

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16103

研究課題名（和文）出芽酵母とリボソームの融合によるin vitro核モデルの開発

研究課題名（英文）Development of in vitro nucleus model via fusion between yeast and liposome

研究代表者

辻 岳志（TSUJI, Gakushi）

福井大学・学術研究院工学系部門・助教

研究者番号：30803605

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、染色体構造制御機構を細胞外に取り出し、生化学的に分子機構を解明し再構成することを目指し、出芽酵母やマウス培養細胞由来の微小核と脂質二重膜小胞（リボソーム）を融合し、細胞外核モデルの創出に取り組んだ。その結果、染色体や微小核をリボソームに内封する手法を確立した。この時、PEGやプロトプラスト化の手法、凍結温度が重要であることを見出した。また、リボソーム膜に孔を開け、タンパク質を流出入する手法を開発した。本研究によりリボソーム内に封入した核・染色体に対して任意のタンパク質を供給し、染色体制御機構を生化学的に解明できることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、これまで細胞を用いた実験系でしか取り扱うことのできなかった染色体をリボソームという膜区画を用いることで、細胞外に取り出すことを可能にした。染色体の制御の破綻は白内障やガンなどの老化に伴って発症する様々な疾患に関わっていることが示唆されているが、細胞を用いた系では、細胞が死なないという条件に縛られた解析しかできない。本研究では、どのような分子がどのように染色体制御と関わっているかを非細胞環境下で解析が可能となり、既存の実験系と合わせることで染色体制御機構を詳細に解明できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have developed the method of fusing protoplast of budding yeast or micronuclei which purified from mouse A9 cultured cells with liposomes, a lipid-bilayer compartments. In addition, we developed the pore forming method on liposome membrane by using streptolysin O, which is a protein known for forming pores on the lipid membrane composed of cholesterol. Using this method, we showed that proteins can penetrate the liposome membrane via the pores and RNA synthesis occurred in the liposomes by supplied enzyme. The methods we developed in the study enable us to supply proteins to chromosomes structure in liposomes. Thus, it help to elucidate the molecular mechanism of regulating chromosome structures.

研究分野：合成生物学

キーワード：リボソーム 染色体 膜融合 出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

真核細胞内では DNA とヒストンタンパク質からなるヌクレオソームを基本構造として高次構造体である染色体が核内で遺伝情報を保持している。ヒストンタンパク質や DNA が様々な化学修飾を受けることでエピジェネティックに染色体の構造が制御されており、この構造変化によって遺伝子発現が動的に制御されている。この遺伝子発現の制御機構は、同じゲノム情報から様々な細胞への分化や代謝経路の制御、環境に応答したタンパク質合成の量的制御を可能にしている。このような染色体を介した制御機構は、モデル細胞を用いて様々なタンパク質の機能や DNA, RNA を介する複雑な制御ネットワークとして理解されてきた。一方で、染色体の構造制御機構は、遺伝子発現制御と密接にリンクしているため、*in vivo* で染色体構造制御を破壊したときの表現型が、染色体構造に由来するのか、遺伝子発現パターンが変化したこと由来なのかを区別することは難しい。さらに、染色体構造が一細胞ごとにばらついており、均一な実験系として細胞を用いることが困難であることも分かってきた[1]。一方で、生化学的に染色体構造を介した遺伝子発現制御を解明しようとしても、ヌクレオソームの試験管内再構築など *in vitro* 系を構築し、転写酵素との関係や染色体構造の制御が研究されているが[2, 3]、このような系では核を再構築することができず、細胞内の状況を再現することはできていない。本研究では、これらの問題を突破するために、リボソームと出芽酵母を融合し、出芽酵母の核を細胞外かつ細胞様区画であるリボソームに封入した *in vitro* 核モデルを開発することを目指した。

2. 研究の目的

本研究での目的は、染色体構造を細胞から取得し、生化学的に染色体構造の機能を解明できる *in vitro* 核モデルを構築することである。この *in vitro* 核モデルは、リボソームという細胞様区画の中に核構造を封入するという創造的な方法で、均一な条件で染色体構造の制御機構を分子レベルで再現することが世界で初めて可能になる独自の手法である。この手法は、リボソームという膜区画構造を利用することで、核構造を保持し、細胞間の遺伝子発現パターンのゆらぎや変動を除いた均一な条件で、染色体構造の制御機構を解明できる。本研究で用いるリボソームは直径 20 μ m 以上の細胞サイズのものであり、申請者の先行研究から実際に細菌のゲノムを取り込むことに成功している。この手法を応用し、真核細胞である出芽酵母の細胞壁を除去したプロトプラストおよびマウス A9 培養細胞とリボソームを融合し、核・染色体をリボソーム内に内封することを目的とした。この研究成果を、分子生物学から得たタンパク質の機能や細胞内での染色体構造制御機構の知見を組み合わせることで、*in vitro* 実験系での染色体構造制御に必要な最小因子の同定や、制御機構の分子機構を詳細に解明できることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 出芽酵母とリボソームの融合

出芽酵母の細胞壁を Zymolyase 処理によって融解してプロトプラストを作り、リボソームと混合、高速遠心してペレットを形成させた後に、液体窒素を用いた凍結融解によって融合させて核を取り出した。また、プロトプラスト作製時に、YPD 培地にソルビトールを加えて出芽酵母と浸透圧を合わせ、Zymolyase を添加し、長期間培養することで、プロトプラストの肥大化を行い、肥大化したプロトプラストとリボソームを同様に凍結融解によって融合させた。この時、出芽酵母はヒストンタンパク質に GFP を融合させた株を用い、リボソームの脂質膜に蛍光脂質を用いて、フローサイトメーター (FCM) を用いて、融合率を解析し、顕微鏡観察との比較を行った。すると、FCM では融合と接着の区別が困難であり、接着の割合が大きいことが分かった。そのため、融合率が向上するまでは、顕微鏡での観察を主とした。

(2) マウス A9 細胞とリボソームの融合・内封

マウス A9 細胞をコルセミド処理して、細胞分裂を停止させ、微小核を細胞内で形成させた後、サイトカラシン B を加えて脱核させ、微小核を精製した。その後、POPC で作ったリボソームと 1:1 で混合し、凍結融解によって融合させた。また、油中水滴界面通過法[4]を用いて、内液に微小核を入れて、リボソームに内封した。その後、核を DAPI で染色し、リボソーム膜の蛍光脂質と内液の蛍光タンパク質 (Transferrin-Alexa 488; TA488) を指標に顕微鏡で内封と融合効率を解析した。

(3) リボソーム膜孔介したタンパク質供給法の確立

マウスの培養細胞などでコレステロール依存的に膜に孔を形成することが知られている Streptolysin O (SLO) タンパク質を用いて、リボソーム膜に孔を形成させた。その後、80 kDa の蛍光タンパク質である TA488 の流出と TA647 流入および T7 RNA polymerase を外液からリボソーム内に供給し、RNA 合成反応について、RNA を SYBR Green II で染色し、FCM で解析した。

4. 研究成果

(1) 出芽酵母プロトプラストとリボソームの融合

出芽酵母のプロトプラストとリボソームを融合し、FCM で解析を行った。この時、外液に PEG を加えることで融合が促進されることが分かった(図 1A)。また、顕微鏡観察から、リボソーム内に核膜が残っている状態の像が得られた。しかし、リボソーム膜に蛍光脂質を入れるのではなく、リボソーム内に蛍光タンパク質を入れ、核とリボソーム内液が同じ区画内に封入されるかを調べたところ、そのような構造体は得られなかった。そのため、これまで顕微鏡観察および FCM で見られていたのは、凍結融解によって破裂したリボソーム膜脂質が出芽酵母の細胞壁あるいは細胞膜に接着している可能性が示唆された。その理由として、出芽酵母の細胞壁が完全に分解できていない可能性が考えられたため、出芽酵母のプロトプラストを肥大化させる手法を改良し、出芽酵母の細胞壁溶解時間を従来の 2 時間から 2 日に変更した。すると、これまでとは異なり、リボソーム膜区画内に蛍光タンパク質融合ヒストンタンパク質が偏在する融合体が見られた(図 1B)。これは、リボソーム膜を核膜と見立てた *in vitro* 染色体モデルであるとみなせる。今後は、リボソーム内液がこのような構造体内に封入されているかどうか、FCM 解析およびセルソーターによる融合体の分取が可能かを調べる必要がある。

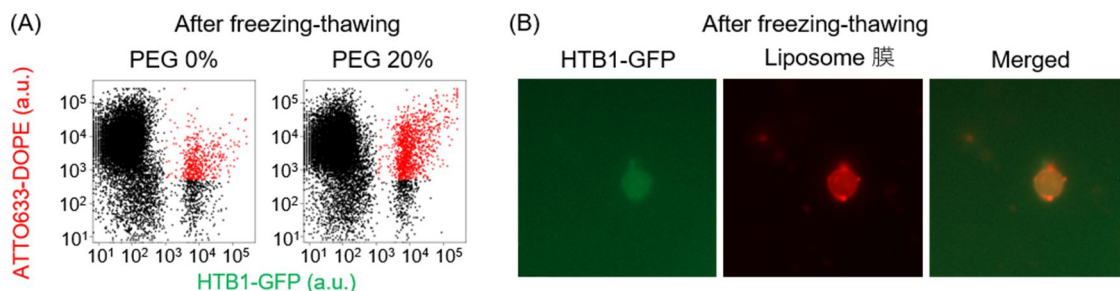


図 1 リボソームと出芽酵母プロトプラストの凍結融解による融合

(2) マウス A9 細胞由来微小核とリボソームの融合・内封

マウス A9 細胞から精製した微小核をリボソーム内液に添加し、界面通過法によってリボソームを作製した(図 2A)。その後、顕微鏡で観察した(図 2B)。また、内封時の内液組成を検討した。具体的には、従来の内液組成は、Sucrose, HEPES-KOH, K-Glu を入れていた。微小核と Sucrose のみの場合は、微小核と従来の内液組成と内封率が同程度だったのに対して、内液から K-Glu を除いた条件では、他の条件よりも 2% 程度内封率が向上した。一方で、微小核とリボソームの凍結融解による融合では、リボソームと微小核が凍結融解によって著しく損傷することが分かったため、液体窒素ではなく、-80、-20 での融合を検討した。その結果、液体窒素での融合率は 15% 程度であったのに対して、-80 での凍結では、11% 程度、-20 での凍結では 10% 程度であり、凍結温度に依存して融合率が異なることが示唆された。

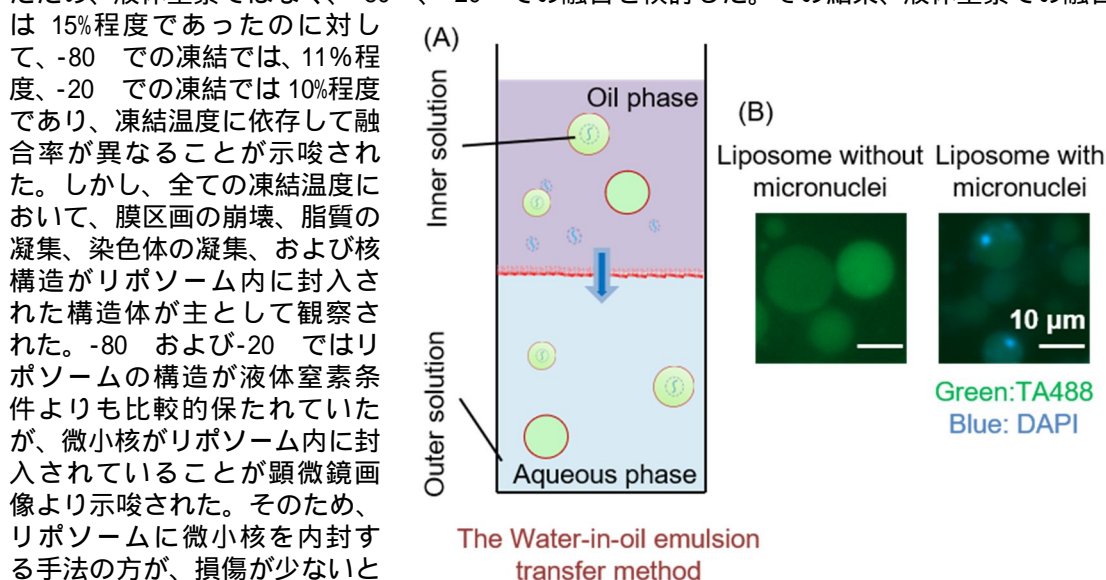


図 2 マウス培養細胞由来微小核のリボソームへの内封

しかし、全ての凍結温度において、膜区画の崩壊、脂質の凝集、染色体の凝集、および核構造がリボソーム内に封入された構造体为主として観察された。-80 および -20 ではリボソームの構造が液体窒素条件よりも比較的保たれていたが、微小核がリボソーム内に封入されていることが顕微鏡画像より示唆された。そのため、リボソームに微小核を内封する手法の方が、損傷が少ないと考えられる。本研究では、従来の手法を改良し、微小核の生成時にフィルター過を一晩かけて行うことで、細胞由来の夾雑物を取り除く方法を確立できた。また、微小核とリボソームの内封・融合は世界でも報告されておらず、今後は、特定の染色体をラベルし、リボソームに封入した後にセルソーターによって分取し、染色体構造依存的な転写制御が細胞外でも働くか、またその際に他の生物種由来のタンパク質が生化学的に反応できるかについて検討する。

(3) リボソーム膜孔介したタンパク質除去法の確立

真核細胞とリボソームを融合した後に、細胞由来のタンパク質を除去する必要がある。我々はコレステロール依存的に膜に孔を開ける Stretolysin 0 に着目し、このタンパク質によってリ

ポソーム膜に孔を形成しタンパク質の流入が可能かについて検討した。細胞と同様の条件ではリポソーム膜に膜孔を形成させることはできなかったが、膜組成に POPG を加えて、外液を還元状態にし、SLO 濃度を細胞に添加する量の 10 倍量にすることで、80 kDa のタンパク質を流出できること、および、酵素を供給し、リポソーム内で生化学反応を駆動させられることを示した。本手法を用いることで、リポソームと出芽酵母あるいはマウス培養細胞を融合した後に、細胞由来のタンパク質を除去し、任意のタンパク質を後から添加することが可能になると考えられる。本研究は、査読付き学術誌 *chembiochem* に掲載された[5]。

引用文献

1. Mano, Y., et al., *Single cell visualization of yeast gene expression shows correlation of epigenetic switching between multiple heterochromatic regions through multiple generations*. PLoS Biol, 2013. **11**(7): p. e1001601.
2. Kujirai, T., et al., *Structure and function of human histone H3.Y nucleosome*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(13): p. 6127-41.
3. Swygert, S.G., et al., *SIR proteins create compact heterochromatin fibers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(49): p. 12447-12452.
4. Pautot, S., B.J. Frisken, and D.A. Weitz, *Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion*. Langmuir, 2003. **19**(7): p. 2870-2879.
5. Tsuji, G., et al., *Exchange of Proteins in Liposomes through Streptolysin O Pores*. Chembiochem, 2021. **22**(11): p. 1966-1973.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuji Gakushi, Sunami Takeshi, Oki Masaya, Ichihashi Norikazu	4. 巻 22
2. 論文標題 Exchange of Proteins in Liposomes through Streptolysin O Pores	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1966 ~ 1973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.202100029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辻 岳志, 伊藤 凌哉, 井尻 準也, 沖 昌也
2. 発表標題 S. Cerevisiae とリボソームの融合による in vitro 核モデルの開発
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻 岳志, 東出 望花, 伊藤 凌哉, 下村 彩友, 沖 昌也
2. 発表標題 染色体構造を介した遺伝子発現制御の再構成を目指した in vitro 核モデルと人工染色体の開発
3. 学会等名 第93回日本遺伝学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryoya Ito, Masaya Oki, and Gakushi Tsuji
2. 発表標題 Development of fusion method of yeast and liposome by the freeze-thaw method
3. 学会等名 細胞を創る研究会14.0
4. 発表年 2021年

1．発表者名 辻 岳志、沖 昌也
2．発表標題 出芽酵母とリボソームの融合によるin vitro 核モデルの開発
3．学会等名 日本生化学会北陸支部 第38回大会
4．発表年 2020年

1．発表者名 阿垣 悠介、沖 昌也、辻 岳志
2．発表標題 可逆的な膜孔形成によるリボソーム内環境制御法の開発
3．学会等名 日本生化学会北陸支部 第38回大会
4．発表年 2020年

1．発表者名 伊藤 凌哉、沖 昌也、辻 岳志
2．発表標題 出芽酵母とリボソームの高効率かつ低損傷な融合法の開発
3．学会等名 日本生化学会北陸支部 第38回大会
4．発表年 2020年

1．発表者名 辻 岳志、角南 武志、沖 昌也、市橋 伯一
2．発表標題 リボソーム膜孔を介したリボソーム内環境制御法の開発
3．学会等名 細胞を創る研究会13.0
4．発表年 2020年

1．発表者名 Gakushi Tsuji
2．発表標題 Development of in vitro nuclear model by fusion between yeast and liposome
3．学会等名 日本生化学会北陸支部会
4．発表年 2019年

1．発表者名 Gakushi Tsuji
2．発表標題 Development of in vitro nuclear model by fusion between yeast and liposome
3．学会等名 ライフサイエンスイノベーションセンター研究交流会（招待講演）
4．発表年 2019年

1．発表者名 伊藤凌哉、沖昌也、辻岳志
2．発表標題 酵母とリボソームの融合法の検討
3．学会等名 第91回日本遺伝学会大会
4．発表年 2019年

1．発表者名 Gakushi Tsuji, Masaya Oki
2．発表標題 Construction of in vitro nuclear model via fusion between eukaryotic cells and liposomes
3．学会等名 第91回日本遺伝学会年会
4．発表年 2019年

1. 発表者名 Gakushi Tsuji, Masaya Oki
2. 発表標題 Construction of in vitro nuclear model via fusion between eukaryotic cells and liposomes
3. 学会等名 北陸エビジェネティクス研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福井大学生物化学研究室ホームページ https://sites.google.com/view/biochem-hp/ リサーチマップ、辻岳志 https://researchmap.jp/gtsuji 福井大学研究者総覧 http://t-profile.ad.u-fukui.ac.jp/profile/ja.60f098eca71ab5cd520e17560c007669.html
--

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
---------	---------