

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01388

研究課題名(和文) タンパク質 DNAハイブリッド分子ナノ構造体導入による細胞リプログラミング

研究課題名(英文) Construction of Nanostructure with DNA-protein hybrid molecules for cell reprogramming

研究代表者

三重 正和 (Mie, Masayasu)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：40334528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では線維芽細胞のような簡便に取得可能な細胞から組織を構成する特殊な細胞へのリプログラミングを誘導する手法の開発を目的とした。細胞のリプログラミングを誘導するためには、数種類の転写因子と呼ばれるタンパク質を細胞内に導入しなければならない。本研究では、同一の細胞内に複数種類のタンパク質を導入可能であるかを検討し、その実現の可能性を明らかにした。また、ここでは数種類のタンパク質を、DNAを介して一体化する技術の開発に取り組み、酵素を用いてDNAとタンパク質を簡便に結合する新たな手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞のリプログラミングは、再生医療や組織工学分野において多大な貢献をするものと考えられている。しかしながら、遺伝子の導入による細胞のリプログラミングは、細胞の癌化など安全性の面に問題がある。本研究で得られた成果は、遺伝子導入よりも安全性の高いタンパク質導入によりリプログラミングの効率を高めることが期待出来ることから、その社会的意義は大きい。また、ここで開発した酵素を用いたDNAとタンパク質の結合手法は、DNA構造体に機能性タンパク質を簡便に導入することを可能とする。したがって、その学術的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：In this research, a novel method for cell reprogramming by using DNA-protein hybrid molecules is developed. To induce cellular reprogramming, combinations of transcription factors should be introduced into cells. To form complex of transcription factors, DNA-protein hybrid molecules are focused. Firstly, to clarify whether combinations of protein can be introduced into a cell, transcription factor combined with Green fluorescence protein was introduced into cells. From the results, it was clarified that combination of protein which formed complex can be introduced into cells. Secondly, a new method for construction of DNA-protein hybrid molecule is developed. By fusing a protein of interest to replication initiator protein, DNA-protein hybrid molecules can be constructed.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：DNA-タンパク質ハイブリッド分子 Rep 転写因子 リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

細胞への転写因子導入による分化転換を含むリプログラミングは、組織工学において目的細胞を取得するための重要な基盤技術である。しかしながら、遺伝子導入によるリプログラミングは、レトロウイルスの性質により生じるゲノムへの導入遺伝子のインテグレーションに起因する細胞の腫瘍化リスクを有し、得られた細胞の医療への適用を困難なものとしている。このリスクを回避する手法の一つとして、タンパク質導入法がある。転写因子をタンパク質として導入すれば、ウイルスを利用した遺伝子導入法に比べ、腫瘍化リスクの低いリプログラミング細胞を取得することが出来るものと考えられる。しかしながら、タンパク質導入によるリプログラミングの報告例は非常に少なく、その効率も他の手法に比べ非常に低い。iPS 細胞の創製やダイレクトリプログラミングの多くは、複数種類の転写因子の導入を必要とする。そこで複数種類の転写因子タンパク質の同一細胞への導入確立を向上させることが出来れば、転写因子タンパク質導入による細胞のリプログラミング効率を向上させるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質導入による効率的な細胞のリプログラミングの実現を目指し、複数種類の転写因子タンパク質を転写因子タンパク質-DNA ハイブリッド分子からなるナノ構造体として細胞内に導入し、細胞をリプログラミングすることを目的とする。本研究の概念図を Fig. 1 に示す。ここでは porcine circovirus type2 (PCV2)由来 Rep を利用した手法により種々の転写因子タンパク質と DNA のハイブリッド分子を作製し、DNA のハイブリダイゼーション能を利用して、単一分子上に種々の転写因子を提示したナノ構造体を形成させ、細胞内に導入する。

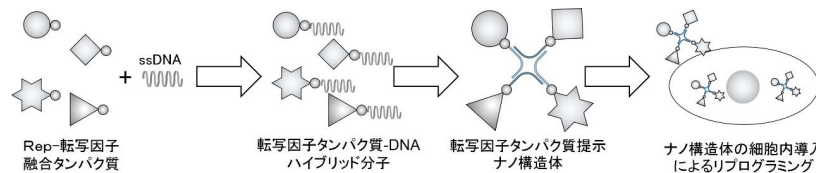


Fig. 1 本研究の概念図

3. 研究の方法

(1) PCV2 Rep を利用した DNA-タンパク質ハイブリッド分子構築法の開発

PCV2 Rep の有する DNA 結合能を利用し、目的タンパク質と DNA のハイブリッド分子が構築可能であるかを検討した。PCV2 Rep の活性ドメイン (以降 Rep と表す) と NanoLuc の融合タンパク質を構築し、融合タンパク質における Rep の DNA 結合能および NanoLuc の活性が融合後も保持されているかを評価した。また、Rep の最小化を図るために活性に影響しないと考えられる N 末端および C 末端の配列を欠損した Rep の欠損変異体を構築し、その活性評価を行った。さらに、構築した DNA-タンパク質ハイブリッド分子の DNA のハイブリダイゼーション能を利用して DNA-タンパク質ハイブリッド分子同士の複合体形成が可能であるかを検討した。

(2) 転写因子複合体の細胞内導入評価

ドーパミン作動性ニューロンへのリプログラミングを目指し、転写因子 Ascl-1 および Nurr1 の発現を、大腸菌発現系を用いて行った。得られたタンパク質を、蛍光標識し細胞内導入能を評価した。また、coiled-coil 構造を形成するペプチド配列を融合した転写因子および緑色蛍光タンパク質 (GFP) を構築し、coiled-coil 構造を介して形成された複合体が細胞内に導入可能であるかを検討した。

4. 研究成果

(1) PCV2 Rep を利用した DNA-タンパク質ハイブリッド分子構築法の開発

PCV2 Rep の活性ドメイン (1~116) に NanoLuc を N 末端あるいは C 末端側に融合したタンパク質を遺伝子工学的に作製し、大腸菌を用いて発現した。精製後、PCV2 Rep の認識配列を有する一本鎖 DNA (ssDNA) と Mg^{2+} 存在下において反応させたと。その結果、NanoLuc を Rep の N 末端あるいは C 末端のいずれに融合した場合でも、DNA - タンパク質のハイブリッド分子

形成および NanoLuc の発光活性が確認された (Fig.2)。このことから、Rep のいずれの末端に目的タンパク質を融合しても、その機能は保持されることが明らかとなった。

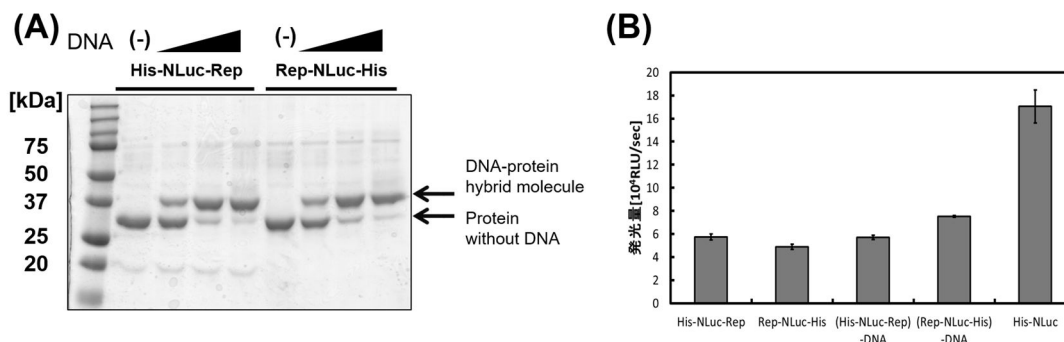


Fig.2 Rep-NanoLuc 融合タンパク質の活性評価 (A) DNA 結合能評価 (B) NanoLuc 活性評価

また、ここで構築した融合タンパク質は、DNA アプタマーと組み合わせることにより分子検出システムとして利用であること、この手法により構築した elastin-like peptide (ELP) と DNA ハイブリッド分子から DNA 提示ナノミセルが構築可能であることが明らかになった。

次に、Rep の活性に関与しないと予測される N 末端および C 末端のアミノ酸配列を欠損させた Rep の欠損体を遺伝子工学的に作製した。その結果、両末端のアミノ酸配列を欠損させても、Rep は DNA 結合能を保持していることが示された。

次に、DNA-タンパク質ハイブリッド分子同士が DNA のハイブリダイゼーション能により複合体を形成するかを評価した。ここでは、複合体形成を簡便に評価するために抗体結合ドメインである Protein G の融合タンパク質からなる DNA-タンパク質ハイブリッド分子を構築した。抗体を固相上に吸着させ DNA-Protein G ハイブリッド分子を結合させた後、このハイブリッド分子の DNA と相補的な DNA 配列を有する DNA-NanoLuc ハイブリッド分子を加え、洗浄後、NanoLuc の活性を測定した。その結果、NanoLuc 活性が確認されたことから、ハイブリッド分子 DNA の二本鎖形成により DNA-タンパク質ハイブリッド分子の複合体形成が可能であることを明らかにした。

これらの結果から、PCV2 Rep を利用した DNA-タンパク質ハイブリッド分子の構築法を確立し、目的タンパク質を提示したナノ構造体の構築が可能であることを明らかにした。

(2) 転写因子複合体の細胞内導入評価

始めに複数転写因子タンパク質導入の実現性を検討するために coiled-coil 構造を形成するペプチドを融合した転写因子および緑色蛍光タンパク質を作製し、coiled-coil 構造を介して両者を同時に細胞内に導入することが可能であることを検討した。ここでは細胞内導入能を有する転写因子として既に著者が報告している Olig2 を用いた。coiled-coil 構造を形成するペプチドを遺伝子工学的に Olig2 および GFP に融合し、大腸菌を用いて融合タンパク質を発現した。精製後、得られた融合タンパク質を混合し、複合体を形成させた後に細胞に添加し、共焦点顕微鏡を用いて観察したところ、細胞内導入能を有していない GFP の蛍光が細胞内で確認された (Fig.3)。このことから coiled-coil 構造形成による非共有結合を介して形成された複合体を細胞内に導入可能であることが示され、複数転写因子の導入も可能であることを明らかにした。

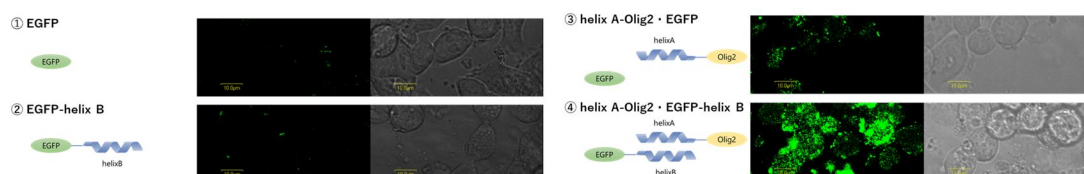


Fig.3 coiled-coil 構造を介して形成したタンパク質複合体の細胞内導入

EGFP のみ ⊙ helix B-EGFP のみ ⊙ helix A-Olig2 + EGFP ⊙ helix A-Olig2 + EGFP-helix B

次にドーパミン作動性ニューロンへの分化誘導を目的として、転写因子 Mash1 (Ascl1) および Nurr1 タンパク質の発現を、大腸菌を利用して行った。マウス由来細胞よりクローニングした各転写因子タンパク質を大腸菌発現系にて発現させたところ、Mash1 タンパク質は不溶性画分内に確認することができた。一方 Nurr1 タンパク質の発現量は少なく、その発現はウエスタンブロッティングにて、ようやく確認できる程度であった。この Nurr1 の発現条件を検討したが、改善されることは無く、タンパク質を取得することが出来なかった。一方、Mash1 タンパク質は不溶性画分より精製することにより得ることが出来た。リフォールディングの後、得られた Mash1 タンパク質をマウス由来神経芽細胞 N1E-115 に添加したところ、神経突起伸長が確認された (Fig.4)。更には、神経特異的な mRNA の発現が確認できたことから、得られた Mash1 タンパク質が活性を有し、神経分化を誘導出来ることが明らかとなった。

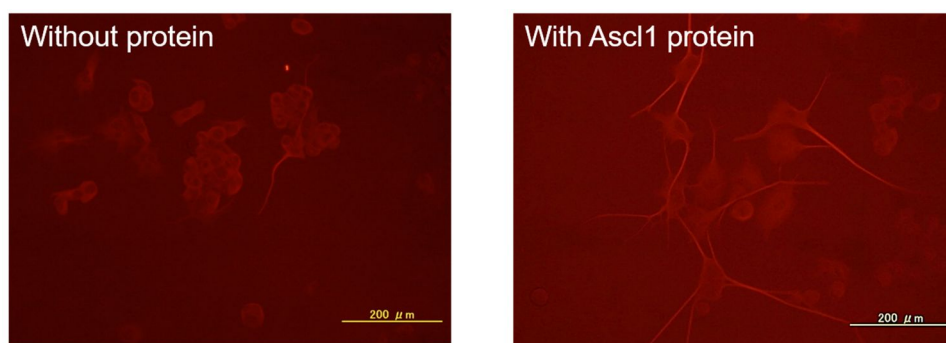


Fig.4 Ascl1 タンパク質添加による神経細胞分化誘導

以上、本研究は当初の目的である「複数種類の転写因子タンパク質を転写因子タンパク質-DNA ハイブリッド分子からなるナノ構造体として細胞内に導入し、細胞をリプログラミングする」までには至らなかった。しかしながら、PCV2 Rep を利用した DNA-タンパク質ハイブリッド分子構築法を確立し、複数タンパク質の同一細胞内への効率的な導入が可能であることを明らかにした。これらの知見は、当初の研究目的を果たす礎になるものである。

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 0件）

1. 著者名 Mie M, Niimi T, Mashimo Y, Kobatake E	4. 巻 41
2. 論文標題 Construction of DNA-NanoLuc luciferase conjugates for DNA aptamer-based sandwich assay using Rep protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnol. Lett.	6. 最初と最後の頁 357-362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10529-018-02641-7	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 -

1. 著者名 Wei Guo, Yasumasa Mashimo, Eiry Kobatake, Masayasu Mie	4. 巻 31
2. 論文標題 Construction of DNA-displaying nanoparticles by enzymatic conjugation of DNA and elastin-like polypeptides using a replication initiation protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanotechnology	6. 最初と最後の頁 255 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1361-6528/ab8042	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ZHONG, Yixue; MASHIMO, Yasumasa; YANAGIDA, Yasuko; MIE, Masayasu; KOBATAKE, Eiry
2. 発表標題 Construction of DNA-protein Hybrid Molecule with Multiple Targeting Abilities for Cancer Immunotherapy
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中馬 真ノ介・眞下 泰正・三重 正和・小島 英理
2. 発表標題 転写因子タンパク質導入によるiPS細胞の分化誘導
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島村萌里, 眞下泰正, 三重正和, 小島英理
2. 発表標題 転写因子タンパク質導入による細胞機能制御
3. 学会等名 第39回 日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平島 玲奈, 眞下泰正, 三重正和, 小島英理
2. 発表標題 DNA-タンパク質ハイブリッド分子を利用したセンシングシステム構築のためのRepタンパク質の改変
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wei GUO, Yasumasa Mashimo, Masayasu Mie, Eiry Kobatake
2. 発表標題 Construction of DNA Aptamer Displayed Nanoparticles Using Rep Protein
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三重正和, 新美貴大, 眞下泰正, 小島英理
2. 発表標題 DNA複製開始タンパク質を利用したDNA-タンパク質ハイブリッド分子の構築
3. 学会等名 第11回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中馬眞ノ介, 眞下泰正, 三重正和, 小島英理
2. 発表標題 神経特異的転写因子タンパク質導入による iPS 細胞の分化誘導
3. 学会等名 第41回 日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山侑乃, 眞下泰正, 三重正和, 小島英理
2. 発表標題 Repタンパク質を利用したDNA-抗体結合タンパク質ハイブリッド分子の構築
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020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