNA-tracrRNA-Cas9リボヌクレオタンパク質複合体を用いたゼブラフィッシュのゲノム編集における切断効率が高いcrRNAの配列特徴
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 國信 友希、Ranawakage Deshani、蒲池 雄介
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおけるCRISPR-Cas9とlong ssDNAドナーを用いた効率的なノックイン
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 高田 拓也、Deshani C. Ranawakage、蒲池 雄介
2. 発表標題 クロマチン免疫沈降法に適したエピトープタグ法の開発とゲノム編集を用いたゼブラフィッシュsox3へのノックイン
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 岡田 啓汰、高田 拓也、青木 伽奈枝、田部井 輝侑、今井 捷智、國信 友希、Deshani C. Ranawakage、蒲池 雄介
2. 発表標題 crRNA-tracrRNA-Cas9複合体を用いたゼブラフィッシュのゲノム編集に最適なcrRNAの設
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 今井 捷智、 蒲池雄介
2. 発表標題 Ethanolによって引き起こされる単眼症の発症メカニズムの解明
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 是永 修平、 蒲池 雄介
2. 発表標題 高度に定量的な蛍光ウェスタンブロット法の開発とエタノールがヒストン修飾に与える影響への応用
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 Ranawakage D.C., Takada T., Kamachi Y.
2. 発表標題 HiBiT-qIP: HiBiT-based quantitative immunoprecipitation; an assay to help improve the success of IP/ChIP.
3. 学会等名 British Society for Cell Biology and Developmental Biology Joint Spring Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takada T., Ranawakage D.C., Kamachi Y.
2. 発表標題 Development of HiBiT-based quantitative immunoprecipitation and its application to chromatin immunoprecipitation.
3. 学会等名 第41回 分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ranawakage D.C., Takada T., Kamachi Y.
2. 発表標題 HiBiT-qIP, HiBiT-based quantitative immunoprecipitation, facilitates the determination of antibody affinity under immunoprecipitation conditions.
3. 学会等名 Tokyo 2018, Cell and Developmental Biology meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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

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