

令和元年5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14603

研究課題名(和文)細胞内2進カウンターの開発と遺伝子発現履歴解析への応用

研究課題名(英文) Development of intracellular binary counter for recording the gene expression change

研究代表者

小野寺 康仁 (Onodera, Yasuhito)

北海道大学・医学研究科・講師

研究者番号：90435561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：個々の細胞で目的とする遺伝子発現のON/OFFの変化を記録する特殊な遺伝子構築のセットを設計し、その作成を行った。より多くの回数の変化を記録できるようにするため、2進カウンターの様式を採用した。これらが想定どおりに動作するためには、各構築が細胞のゲノム内に単一コピーずつ導入される必要がある。現状では、ゲノム編集および単一細胞からのクローニングが必要となり、その過程では細胞の「不均一性」の喪失が避けられず、癌細胞等を対象とした場合、その後の解析に大きな影響を与えることが危惧された。そこで上記と並行して複数遺伝子構築の導入を高効率で選択できる新規スクリーニング系の確立を試み、完成に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現状では、遺伝子発現の増減を解析する手法は確立されているものの、その可塑性についての解析法は非常に限定的であり、単一細胞レベルではさらに困難である。がん細胞のような「不均一性」を特徴とする細胞集団の場合、解析対象とする細胞の遺伝子発現変化を長期間追跡することはほぼ不可能である。これを定量的に解析する手法が確立されれば、可塑性の調節を原理としたがん治療などが可能になると考えられる。また、本研究で必須となる遺伝子導入後の選択に関する技術は、今回行ったようなゲノム編集を要する遺伝子導入のみならず、一般に広く用いられている遺伝子導入後の安定発現株の樹立においても非常に有用なものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we sought to develop a set of genetic constructions which records the change of the expression (ON/OFF) of the gene of interest in each cell. In order to record as many times of the expression change as possible, we aimed for the construction of the binary counter. For the proper function, these constructs require the single copy integration into the target cell genome, which is currently achieved by genome editing followed by single cell cloning. In these processes, however, heterogeneity of the cells, which is also a primary subject of this study, will be inevitably compromised. In particular, for the analyses of cancer cells, loss of heterogeneity may lead to contradictory results. Therefore, we also sought to establish a novel genetic markers by which single copy integration of multiple genetic constructs can be easily achieved.

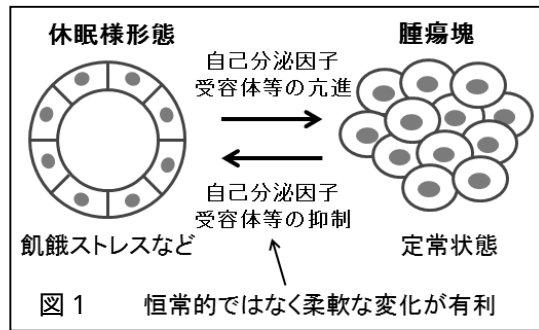
研究分野：分子生物学、分子腫瘍学

キーワード：遺伝子発現制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々ながん種において、性質を分類するための「サブタイプ」が定義されているものの、抗がん治療などのストレスは、がん細胞の「表現型転換 (phenotype switching)」を引き起こすことが示唆されている (Yu et al, Science 2013 339:580-4; Kamper et al, Cancer Res 2014; 74:5937-41 など)。申請者は乳腺上皮細胞の3次元培養系を用いて、飢餓ストレス下の癌細胞は自己分泌因子によるシグナルを抑制し正常細胞とよく似た「休眠状態」に移行することや、ストレス解除によって再び元の表現型に戻ること (Onodera et al, J Clin Invest 2014; 124: 367-84)、



ストレス下で強制的にシグナルを活性化すると、むしろ細胞死が誘導されること (論文準備中) を見出した。がん細胞が代謝ストレスや、抗がん治療によるストレスに耐えながら生存および増殖を続けるとき、上記のような表現型の転換が起こるのであれば、遺伝子発現の可逆的・可塑的な変化も同時に起こっており、そのような可塑性・柔軟性は、がん細胞にとっても有利な性質であると考えられる (図1)。遺伝子発現の可逆的・可塑的な変化を網羅的に同定することができれば、がんの治療耐性の本態解明へと繋がる重要な知見が得られるかもしれない。

がん細胞集団の「不均一性 (heterogeneity)」を考慮すると、遺伝子発現解析は1細胞レベルで行うことが望ましい。しかしながら、破碎・溶解などの不可逆的な実験操作を伴う現行の解析では経時変化を追うことはできず、発現変動が一過性の場合、それを捉えられるか否かはタイミング次第である。イメージング等に基づく「非破壊」の1細胞遺伝子解析法が研究されているものの、確率的過程であるがんの進展においてどの細胞が選択されて生存・増殖を続けるのか前もって知ることはできないため、全細胞の挙動を追う必要が生じてしまうが、それは事実上不可能である。以上の背景から、申請者は遺伝子発現変化の履歴をゲノム上に記録しておき、過去に遡って解析するためのシステムが必要であるとの考えに至った。

2. 研究の目的

上述のように、がん細胞の集団が不均一性 (heterogeneity) を持つことや、抗がん剤の処理によって柔軟に表現型を転換すること (phenotype switching) は、がん細胞の治療耐性に深く関わっていると考えられている。不均一性に対応するための「一細胞解析技術」は盛んに研究されているものの、可逆的・可塑的に起こる表現型転換に伴う遺伝子発現の一過性の増減には、現状では十分対応できていない。以上を勘案して、本研究では細胞内での遺伝子発現のON/OFFをその都度ゲノムDNAに記録しておき、過去に遡ってその頻度を解析することを可能とするシステムの確立を試みた。本申請の範囲では、細胞内で作動する「フリップフロップ2進カウンタ」をデザインし、これをN個実装することで遺伝子発現の変動を2N回記録することのできる、新たなシステムの構築を目標とした。

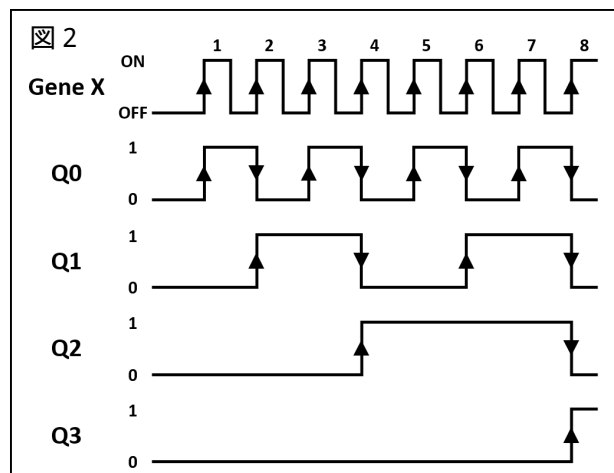
また、このようなシステムが想定通りに動作するためには、当該遺伝子構築のセットが1コピーずつ、目的の細胞のゲノム中に存在する必要がある。現状ではゲノム編集および1細胞からのクローニングが必須となるが、その過程では本研究が解析しようとする不均一性が大きく損なわれることが危惧される。その対策として、複数個の遺伝子構築が1コピーずつ安定導入された細胞を効率良く選択できるような新規薬剤マーカーを確立し、上記の構築の動作の確認やその後の解析に使用することとした。

3. 研究の方法

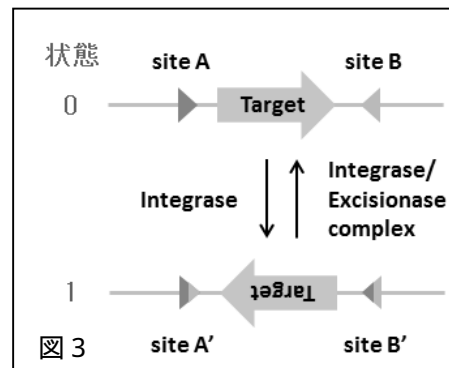
・2進カウンタの設計

図2に、2進カウンタの動き (8回目まで) の概略を示す。Q0~Q3は、それぞれカウンタの1桁目~4桁目を表しており、2つの状態 (「0」または「1」) を取る。QNが状態「0」のときは0 (回) を、「1」のときは 2^N (回) を意味する。各桁の示す数字を足し合わせることで、変動回数を読み取ることができる。各桁が状態「1」であるときにそれぞれ異なる波長の蛍光タンパク質が発現するようにデザインすることで、各桁の状態を細胞単位で読み取ることが可能となる。

上記のような、「0」または「1」



の状態を遷移する「フリップフロップ機構」は、図3に示すような Integrase (Int) と Excisionase (Ex) の組み合わせによって構築できる。様々な生物に由来する Int および Ex の遺伝子を手し、哺乳類細胞(ヒトおよびマウス)で活性を確認する。蛍光タンパク質遺伝子を各酵素の認識配列で挟み込み、Int の存在下で反転し(状態「1」) Int および Ex の同時存在下で再び元の向き(状態「0」)に戻るようしておく。認識配列の外側にプロモーターを配置して、状態「1」の場合のみ蛍光蛋白質が発現するようデザインする。この構築を哺乳類細胞のゲノムの特定領域(ROSA26 など)に組み込み、Int および Ex を一過性に発現させて想定通りに動作することを確認する。Ex を状態「1」のときに発現するようにデザインしておくこと、Int の発現を契機として状態遷移が起こるようにできる。



目的の遺伝子(Gene X)の発現が OFF から ON に切り替わるとき(上向きの矢印) Q0 は「0」から「1」またはその逆方向に変化する。ただし、Q1 以降は、一つ下の位が状態「1」から「0」へと戻るとき(下向きの矢印)に、状態変化が起こるようにする必要がある(図2)。このような「状態が変化したこと」による転写の活性化を可能にするため、転写活性化因子 RegN とそれによって特異的に活性化されるプロモーターPro(N)のペアを利用する。QN が状態「1」のときに Reg(N)を発現し、状態が「0」に変化した直後に残存する Reg(N)により Pro(N)の下流で Int(N+1)が発現するようにデザインすると、「1」から「0」への状態変化を契機として次の位の状態変化を起こすことができる。Q0 については、Gene X の発現が ON になった場合に Int0 が発現するようしておくことで、状態遷移を連動させることが可能である。

・遺伝子発現検出ユニットの調整

目的遺伝子 Gene X の発現が ON および OFF の場合にそれぞれ転写活性化が起こるような制御因子およびプロモーターのペア RegX(ON)・ProX(ON)と RegX(OFF)・ProX(OFF)については、先行研究についてプロトタイプを作成済みである。互いに転写活性や mRNA 安定性を負に制御しあうような形式となっており、制御の強さを調節することによってバランスを調節することが可能である。上記の構築の動作確認において、発現の ON/OFF を任意に行うために Cumate switch プロモーターを用いるが、それに適したバランスの調節を行う。また、癌幹細胞特異的である SORE6 プロモーター(Tang et al, Stem Cell Reports. 2015; 4: 155-69)についても、同様の調整を行う。

・新規多重選択マーカーの作製

上記の構築が正しく動作するためには、それぞれが1コピーずつゲノムに導入されていることが望ましい。複数導入され、一部が状態遷移しないままになると、遺伝子発現変化の履歴の読み取りが非常に困難になり、回数のカウント自体にも影響が生じる。各要素を1コピーずつゲノムに導入するためには、相同遺伝子座に別々の要素が組み込まれた細胞を選択する様式が最も簡便であると思われる。それぞれに別々の薬剤マーカー等を組み込み、選択を2重に行うことで、両遺伝子座で遺伝子導入が起こった細胞が高効率で得られることが報告されている(Liu et al, J Biol Chem. 2017; 292: 5624-33)。一般に用いられている選択用薬剤の多くは偽陽性が多いため(Nakatake et al, BMC Biotechnol. 2013; 13:64)、多重選択を行うことで望ましくない状態の細胞の割合が非常に多くなることが示唆される。そこで、比較的選択効率の良い薬剤の耐性遺伝子について「分割型」のものを作製する。細胞内で再構成されることによってはじめて当該薬剤に対する代謝活性が生じるため、全ての要素を持つ細胞を単一の薬剤で選択することが可能となる。

4. 研究成果

・2進カウンターの構築

上述のような設計に基づき、2進カウンターを構成する要素の構築を完了した。フリップフロップ機構等の動作確認は、ウイルスやトランスポゾンによる安定導入によっても十分確認できるが、「桁上げ」に関わる機構については、前述のように各要素が1コピーずつ導入された状態でなければ正しく動作しない。そのため、ゲノム編集および1細胞からのクローニングによって適切な状態の細胞を選び出し、動作確認を行うこととした。これまでのところ、桁上がり機構の部分の動作が不安定であることが示唆されている。一つ下の桁が ON から OFF に移行する際に RegN が想定よりも早く分解されてしまうためである可能性があるため、発現量の増大や別の種類の転写活性化因子を用いることで解決を試みる予定である。

・遺伝子発現検出ユニットの調整

上述のようなバランス調整を完了し、プロモーターの ON/OFF を明確に分離できることを確認した。たとえば SORE6 プロモーターを用いた場合、多くの細胞において癌幹細胞様の性質を

示すもの(緑)とそうでないもの(赤)とが明確であり、両方とも発現しているような中間状態の細胞が非常に少ないことを確認できている(図4)。

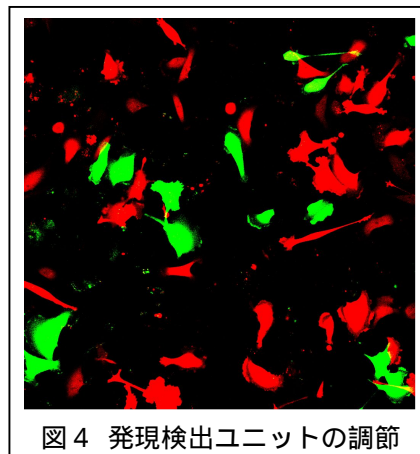


図4 発現検出ユニットの調節

・新規多重選択マーカーの作製

代表的な薬剤耐性遺伝子について、ロイシンジッパーや、scFv とその標的配列を用いた2量体化技術等(Jerome and Muller, Gene Ther. 2001; 8:725-9、Harmansa and Affolter, Development. 2018; 145 など)を用いて複数個に分割することを試みた。これにより、細胞への安定発現により十分な薬剤耐性を示す分割型の薬剤マーカーを得ることができた。これを用いた選択で得られた細胞群については、いずれも99%以上の効率で2つの遺伝子構築がゲノムに組み込まれたものであった。なお、この技術については本研究での使用に限らず非常に汎用性の高いものであり、遺伝子発現調節を行う研究全般において非常に有用なものであると考えている。上記の内容とは別にして、特許申請や学術雑誌への投稿を予定している。

・その他の論文発表について

本研究の過程で得られた様々な遺伝子構築を用いたベクターについては他の研究においても有効に活用し、いくつかについては論文発表に至っている(「5. 主な発表論文等」参照)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

1. Mazaki Y, Takada S, Nio-Kobayashi J, Maekawa S, Higashi T, Onodera Y, Sabe H. Mitofusin 2 is involved in chemotaxis of neutrophil-like differentiated HL-60 cells. Biochem Biophys Res Commun. 2019 Jun 4;513(3):708-713. (査読有)
2. Onodera Y, Nam JM, Horikawa M, Shirato H, Sabe H. Arf6-driven cell invasion is intrinsically linked to TRAK1-mediated mitochondrial anterograde trafficking to avoid oxidative catastrophe. Nat Commun. 2018 Jul 11;9(1):2682. (査読有)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。