

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06659

研究課題名（和文）多細胞体構築における転写振動と細胞外環境の相互作用の解析

研究課題名（英文）Analysis of the interaction between transcriptional oscillations and the extracellular environment in multicellular structure formation

研究代表者

村本 哲哉（Muramoto, Tetsuya）

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：10612575

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）：多細胞体が形成される過程で観察される同調的な遺伝子発現振動を解析するために、ライブイメージング技術が有効である。この研究では、SpCas9-NGやSpRYを使用した効率的なイメージング用細胞の作製方法を確立した。これにより、CRISPR/Cas9の標的配列に続く3塩基にG塩基が含まれなければならない制限を克服し、AT塩基を多く含むゲノム配列でも蛍光タンパク質を効率よくノックインすることができる。さらに、CRISPRライブラリーを用いた遺伝子スクリーニング法を開発し、多細胞体形成の普遍原理の理解を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多細胞体の構築過程では、分化を誘導するシグナルに応じて適切なタイミングで遺伝子発現が制御され、正確に素過程が進行する。この過程で観察される周期的な遺伝子発現を解析するためには、その現象を直接可視化するイメージング技術が必要不可欠である。今回確立された技術は、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貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Live imaging techniques are valuable for analysing the synchronous oscillation in gene expression during the formation of multicellular structures. In this study, efficient methods were established for generating cells specifically for imaging purposes, employing SpCas9-NG and SpRY. These methods overcome the limitation that the three bases following the target sequence of CRISPR/Cas9 must contain two G bases, thereby enabling efficient knock-in of fluorescent proteins even in genomic sequences with a high AT base composition. Additionally, a gene screening method utilising CRISPR libraries has been developed to further our understanding of the fundamental principles governing multicellular structure formation.

研究分野：発生生物学

キーワード：ライブイメージング 遺伝子発現振動 転写動態 CRISPR 光操作

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多細胞体の構築過程では、分化を誘導するシグナルに応じて適切なタイミングで遺伝子発現が制御され、正確に素過程が進行する。独自の転写計測技術を用いた解析により、これまでに多細胞体の構築過程で同調的な遺伝子発現振動を示す興味深い現象を発見した。この現象の解析は、秩序正しく多細胞組織を形成する普遍的な原理の理解や、正確な発生イベントの転換を駆動する遺伝子発現の時間管理機構の解明にもつながると期待される。これらの現象を明らかにするためには、生細胞内の生命現象を直接観察できるライブイメージング技術が有用である。しかし過剰発現した標的分子を可視化する場合、標的分子を明るく観察できるという利点がある一方、標的分子の過剰な存在による影響をモニターしてしまう可能性がある。そこで、観察対象の分子を細胞内の本来の分子数に限りなく近づけた上で観察することが求められる。この手法として、ゲノム中に蛍光タンパク質をコードする配列をノックインする手法がある。しかし、従来の相同組換えを利用したノックイン細胞作製法は高効率とは言えず、また CRISPR/Cas9 を利用した方法では AT 塩基を多く含む細胞性粘菌のゲノム配列において、標的となり得る配列の出現頻度が低いという問題点があった。

### 2. 研究の目的

個々の細胞で起こる遺伝子発現振動をライブイメージング解析するためのノックイン細胞作製方法として CRISPR/Cas9 技術がある。この手法を用いる際に標的となるガイド RNA を設計するが、この配列にはその 3'末端側に PAM (protospacer adjacent motif) 配列が必要となる。標準的な PAM 配列は NGG という G 塩基を 2 つ含む。この制限のもとでは、AT 塩基を多く含むゲノム配列からなる細胞性粘菌において、標的候補の出現頻度が大きく低下する。そのため、適切な標的を目的の位置に設計できない場合には、ノックイン細胞の作製ができない場合も出てくる。そこで PAM 配列の制限が緩和された Cas9 として知られる SpCas9-NG や SpRY、xCas9 3.7 に着目した。これらを利用することで、イメージング解析に必要なノックイン細胞の効率的な作製方法を確立するとともに、CRISPR/Cas9 技術を応用することで、多細胞体の構築過程に必須な遺伝子を特定するための遺伝子スクリーニング手法の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 標的設計の制限を緩和した改良型 Cas9 によるノックイン技術の構築

PAM 配列の制限が標準的な NGG ではなく、ほぼなくなった改良型 Cas9 (xCas9 3.7, SpCas9-NG, SpRY) を人工遺伝子合成により合成した。その後、細胞性粘菌の tRNA 発現系を利用したガイド RNA 発現カセットと組み合わせた CRISPR/Cas9 all-in-one ベクターを構築した。この CRISPR ベクターに 16 通りの PAM 配列からなる標的配列を挿入したベクターを作製し、それぞれ細胞性粘菌へ導入した。その後、これらの細胞内でのゲノム編集効率を定量した。

#### (2) CRISPR ライブラリーを用いた遺伝子スクリーニング法

Cas-designer というガイド RNA 設計ツールを実行し、全遺伝子を標的とした 27,405 個のガイド RNA と全キナーゼ遺伝子を標的とした 4,582 個のガイド RNA を最終的に選別した。その後、Custom Array 社の電気化学的オリゴ合成システムにより、これらのガイド RNA 配列を含むオリゴ DNA をオリゴプールとして合成した。標的配列を含むガイド RNA 領域は PCR により増幅し、CRISPR/Cas9 all-in-one ベクターにクローニングした。これにより、全遺伝子もしくは全キナーゼに対するガイド RNA を発現する CRISPR ベクター (pTM1376, および pTM1810) を構築した。このベクターをそれぞれ細胞性粘菌へ導入することで、変異体プールを作製した。作製した変異体プールは、多細胞体の構築が異常となるものを探索し、そのガイド RNA 配列を同定することで、表現型とその原因遺伝子の同定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 標的設計の制限を緩和した改良型 Cas9 によるノックイン技術の構築

従来型 Cas9 である SpCas9 と改良型 Cas9 である xCas9 3.7、SpCas9-NG、SpRY を用いて CRISPR/Cas9 all-in-one ベクターを作製し、これらのベクターでの細胞性粘菌におけるゲノム編集効率を解析した。その結果、標準的な PAM 配列である NGG 以外にも PAM が NGA、NGT、NGC であればゲノム編集できることを明らかにした。特に SpRY を用いて NGG、NGA、NGT、NGC の PAM 配列をガイド RNA として使用した場合、25% 以上の変異体でゲノム編集できることがわかった。さらに、SpRY が PAM の制限をほぼ受けないのかどうか解析した。ここでは、NHN (H は A, C, T の塩基を表す) が PAM 配列である標的配列をさらに設計し、それに対するゲノム編集効率を求めた。その結果、全 16 種類の PAM 配列のうち 10 種類の PAM 配列が 25%

以上の変異導入効率で、さらに 16 種類中 13 種類で 2%以上の効率でゲノム編集できることがわかった。したがって、改良型 Cas9 である SpRY をベースとした CRISPR/Cas9 ベクターを使うことで、細胞性粘菌の大部分のゲノム配列を PAM の制限なく改変できることが示された。

次に、イメージング解析のためのノックイン細胞が改良型 Cas9 の SpRY と NG もしくは NHN PAM 配列のガイド RNA を組み合わせることで作製可能かどうか解析した。ここでは、標的遺伝子として多細胞体構築に必須の *carA* 遺伝子を選択した。60 塩基の相同配列を両末端にもち、その中央に GFP の塩基配列を含むドナー DNA と CRISPR/Cas9 ベクターを同時に細胞へ導入した(図 1)。その結果、最も効率よく GFP 配列がノックインできたケースでは、得られた変異体の半数で GFP 配列がノックインされていることが分かった。したがって、イメージング解析に不可欠となるノックイン細胞を標的デザインの制限なしで効率的に行える手法を構築できた。

構築した CRISPR/Cas9 all-in-one ベクターはナショナルバイオリソースプロジェクトの NBRP 細胞性粘菌より研究者コミュニティに提供している。

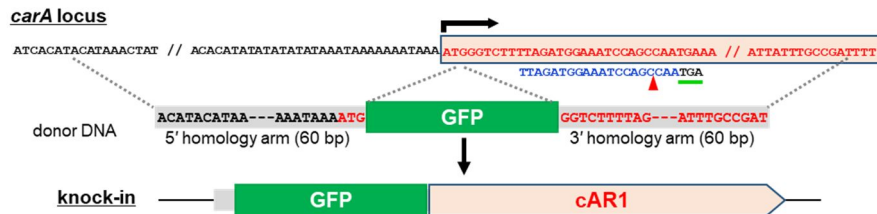


図 1 .改良型 Cas9 の SpRY を用いたイメージング解析のためのノックイン細胞作製  
標的のガイド RNA は青文字、PAM 配列は緑のアンダーラインで表示している。ドナー DNA は 60 bp の相同配列を両末端に含む形で設計している。

## (2) CRISPR ライブラリーを用いた遺伝子スクリーニング法

全遺伝子および全キナーゼに対する CRISPR プラスミドライブラリーを構築した(図 2)。次にこの CRISPR ベクターを細胞へ導入することで変異体プールを作製した。この変異体プールから多細胞体形成に必須な遺伝子を特定するために、21,489 個の変異体を観察することで 280 個の発生異常株を単離した。各変異体に含まれる標的ガイド RNA を解析した結果、独立したクローンから複数回にわたって単離された同一遺伝子が 33 個含まれており、これらの遺伝子の多細胞体形成への関与の高さが示唆された。この中には、既に多細胞体構築に必須であることが知られている *pkaC* や *yakA* 遺伝子なども含まれていた。以上のように、全遺伝子および全キナーゼに対するゲノム編集変異体から原因遺伝子の同定を迅速かつ網羅的に進めることが明らかとなった。

遺伝子スクリーニングのための CRISPR プラスミドライブラリーはバイオリソースプロジェクトの NBRP 細胞性粘菌より研究者コミュニティに提供している。

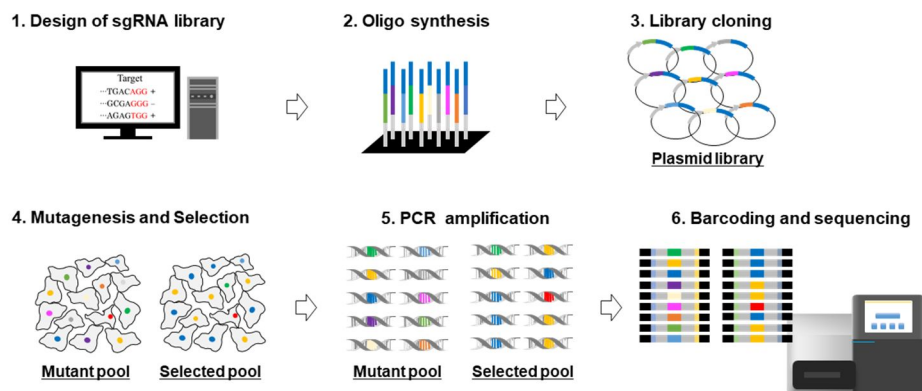


図 2 . ゲノムワイドな遺伝子スクリーニング技術の概要

1) 標的配列の設計、2) オリゴ DNA の合成、3) ガイド RNA を CRISPR ベクターにクローニング、4) 変異体プールの作製と目的とする表現型を示す変異体の回収、5) ガイド RNA の領域の増幅、6) バーコードを付加したガイド RNA 領域の配列解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ogasawara Takanori, Watanabe Jun, Adachi Remi, Ono Yusuke, Kamimura Yoichiro, Muramoto Tetsuya	4. 巻 12
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-based genome-wide screening of Dictyostelium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-15500-3	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 Brustel Julien, Muramoto Tetsuya, Fumimoto Kazuki, Ellins Jessica, Pears Catherine J., Lakin Nicholas D.	4. 巻 13
2. 論文標題 Linking DNA repair and cell cycle progression through serine ADP-ribosylation of histones	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-27867-4	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 該当する
1. 著者名 Yamashita Kensuke, Iriki Hoshie, Kamimura Yoichiro, Muramoto Tetsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 CRISPR Toolbox for Genome Editing in Dictyostelium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 721630
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.721630	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 Asano Yuu, Yamashita Kensuke, Hasegawa Aoi, Ogasawara Takanori, Iriki Hoshie, Muramoto Tetsuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Knock-in and precise nucleotide substitution using near-PAMless engineered Cas9 variants in Dictyostelium discoideum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-89546-0	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 3件）

1. 発表者名 小笠原崇勝、新堀愛美、村本哲哉
2. 発表標題 CRISPR スクリーニングを用いたポリグルタミン凝集の分解機構の解明
3. 学会等名 第19回東邦大学5学部合同学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山下謙介、村本哲哉
2. 発表標題 発生時計を駆動する短周期振動の光操作
3. 学会等名 第19回東邦大学5学部合同学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山下謙介、島根和哉、村本哲哉
2. 発表標題 細胞内シグナル伝達の光操作を介した分子振動の時空間制御
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下謙介、島根和哉、村本哲哉
2. 発表標題 周期シグナルが駆動する発生タイマー機構の光操作
3. 学会等名 第12回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野祐輔、上村陽一郎、村本哲哉
2. 発表標題 キナーゼ過剰発現ライブラリーから得られた走化性異常株の解析
3. 学会等名 第12回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamashita, K., Shimane, K., Muramoto, T.
2. 発表標題 Optogenetic manipulation of molecular oscillation during development.
3. 学会等名 International Dictyostelium meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Muramoto, T., Kuwayama, H.
2. 発表標題 National BioResource Project Nenkin (NBRP Nenkin): The Bioresource Bank of Cellular Slime Molds in Japan.
3. 学会等名 International Dictyostelium meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ogasawara, T., Watanabe, J., Muramoto, T.
2. 発表標題 CRISPR/Cas9-based genome-wide screening of Dictyostelium
3. 学会等名 International Dictyostelium meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下謙介、村本哲哉
2. 発表標題 細胞内シグナル伝達の光操作を介した分子振動の時空間制御
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村本哲哉
2. 発表標題 CRISPRによるノックアウトやノックインから大規模スクリーニング
3. 学会等名 第12回日本細胞性粘菌学会・NBRPワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村本哲哉
2. 発表標題 組織構築過程でみられる周期的遺伝子発現
3. 学会等名 第4回形態解析ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野祐輔、上村陽一郎、村本哲哉
2. 発表標題 キナーゼ過剰発現ライブラリーを用いた cAMP 応答性の網羅解析
3. 学会等名 第11回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小笠原崇勝、渡邊淳、村本哲哉
2. 発表標題 CRISPR ライブラリーを用いた遺伝子スクリーニング法の構築
3. 学会等名 第11回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下謙介、島根和哉、小野祐輔、阿部弘新、村本哲哉
2. 発表標題 周期シグナルの光操作による多細胞体的人為的創出
3. 学会等名 第11回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下謙介、村本哲哉
2. 発表標題 発生における協調的な細胞運動の操作
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島根和哉、村本哲哉
2. 発表標題 Optogenetic manipulation of multicellular formation in Dictyostelium discoideum
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 小山航平、飯島知之、桑葉達広、山中彩夏、村本哲哉、R. R. Kay、齊藤玉緒
2. 発表標題 細胞性粘菌が生産するハロゲン化 有機化合物LCCsの生合成経路の解析
3. 学会等名 第10回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李恩恵、船江聡子、小室直子、村本哲哉
2. 発表標題 周期的局在変化を示すMYB転写因子のcAMP応答性
3. 学会等名 第10回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅野優、山下謙介、小笠原崇勝、長谷川葵、入来星衣、村本哲哉
2. 発表標題 Cas9バリエーションを用いたノックイン株の作製
3. 学会等名 第10回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

DNA修復と細胞周期の進行を制御する新たな仕組みを発見  
[https://www.toho-u.ac.jp/press/2021\\_index/20220125-1184.html](https://www.toho-u.ac.jp/press/2021_index/20220125-1184.html)  
 科研費成果紹介 東邦大学理学部生物学科 村本哲哉  
[https://www.youtube.com/watch?v=Q\\_prrCo2C-k](https://www.youtube.com/watch?v=Q_prrCo2C-k)

## 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			
米国	NIH/NIAID			
英国	オックスフォード大学			
英国	University of Oxford			