

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26820362

研究課題名(和文)Gタンパク質シグナルにตอบสนองするスイッチングゲノム編集技術

研究課題名(英文)Switching genome editing technology responding to G-protein signaling

研究代表者

石井 純(Ishii, Jun)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点研究部・准教授

研究者番号：40512546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質シグナルにตอบสนองするスイッチングゲノム編集技術として、Cre/loxP組換えシステムを利用した「遺伝子が抜け落ちて代わりに別の遺伝子が発現する」系を確立した。これにより、Gタンパク質シグナルを検知して2つの遺伝子発現の「ON OFF」と「OFF ON」を同時に引き起こすことが可能となった。本技術を利用して、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)の二量体形成シグナルにตอบสนองして2つの遺伝子発現を切替えることのできるシステムを開発し、酵母内在性Ste2受容体とヒト由来セロトニン受容体(HTR1A)のホモ二量体形成や、ヒト由来アドレナリン受容体(ADRB2)のヘテロ二量体形成の検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：As the switching genome editing technology that can respond to G-protein signaling, we established the method permitting the pop-out of a gene and the alternative expression of another gene based on the Cre/loxP recombination technique. Herewith, it has enabled to induce concurrently "ON to OFF" and "OFF to ON" of two genes in concert with the detection of G-protein signaling. Using this technology, we developed the system for switching two gene expressions in response to the signal for dimer formation of G-protein coupled receptors (GPCRs); thereby, successfully detecting the homodimer formations of yeast endogenous Ste2 receptor and human serotonin receptor (HTR1A), and the heterodimer formation of human adrenergic receptor (ADRB2).

研究分野：生物化学工学

キーワード：遺伝子スイッチ ゲノム編集 Gタンパク質シグナル Gタンパク質共役型受容体 二量体形成 酵母
セロトニン受容体 アドレナリン受容体

1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は、視覚、味覚、嗅覚を含む感覚器系に加え、心拍や血圧、消化、呼吸、神経伝達、細胞増殖などあらゆる生理機能の制御に関与しており、生体制御システムを理解する上できわめて重要な受容体タンパク質である。膜タンパク質最大のファミリーを形成する GPCR は、ヒトにおいて約 800 種類存在し、細胞膜内側に存在する三量体 Gタンパク質を介して外部からの刺激 (リガンドの結合) を細胞内情報へと変換してシグナルを伝達する。このシグナル伝達を介して生体の様々な生理応答を引き起こしており、糖尿病治療薬、抗うつ薬、鎮痛薬、高血圧治療薬、アレルギー薬など実に様々な医薬品開発の分子標的としても利用されている。

ヒトにおける GPCR を介したシグナル伝達は、複数のクラスとサブクラスが存在する三量体 Gタンパク質の種類の多さやシグナルのクロストークとも相まって多様な伝達様式が生み出されており、これが様々な生理機能を制御する所以となっている。しかし、この多様なバリエーションが逆にシグナル伝達経路を複雑化する要因ともなっており、簡便かつ単純な解析方法が望まれてきた。一方で、GPCR は単量体もしくはホモ二量体で機能していると考えられてきたが、近年多くの GPCR がヘテロ二量体を形成していることが明らかとなってきており、現在では GPCR や細胞内 Gタンパク質の種類の多さに加え、このヘテロ二量体の組み合わせが生体機能調節のさらなる多様性を生み出していると考えられている。

2. 研究の目的

上述の背景から、申請者はこれまでに真核生物のモデルとしてよく利用されている出芽酵母を宿主として用いて、ヒト GPCR のシグナル伝達や二量体形成を簡便に検出できるシステムを開発してきた。具体的には、GPCR の制御機構の解析や調節因子の探索を簡便に行うため、シグナル伝達や二量体形成を転写応答性のレポーター遺伝子発現により検出できるシステムを開発している。しかし、転写応答性レポーターは検出系としては極めて有効なシステムであるものの、単純にシグナルに応答した転写の OFF → ON の切替えを行うシステムである。

そこで、GPCR シグナルに応答して、遺伝子発現の OFF → ON への切替えだけでなく、ON → OFF への逆の切替えも容易に行うことが可能な技術を開発することを考えた。この技術を開発できれば、一般的に利用されるポジティブクローンのセレクションだけでなく、ネガティブクローンのセレクションを様々なレポータータンパク質を利用して簡便かつ制限無しに行うことが可能となる。つまり、GPCR シグナル検出においてポジティブセレクションを行うことで作動薬を簡便

にスクリーニングできることに加え、ネガティブセレクション系を開発することでタンパク質機能に重大な欠陥を与える変異点や拮抗薬を簡便にスクリーニングできるようになるため、極めて有効な創薬候補物質の探索手法となる。

本研究では、狙った通りにレポーターの ON と OFF を切り替えることのできるシステムとして、まず特定の配列を脱落させてゲノム上の 2 つの遺伝子配置を編集 (再配置) するための手法を開発し、さらに開発した編集技術をもとに、“GPCR の二量体形成シグナルに応答してゲノムが自動的に編集される技術”を開発することを目的とした (図 1)。

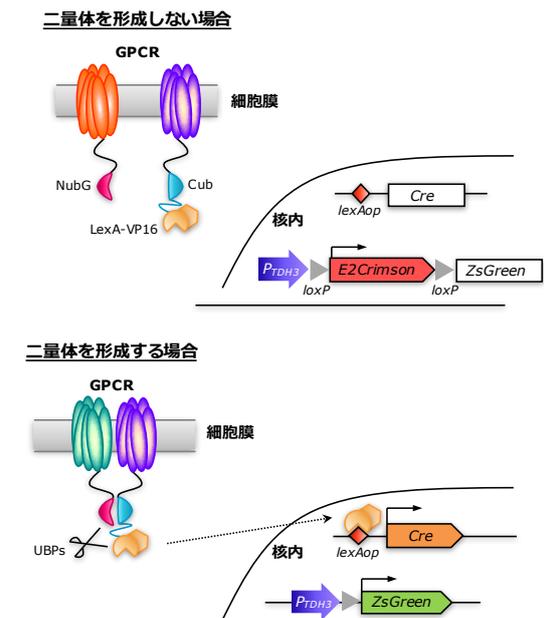


図 1. GPCR の二量体形成シグナルに応答してゲノムを自動的に編集(再配置)

3. 研究の方法

狙った通りにレポーターの ON と OFF をそれぞれ切り替えることのできるシステムとして、「遺伝子 A が抜け落ちて代わりに遺伝子 B が発現する」ゲノム編集パターンを確立することとした (図 2)。赤色蛍光タンパク質 E2-Crimson および緑色蛍光タンパク質 ZsGreen をコードする遺伝子をレポーターとして利用した。強力な恒常発現型の TDH3 プロモーター下流に、両端に loxP 配列を挟み込む形で付加した赤色蛍光タンパク質 E2-Crimson 遺伝子を挿入し、さらにその下流側に緑色蛍光タンパク質 ZsGreen 遺伝子を挿入したレポーター遺伝子発現カセットを作成した。さらに、Cre 恒常発現カセットを作成し、これらを酵母細胞に導入した。作成した酵母細胞を培養し、赤色と緑色の蛍光強度をフローサイトメーターにより測定することで、Cre が発現している場合にゲノムが狙い通りに編集されて E2-Crimson と ZsGreen の発現の ON と OFF がそれぞれ切り替わっているかを確認した。

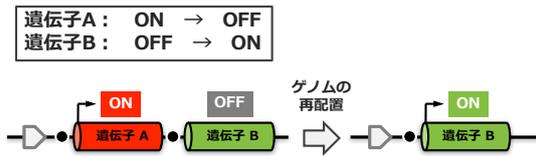


図 2. レポーター発現切替えのためのゲノム編集（再配置）のパターン

さらに、GPCR 二量体形成シグナルに応答するゲノム編集技術を確立するために、前述で作出した P_{TDH3} -loxP-E2-Crimson-loxP-ZsGreen 配列を含む酵母細胞に、*lexA* オペレーター (*lexAop*) の制御下で *Cre* 遺伝子の発現を誘導する配列を導入した。作出した酵母を用いて、LexA-VP16 人工転写因子とユビキチン分割体 (Cub と Nub 変異体) を介した *Cre* の発現に応じて E2-Crimson と ZsGreen の発現の切替えが起こるかを確かめた。Alg5-Cub-LexA-VP16 と Alg5-NubI を発現するポジティブコントロールプラスミドで上述の酵母を形質転換し、フローサイトメーターにより赤色と緑色の蛍光強度を測定した。

GPCR のホモ二量体形成に対する応答を確認するために、酵母内在性受容体 (Ste2) とセロトニン受容体 (HTR1A) がそれぞれ Cub-LexA-VP16 と NubG との融合タンパク質として発現するプラスミドを作出した。また、GPCR のヘテロ二量体形成に対する応答を確認するために、アドレナリン受容体 (ADRB2) を Cub-LexA-VP16 と、アンジオテンシン受容体 (AGTR1) やソマトスタチン受容体 (SSTR2) を NubG と融合して発現するプラスミドを作出した。これらの Cub-LexA-VP16 と NubG を含むプラスミドで P_{TDH3} -loxP-E2-Crimson-loxP-ZsGreen 配列と *lexAop*-*Cre* 配列を導入した酵母細胞を共形質転換した。この際に、 P_{TDH3} -loxP-E2-Crimson-loxP-ZsGreen 配列をゲノム組み込みだけでなく、マルチコピー型プラスミドに乗せ替えたプラスミドも作出し、*lexAop*-*Cre* 配列をゲノムに組み込んだ株に導入した酵母も作出して共形質転換に用いた。これらの酵母を培養し、それぞれ二量体形成シグナルに応答した遺伝子発現の切替えが起こっているかを確かめるために、フローサイトメーターにより赤色と緑色の蛍光強度を測定した。

4. 研究成果

ゲノム上の 2 つの遺伝子の配置を編集（再配置）するための手法として、特定の遺伝子配列を脱落することのできる *Cre* リコンビナーゼと *loxP* 配列を利用した。ゲノム上の遺伝子（もしくは塩基配列）の両端に 34bp から成る *loxP* 配列を重複するよう配置しておくことで、*Cre* リコンビナーゼの作用により *loxP* 間での相同組換えが起こり、挟まれた配列を削除することができる。この *Cre* / *loxP* による組換えの原理を利用して、*Cre* / *loxP* 組換え後に、「遺伝子 A が抜け落ちて代わりに

遺伝子 B が発現する」ゲノム編集パターンの確立を行った（図 2）。

遺伝子 A として E2-Crimson を遺伝子 B として ZsGreen を利用した。 P_{TDH3} -loxP-E2-Crimson-loxP-ZsGreen 配列をゲノムに組み込んだ酵母細胞に *Cre* 恒常発現プラスミドを導入して蛍光強度の測定を行ったところ、*Cre* を発現していない細胞では赤色蛍光のみを発したのに対し、*Cre* を恒常発現した細胞では緑色蛍光のみを発した（図 3）。このことから、*Cre* の発現により *loxP* 配列により挟まれた E2-Crimson 遺伝子が脱落し、代わりに *TDH3* プロモーター下流に ZsGreen 遺伝子が結合されることで、これらのレポーター遺伝子発現の ON と OFF がそれぞれ切り替わり、狙い通りにゲノム上の遺伝子が再配置されていることを確認した。

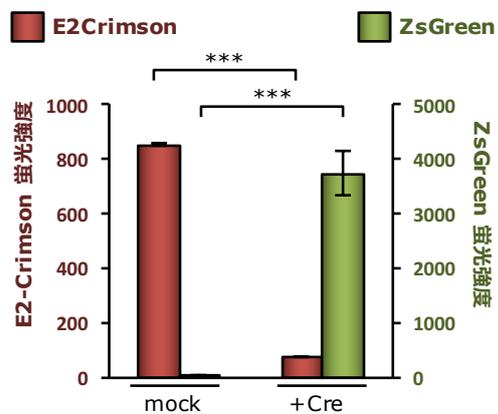


図 3. *Cre* 恒常発現による E2-Crimson と ZsGreen の再配置と発現切替え

次に、GPCR 二量体形成シグナルに応答してゲノム編集プログラムが実行される系を確立するために、まず LexA-VP16 人工転写因子の核内移行に伴い発現が誘導される *lexAop* の制御下で *Cre* が発現するように酵母を改変した。 P_{TDH3} -loxP-E2-Crimson-loxP-ZsGreen 配列と *lexAop*-*Cre* 配列をゲノムに組み込んだ酵母を作出し、Alg5-Cub-LexA-VP16 と Alg5-NubI を発現するポジティブコントロールプラスミドを導入して蛍光強度の測定を行ったところ、Alg5-Cub-LexA-VP16 と Alg5-NubI を発現する酵母のみ赤色蛍光が消失し、緑色蛍光を発することが確認された（図 4）。これは、膜タンパク質である Alg5 と融合された Cub-LexA-VP16 は通常では膜に局在するが、変異型の NubI が存在すると Cub と常に相互作用してユビキチン活性を回復するため、LexA-VP16 人工転写因子が切断されて核内に移行する。この LexA-VP16 が核内において *lexAop* と結合して下流の転写を活性化するため、*Cre* が発現して E2-Crimson の脱落と ZsGreen の配置転換による発現スイッチが狙い通りに起こったものと示唆される。

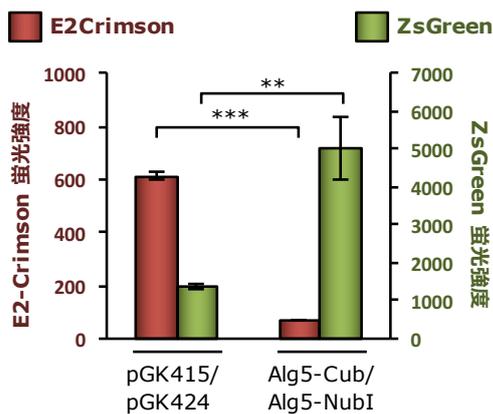


図4. *lexAop*によるCre誘導発現系でのE2-CrimsonとZsGreenの発現切替え

上述で構築した酵母細胞を用いてGPCRのホモ二量体形成に反応したレポーター発現の切替えが起こるかどうかを酵母内在性受容体Ste2により確認した。Ste2はユビキチン分割体の相互作用を阻害しないよう二量体形成には影響しないことが明らかなC末端を削除した欠失変異体(Ste2ΔC)を用いた。コントロールには、Ste2と相互作用しないHxt1膜タンパク質を用いた。Ste2ΔC-Cub-LexA-VP16とSte2ΔC-NubGもしくはHxt1-NubGを発現するプラスミドを P_{TDH3} -*loxP*-E2-Crimson-*loxP*-ZsGreen配列と*lexAop*-Cre配列を組み込んだ酵母に導入し蛍光強度の測定を行ったところ、Ste2ΔC-Cub-LexA-VP16とHxt1-NubGを発現する酵母は赤色蛍光を発したのに対し、Ste2ΔC-Cub-LexA-VP16とSte2ΔC-NubGを発現する酵母は緑色蛍光を発した(図5)。この結果はSte2ΔCがホモ二量体を形成してE2-CrimsonとZsGreenの発現スイッチが起こったことを示しており、GPCRのホモ二量体形成によりLexA-VP16の切断と核内でのCre遺伝子の発現誘導が狙い通りに引き起こされたことを示唆している。

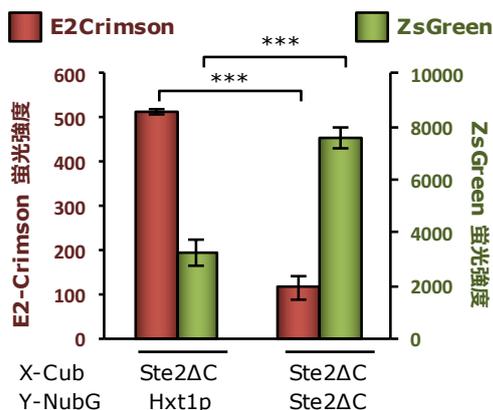


図5. Ste2のホモ二量体形成に反応したE2-CrimsonとZsGreenの発現切替え

ここで、赤色蛍光タンパク質であるE2-Crimsonの蛍光強度が弱かったため、 P_{TDH3} -*loxP*-E2-Crimson-*loxP*-ZsGreenカセットをゲノムからマルチコピー型プラスミドに乗せ替えた

プラスミドを作成して*lexAop*-Cre配列をゲノムに組み込んだ酵母に導入した。この酵母にSte2ΔC受容体を用いてホモ二量体形成を検出したところ、赤色蛍光強度の劇的な改善が見られた(図6)。また、Ste2の代わりにヒト由来セロトニン受容体であるHTR1Aを用いてホモ二量体形成を検出できるかどうかを評価したところ、HTR1Aでも同様にホモ二量体形成によりレポーター発現の切替えが起こることが確認された(図7)。

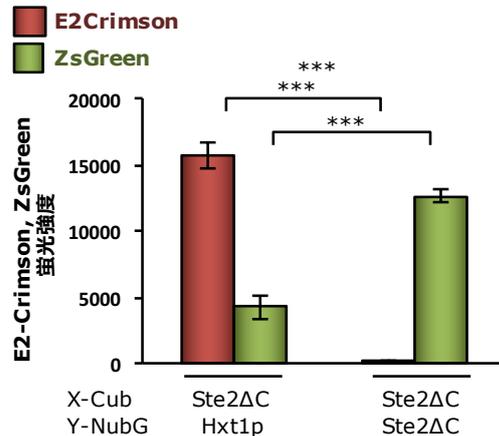


図6. マルチコピー型レポータープラスミドによる蛍光強度の向上

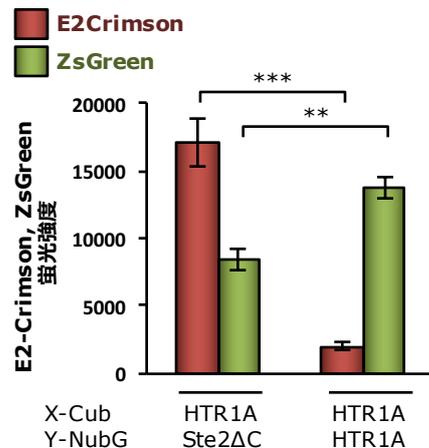


図7. ヒトHTR1Aのホモ二量体形成に反応したE2-CrimsonとZsGreenの発現切替え

さらに、Cub-LexA-VP16をヒト由来アドレナリン受容体であるADRB2と融合し、NubGをアンジオテンシン受容体AGTR1やソマトスタチン受容体SSTR2と融合して、*lexAop*-Cre配列を組み込んだ酵母に P_{TDH3} -*loxP*-E2-Crimson-*loxP*-ZsGreen発現マルチコピー型プラスミドと共に導入したところ、赤色蛍光は観察されず緑色蛍光のみが観察された(図8)。ヘテロマーを組まない組み合わせであるADRB2とSte2ΔCを用いた場合、コントロールと同程度の赤色蛍光が観察されたことから、ADRB2とAGTR1もしくはSSTR2のヘテロ二量体形成を検出してレポーター発現を切り替えることができた。

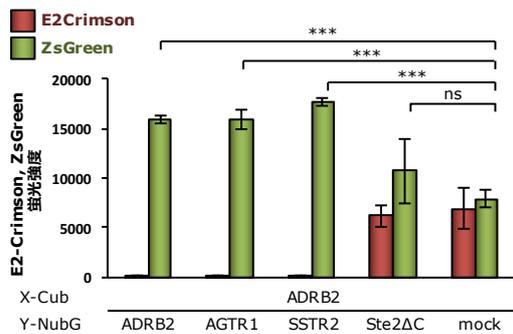


図 8. ヒト ADRB2 のヘテロ二量体に応答した E2-Crimson と ZsGreen の発現切替え

以上の結果より、GPCR の二量体形成シグナルに応答してゲノムが自動的に編集されてレポーターの ON と OFF を切替えが可能なシステムを開発することに成功した。本技術を応用することで、創薬候補となる変異点や阻害剤の簡便なスクリーニングが可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Yasuyuki Nakamura, Takamichi Hashimoto, Jun Ishii, Akihiko Kondo. Dual-color reporter switching system to discern dimer formations of G-protein-coupled receptors using Cre/loxP site-specific recombination in yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, 査読あり, 2016, in press
DOI: 10.1002/bit.25974
- ② Yasuyuki Nakamura, Jun Ishii, Akihiko Kondo. Current techniques for studying oligomer formations of G-protein-coupled receptors using mammalian and yeast cells. *Current Medicinal Chemistry*, 査読あり, 23, 2016, 1605-1619
DOI: 10.2174/0929867323666160407113353
- ③ Misato Kaishima, Jun Ishii, Nobuo Fukuda, Akihiko Kondo. Gy recruitment systems specifically select PPI and affinity-enhanced candidate proteins that interact with membrane protein targets. *Scientific Reports*, 査読あり, 5, 2015, 16723,
DOI: 10.1038/srep16723
- ④ Yasuyuki Nakamura, Jun Ishii, Akihiko Kondo. Applications of yeast-based signaling sensor for characterization of antagonist and analysis of site-directed mutants of the human serotonin 1A receptor. *Biotechnology and Bioengineering*, 査読あり, 112, 2015, 1906-1915
DOI: 10.1002/bit.25597
- ⑤ Yasuyuki Nakamura, Jun Ishii, Akihiko

Kondo. Signaling assays for detection of human G-protein-coupled receptors in yeast. *Bio-Protocol*, 査読あり, 4, 2014
<http://www.bio-protocol.org/e1206>

[学会発表] (計 7 件)

- ① Jun Ishii, Akihiko Kondo. High-resolution, quantitative analysis for measuring heterogeneities of G-protein signaling at single-cell levels in yeast. *The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015)*. 2015, Dec 15–20, Honolulu (USA)
- ② 海嶋美里, 福田展雄, 石井純, 近藤昭彦, 酵母シグナル伝達を用いた標的膜タンパク質に対するバイオメディカル分子スクリーニングシステム, 第 33 回イーストワークショップ, 2015 年 11 月 13-14 日, せとうち児島ホテル (岡山県・倉敷市)
- ③ 橋弘樹, 中村泰之, 石井純, 近藤昭彦, ヒトニューロテンシン受容体のリガンド検出のための酵母バイオセンサーの開発, 第 33 回イーストワークショップ, 2015 年 11 月 13-14 日, せとうち児島ホテル (岡山県・倉敷市)
- ④ 橋弘樹, 中村泰之, 石井純, 近藤昭彦, ヒトニューロテンシン受容体におけるリガンド探索のための酵母バイオセンサー, 第 67 回日本生物工学会大会, 2015 年 10 月 26-28 日, 鹿児島城山観光ホテル (鹿児島・鹿児島市)
- ⑤ 橋弘樹, 中村泰之, 石井純, 近藤昭彦, 1 細胞スクリーニングに向けたヒト GPCR アッセイ用酵母バイオセンサー開発, 生物学若手研究者の集い 夏のセミナー 2015, 2015 年 7 月 11-12 日, タナベ名古屋研修センター (愛知県・北名古屋市)
- ⑥ 橋本貴理, 中村泰之, 石井純, 近藤昭彦, G タンパク質共役型受容体の二量体形成検出のためのゲノム編集技術の開発, 第 66 回日本生物工学会大会, 2014 年 9 月 9-11 日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
- ⑦ 橋本貴理, 中村泰之, 石井純, 近藤昭彦, G 蛋白質共役型受容体の二量体形成に応答して機能するゲノム編集技術の開発, 生物学若手研究者の集い 夏のセミナー 2014, 2014 年 7 月 12-13 日, 神戸市立神戸セミナーハウス (兵庫県・神戸市)

[その他]

ホームページ等

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 純 (ISHII, Jun)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点研究部・准教授

研究者番号: 67543567