

令和 6 年 4 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06020

研究課題名（和文）CRISPRとBiFCを用いて単一生細胞内でのヒストン修飾伝搬速度を計測する

研究課題名（英文）Measurement of histone modification propagation velocity in a single living cell using CRISPR and BiFC

研究代表者

岡田 悟（Okada, Satoshi）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：30734488

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、CRISPR-Cas9、ヒストン修飾認識ドメイン、及びBimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) を組み合わせ、生細胞におけるヒストン修飾の時空間的動態を詳細に追跡する手法を確立するための要素技術の開発を試みた。GFP由来蛍光タンパク質の褪色遅延をもたらすGFP-clampという新しい分子を用いて、イメージングの時間解像度を向上させる効果を確認した。一本鎖DNA結合タンパク質Rfa1を用いたガイドRNAの機能評価手法を開発し、CRISPR-CasシステムのガイドRNAの効果を効率的に評価することを可能にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって見出されたGFP-clampによる蛍光タンパク質の褪色遅延効果は、蛍光タンパク質の褪色メカニズムの理解にとって新しい知見を提供するとともに、生細胞におけるタンパク質の挙動をより高い時空間解像度で詳細に解析することを可能にするものである。また、本研究で開発したガイドRNAの機能を効率的に評価する手法は、ゲノム編集技術の効率と精度を向上させ、基礎的な生物学研究だけでなく、ゲノム編集技術の産業界における利用においても重要な応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to develop key technologies for establishing a method to track the spatiotemporal dynamics of histone modifications in live cells by combining CRISPR-Cas9, histone modification recognition domains, and bimolecular fluorescence complementation (BiFC). We tested a new molecule called GFP-clamp that delays the photobleaching of GFP-derived fluorescent proteins, thereby enhancing the temporal resolution of live cell imaging. We developed a method for evaluating the in vivo functionality of the guide RNAs using the single-stranded DNA binding protein Rfa1, which enables efficient assessment of the efficacy of guide RNAs in the CRISPR-Cas system.

研究分野：分子生物学

キーワード：CRISPR-Cas 生細胞イメージング ゲノム編集 BiFC ガイドRNA機能評価 DNA二本鎖切断 GFP-clamp 褪色

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

生命システムは柔軟性をもつ。この柔軟性の根底には、ゲノム DNA 配列は不変であるが、外部刺激や細胞周期の進行などの内因性の情報に応じて、DNA の読み出しパターンが変化し、このパターンを保持・継承する機構がある。この機構はエピジェネティック制御と呼ばれ、DNA のメチル化とヒストンの翻訳後修飾が中核的な役割を果たしている。ヒストン修飾はその可塑性がエピジェネティック制御の柔軟性を規定する中核的な性質であり、ヒストン修飾が染色体上を伝搬していくプロセスは、特定の遺伝子座において特定のヒストン修飾がどのように変化するのかについて多くの研究がなされてきた。しかし、ゲノム上の特定の座標点から視点を転じると、解決されていない疑問が数多く存在する。例えば、ヒストン修飾伝搬速度はどのような因子によって規定されるのか、ヒストン修飾伝搬速度はゲノム領域ごとにどのくらい異なるのか、また細胞ごとにどの程度のバラつきを持つものなのかなどが未解明である。

2. 研究の目的

この研究の目的は、ヒストン修飾のエピジェネティック制御メカニズムの動的側面を明らかにすることである。特に、ヒストン修飾がどのタイミングで、どの細胞において、どの種類の修飾が、細胞核内のどの領域において、ゲノム上のどの位置で生じるのかを調べることが必要不可欠である。本研究では、CRISPR/Cas9 システム、ヒストン修飾認識ドメイン、Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) を組み合わせて利用し、これらの組み合わせにより上記の情報要素すべてを同時に取り出すことのできるイメージング手法を確立する。これを用いてヒストン修飾がゲノム上を伝搬していく速度を単一の生細胞単位で計測する。この計測を通じて、細胞ごとにヒストン修飾伝搬速度がどの程度バラつくのか、修飾酵素のリクルート因子やヒストンリモデラーの変異がヒストン修飾伝搬速度にどのような影響を及ぼすのか、クロマチンの核内位置とヒストン修飾伝搬速度の関係はどのようなものかを明らかにする。これまで検証されてこなかった疑問に対して答えを得ることを目指す。

3. 研究の方法

本研究の方法として、CRISPR/Cas9 系、ヒストン修飾認識ドメイン、Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) の 3 つの要素を組み合わせる。これにより、特定のヒストン修飾の時空間的動態を追跡し、生細胞内で連続的にヒストン修飾の変化を検出する手法を確立する。具体的には、dCas9 を利用して特定の遺伝子座に局在させ、ヒストン修飾認識ドメインを用いて特定の修飾を検出し、BiFC を用いてこれらの相互作用を可視化する。この手法により、生細胞内でヒストン修飾がどのタイミングで、どの細胞において、どの種類の修飾が、ゲノム上のどの位置で生じるかを詳細に調査する。また、ヒストン修飾がゲノム上を伝搬していく速度を、DNA 二本鎖切断をトリガーとして計測する方法を開発し、関連因子の影響を定量的に解析する。これにより、ヒストン修飾を介したエピジェネティック制御の動的側面を深く理解し、一細胞を対象としたゲノムワイド解析と相乗的に研究に寄与することを目指す。

4. 研究成果

(1) GFP 結合タンパク質 GFP-clamp による GFP 由来蛍光タンパク質の褪色遅延効果の発見

蛍光タンパク質、特に GFP (オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質) を使用した生細胞イメージングにおいて、撮影の時空間解像度や継続時間を向上させるには、蛍光タンパク質の褪色速度が非常に重要な因子である。固定試料の場合、褪色防止封入剤を用いることで褪色を遅延させることができるのに対して、生細胞イメージングにおいては、そもそも褪色しにくい蛍光タンパク質を使用する以外、一般に利用できる選択肢がこれまで存在しなかった。

我々は、オワンクラゲ由来 GFP に結合する人工タンパク質 GFP-clamp が GFP の蛍光褪色を遅延させる効果を持つことを見出した。GFP-clamp は DARPIn (Designed Ankyrin Repeat Protein) 骨格を持つ GFP 結合タンパク質 2 種類をフレキシブルリンカーでつないだ分子であり、pM オーダーの高い親和性で GFP 由来タンパク質に結合する (図 1、Hansen et al., 2017)。

GFP-clamp を共発現することによって、ミトコンドリア外膜タンパク質である Tom70 を GFP でタグ付けした出芽酵母細胞において、GFP の褪色が遅延し、蛍

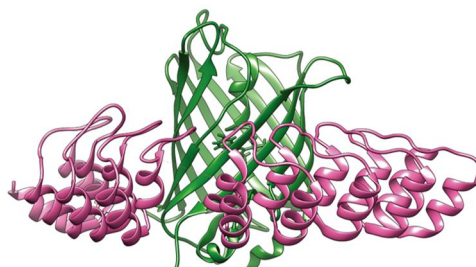


図 1. GFP-clamp と GFP の共結晶構造

光輝度の半減期が約 1.4 倍以上伸びることが示された (図 2)。

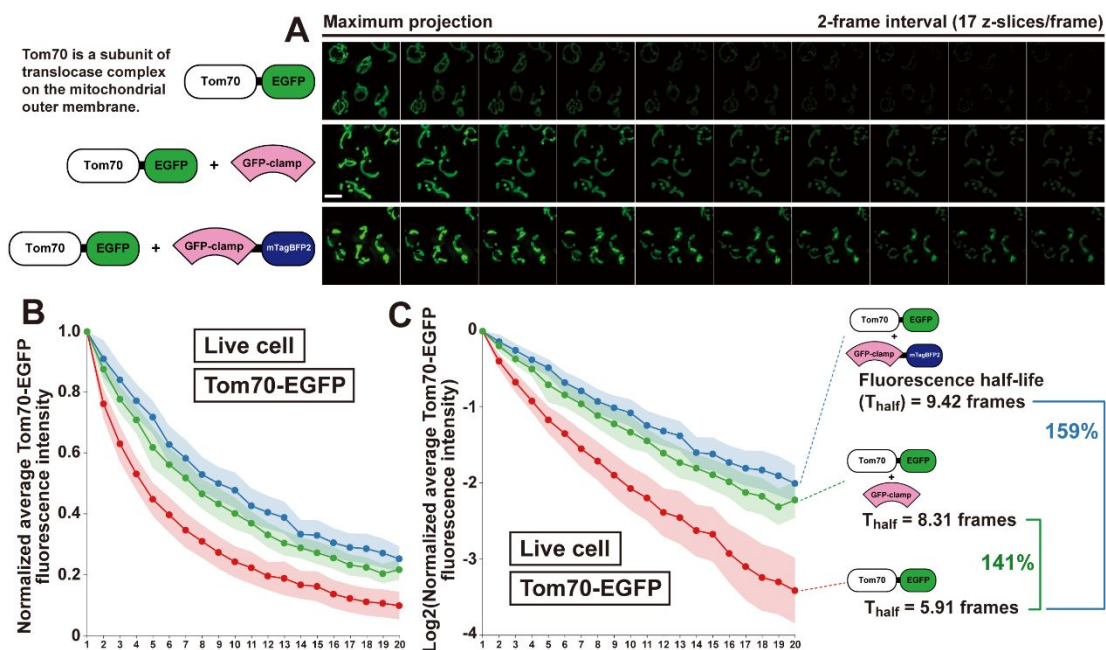


図 2. Tom70-EGFP の褪色は GFP-clamp の共発現によって遅延する

GFP-clamp 共発現による褪色遅延は、タグ付けする対象を Net1 や Sir2 (いずれも核小体タンパク質) に変更したときも観察された。また、Venus, YPet, mGold, mClover3, PAGFP など、オワンクラゲ由来のさまざまな蛍光タンパク質に対して、蛍光輝度半減期を 1.41 倍 ~ 8.24 倍に延

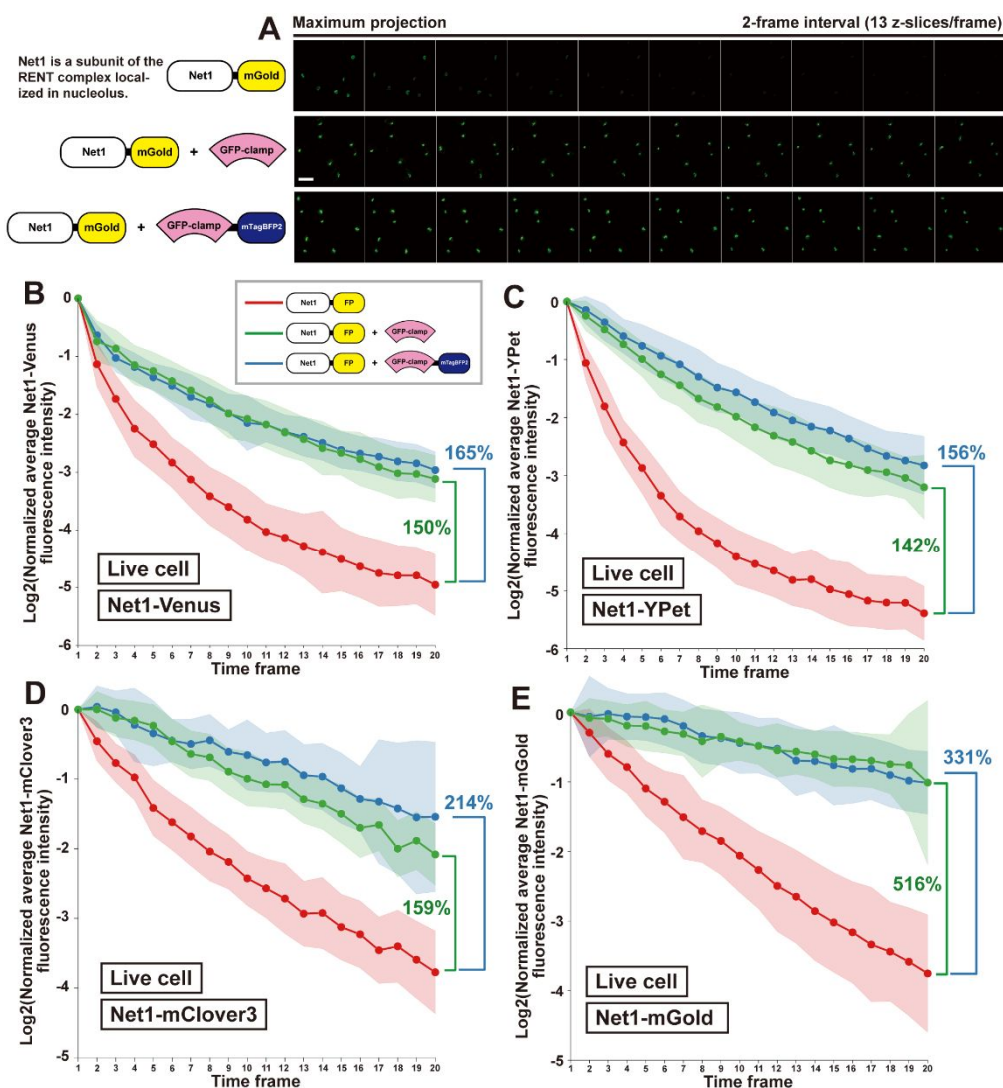


図 3. GFP-clamp は複数のオワンクラゲ GFP 由来蛍光タンパク質に対して褪色遅延効果を示す

長する効果が見られた(図3)のに対して、オワンクラゲ由来しない mCherry や mNeonGreen などのタンパク質に対しては、このような効果は観察されなかった。

さらに、リコンビナント蛍光タンパク質およびリコンビナント GFP-clamp を用いて、リン酸バッファー中での経時撮影を実施した場合も同様に褪色の遅延が見られたことから、GFP-clamp による褪色遅延は細胞内環境に依存しない現象であることが分かった(図4、図5)。

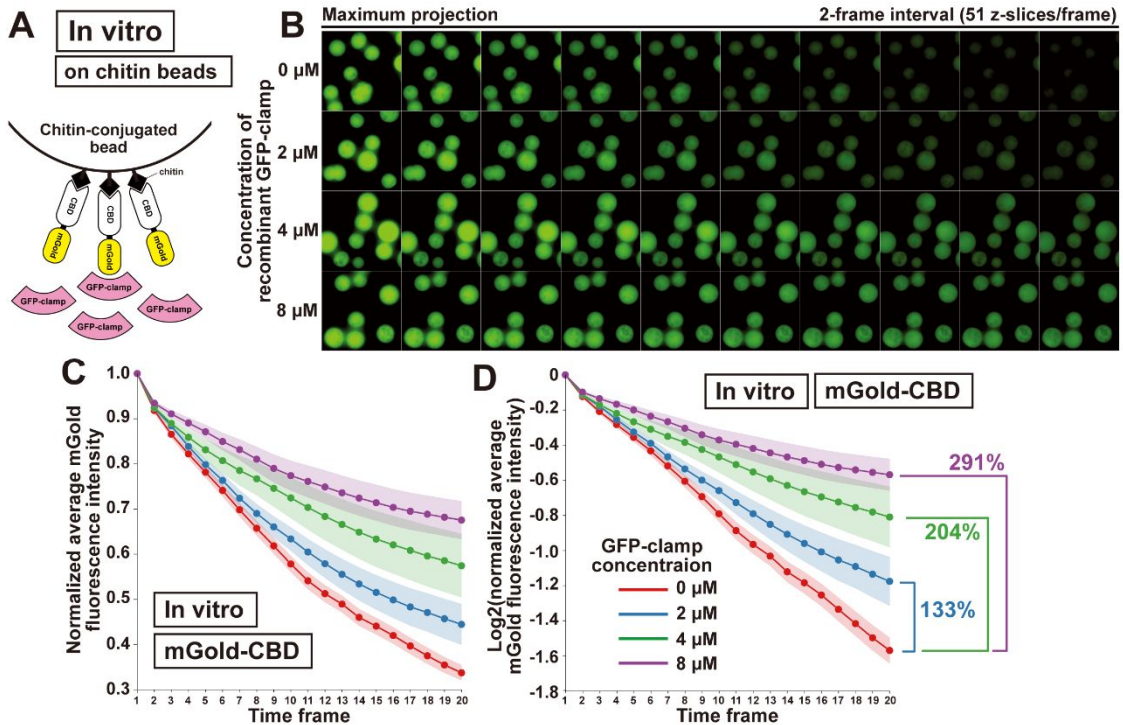


図4. GFP-clamp は in vitro で濃度依存的な mGold の褪色遅延をもたらす

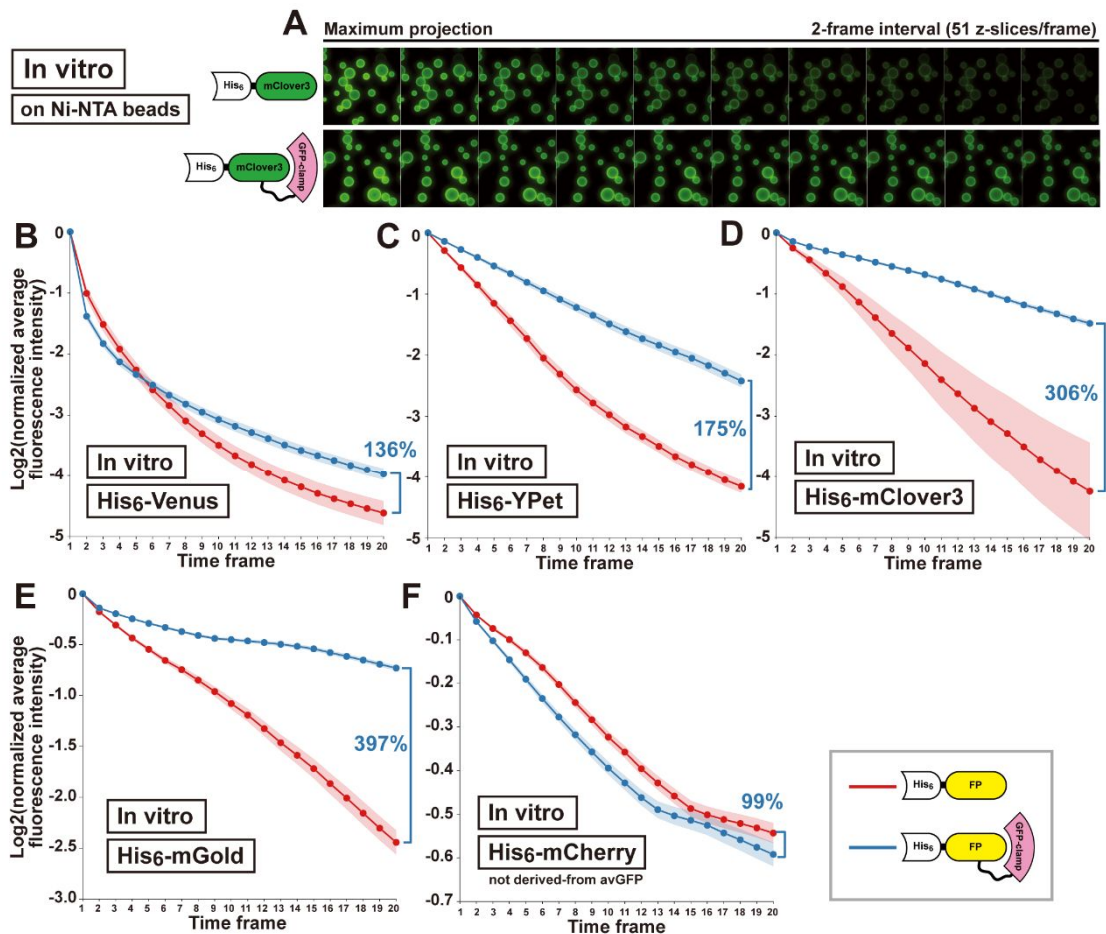


図5. GFP-clamp と融合させたオワンクラゲ GFP 由来蛍光タンパク質は in vitro で褪色遅延を示す

(2) 一本鎖 DNA 結合タンパク質 Rfa1 の可視化を利用したガイド RNA 機能性の評価手法の開発

CRISPR-Cas システムを *in vivo* で使用する際、*in vivo* でのガイド RNA (gRNA) 機能性を評価することが重要である。我々は、出芽酵母を利用して、シンプルな画像ベースの gRNA 評価手法を開発した。

一本鎖 DNA (ssDNA) 結合タンパク質である RPA (出芽酵母では Rfa1/Rfa2/Rfa3) は、DNA 二本鎖切断 (DSB) の修復時、リセクションによって生じた ssDNA 部分に集積する。Rfa1 を蛍光タンパク質 mNeonGreen (mNG) で可視化し、その輝度を観測することで、Cas-gRNA 複合体による DNA DSB 形成効率を評価することができると考えた (図 6)。

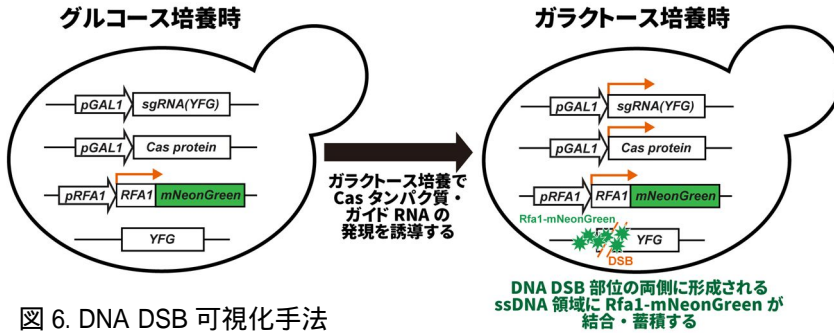
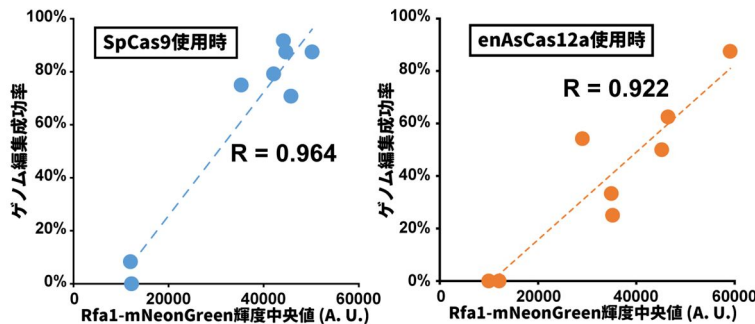


図 6. DNA DSB 可視化手法

まず、ゲノム編集成功率と Rfa1-mNG 輝度との関係性を調べた。Cas9 と Rfa1-mNG を発現する菌株で各種の gRNA を発現させ、Rfa1-mNG 輝度を測定した。同じ gRNA を用いてゲノム編集 (蛍光タンパク質遺伝子のノックイン) を実施し、その成功率を評価した。Rfa1-mNG 輝度とゲノム編集成功率の間には強い相関が見られた ($R > 0.96$)。同様の実験を Cas12a で実施した場合も強い相関が見られた ($R > 0.92$) (図 7)。

続いて、本手法を dCas ベースのアプリケーションへ応用することを試みた。dCas9-mNG を使って CUP1 アレイ (~16 コピーのタンデムリピート) 遺伝子座を可視化する系をモデルとして利用した。Cas9 と Rfa1-mNG を発現する株および dCas9-mNG を発現する株で各種の gRNA を発現させた。前者の株の Rfa1-mNG 輝度と後者の株で CUP1 アレイを可視化できた細胞の割合の間には、正の相関が観察された。Rfa1-mNG 輝度を CUP1 アレイ可視化効率の予測因子とみなした場合、その予測精度は 85%以上であった。



本手法は、オンターゲットとオフターゲットの切断を識別できない可能性が高いという短所が想定されるものの、gRNA を選抜する (特に、機能が低い gRNA を早い段階で排除する) ためのシンプルで汎用性の高い方法となり得ると考えられる。

図 7. Rfa1-mNG 輝度とゲノム編集成功率

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 Matsumoto Shunsuke, Ono Suzuka, Shinoda Saori, Kakuta Chika, Okada Satoshi, Ito Takashi, Numata Tomoyuki, Endo Toshiya	4. 巻 221
2. 論文標題 GET pathway mediates transfer of mislocalized tail-anchored proteins from mitochondria to the ER	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202104076
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202104076	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 Okada Satoshi, Doi Goro, Nakagawa Shitomi, Kusumoto Emiko, Ito Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Simple-to-use CRISPR-SpCas9/SaCas9/AsCas12a vector series for genome editing in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 G3 Genes Genomes Genetics	6. 最初と最後の頁 jkab304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/g3journal/jkab304	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27件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 武居宏明, 岡田 悟, 土井吾郎, 杉山友貴, 藤和思琴, 伊藤隆司
2. 発表標題 RTT109の欠失による出芽酵母CUP1アレイの伸長亢進
3. 学会等名 第15回日本エビジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山友貴, 岡田 悟, 伊藤隆司
2. 発表標題 Cas9変異体を用いて長大なゲノム領域の重複を誘導する
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Suchin Towa, Satoshi Okada, Takashi Ito
2. 発表標題 Catalytically inactive Cas9 attenuates DNA end resection in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田 悟, 楠元恵美子, 伊藤隆司
2. 発表標題 出芽酵母ゲノム編集向けプラスミドシリーズの拡充と多重ゲノム編集の実現
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田 悟
2. 発表標題 ゲノム編集だけじゃない！CRISPR/Cas systemsでできること
3. 学会等名 酵母研究若手の会 第8回研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山友貴, 岡田 悟, 伊藤隆司
2. 発表標題 Cas9変異体を用いて長大なゲノム領域の重複を誘導する
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 武居宏明, 岡田 悟, 土井吾郎, 杉山友貴, 藤和思琴, 伊藤隆司
2. 発表標題 Cas9ニッケースの戦略的配置による縦列反復構造の伸長
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 藤和思琴, 岡田 悟, 伊藤隆司
2. 発表標題 dCas9はDNAエンドリセクションを阻害する
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 岡田 悟, 楠元恵美子, 中川志都美, 伊藤隆司
2. 発表標題 GFP-clampはGFPに由来する蛍光タンパク質の褪色を遅延させる
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 武居 宏明, 岡田 悟, 土井 吾郎, 杉山 友貴, 藤和 思琴, 伊藤 隆司
2. 発表標題 Cas9ニッケースの戦略的配置による汎用的な遺伝子増幅法の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田 悟
2. 発表標題 蛍光タンパク質に結合するタンパク質は生細胞内での蛍光タンパク質の褪色を遅延させる可能性がある
3. 学会等名 酵母研究若手の会 第7回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山友貴, 岡田 悟, 伊藤隆司
2. 発表標題 Cas9変異体を用いてゲノム上の任意の領域の縦列反復を誘導する
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第8回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武居宏明, 岡田 悟, 土井吾郎, 杉山友貴, 藤和思琴, 伊藤隆司
2. 発表標題 Cas9ニッケースの戦略的配置による縦列反復構造の伸長
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第8回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田 悟, 土井吾郎, 楠元恵美子, 中川志都美, 伊藤隆司
2. 発表標題 RPAの可視化を利用してガイドRNAのin vivoでの機能性を評価する簡便な顕微鏡手法
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第8回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉山友貴, 岡田 悟, 伊藤隆司
2. 発表標題 nCas9を用いて任意のゲノム領域の重複誘導を実現する
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第56回研究報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田 悟, 土井吾郎, 楠元恵美子, 中川志都美, 伊藤隆司
2. 発表標題 一本鎖DNA結合タンパク質の可視化を利用してガイドRNAの機能性を評価する
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第56回研究報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Suchin Towa, Satoshi Okada, Takashi Ito
2. 発表標題 Catalytically inactive Cas9 attenuates DNA end resection in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Conference Asia Yeast and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田 悟, 楠元恵美子, 中川志都美, 伊藤隆司
2. 発表標題 GFP-clampはGFPに由来する蛍光タンパク質の褪色を遅延させる
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武居宏明, 岡田 悟, 土井吾郎, 杉山友貴, 藤和思琴, 伊藤隆司
2. 発表標題 Cas9ニッケースの戦略的配置による縦列反復構造の伸長
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉山友貴, 岡田 悟, 伊藤隆司
2. 発表標題 Cas9変異体を用いて長大なゲノム領域の重複を誘導する
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小暮 佳希, 小野 鈴花, 岡田 悟, 沼田 倫征, 遠藤 斗志也, 松本 俊介
2. 発表標題 オーキシンドェグロン法を用いた出芽酵母におけるペルオキシソーム膜タンパク質の局在解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤和思琴, 岡田 悟, 伊藤隆司
2. 発表標題 dCas9はDNAエンドリセクションを阻害する
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤和思琴, 岡田 悟, 伊藤隆司
2. 発表標題 dCas9はDNAエンドリセクションを阻害する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武居宏明, 岡田 悟, 伊藤隆司
2. 発表標題 Cas9ニッケース誘導型縦列反復構造伸長法BiTRExの応用を考える
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Sugiyama, Satoshi Okada, Takashi Ito
2. 発表標題 Strategic targeting of Cas9 nickase induces large segmental duplications
3. 学会等名 The Allied Genetics Conference 2024 (TAGC24) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Satoshi Okada, Emiko Kusumoto, Takashi Ito
2. 発表標題 Simple-to-use CRISPR-SpCas9/SaCas9/AsCas12 vector series with multiple selection markers enabling single-step multiplex genome editing in budding yeast
3. 学会等名 The Allied Genetics Conference 2024 (TAGC24) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 武居宏明, 岡田 悟, 伊藤隆司
2. 発表標題 Cas9ニッケースの複数遺伝子座への同時誘導による高度な遺伝子増幅系の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024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