

令和元年6月13日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0175

研究課題名(和文) Cas9人工転写オシレーターを用いたリズム発振原理の解明とその応用

研究課題名(英文) Understanding of the mechanism underlying gene expression rhythms using a gene circuit model with engineered Cas9 transcription factors

研究代表者

土谷 佳樹 (Tsuchiya, Yoshiki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30456777

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、遺伝子発現リズムの発振原理解明を目指し、Cas9人工転写因子を用いた新規遺伝子回路を設計し、転写フィードバックループに基づく遺伝子発現振動の作出を試みた。現時点では発現振動の作出には至っていないが、人工転写因子によって内在性遺伝子発現を制御するという結果が得られている。また、概日時計を構成するコアループ(1次ループ)とサブループ(2次ループ)のうち2次ループの構成因子であるREV-ERB / の二重欠損細胞を作製し、時計遺伝子PER2の発現リズムを調べたところ、野生型と遜色ないリズムが観察された。このことから、概日時計は単一の転写ループのみで成立する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、哺乳類型概日時計の転写フィードバックループによる遺伝子発現振動について、2次ループに依存せずに単一の転写ループで強固なリズムを維持できることの新たな証拠が得られた。今後、人工転写回路によって単一の転写ループのみでの安定的な遺伝子発現リズムの再構築が実現すれば、遺伝子発現振動および振動周期長や頑健性の原理解明に繋がるのが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to reveal the principle underlying cell-autonomous oscillation of gene expression. I designed a gene circuit that is based on transcriptional-translational feedback loop in the circadian clock and regulated by engineered Cas9 transcription factors. Although establishment of the gene circuit has not yet been succeeded, engineered Cas9 transcription factors has been shown to be able to regulate endogenous gene expression. In addition, to know the necessity of the REV-ERB / -mediated secondary loop in the mammalian circadian transcriptional feedback loop, I have established the Rev-erb /Rev-erb double knockout (DKO) mouse embryonic stem cells. Circadian oscillation of PER2 expression in differentiated Rev-erb-DKO ES cells was comparable to that in wild-type cells. These results indicate that the REV-ERB / -mediated secondary loop is dispensable in regulation of the mammalian circadian clock.

研究分野：分子生物学

キーワード：概日リズム 人工転写因子

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

### 1. 研究開始当初の背景

転写・翻訳を介した負のフィードバックループを分子基盤とする遺伝子発現リズムは、概日リズムや発生期の体節形成などさまざまな生命現象に観察されている。このような生体のもつ遺伝子発現リズムの発振原理を解明するには、要素還元的なアプローチだけでは不十分であることが分かってきた。実際、1997年のマウス *Clock* 遺伝子のクローニングを契機に哺乳類概日時計を構成する遺伝子が次々と同定されたが、それでもなお、概日リズムの周期長決定機構やロバストネス(頑健性)、温度補償性のようなシステムとしての性質を解明するには至っていない。そこで、哺乳類概日時計のような転写システムを人工的につくり出すことにより、転写ネットワークを理解し、遺伝子発現を自在に操作しようという試みが盛んに行われている。現在までに、大腸菌を用いた発現 ON/OFF のトグルスイッチ (*Nature*, 2000) や発現振動 (*Nature*, 2000; 2003; 2010 など) が報告されており、これらの研究で作製された発現振動回路は複数の転写因子からなる転写抑制フィードバックループをその設計原理としている。また、哺乳類細胞においても、センス鎖の転写と競合するアンチセンス鎖の転写をフィードバック機構の基盤とする発現振動回路が設計されている (*Nature*, 2009)。このように多種多様なシステムを構築・操作してその特性を検証する試みから、生体内で見られるさまざまな遺伝子発現振動の発振原理の解明に繋がる知見が得られることが期待される。本研究では、Cas9 人工転写因子を用いた新規遺伝子回路を設計し、転写フィードバックループに基づく遺伝子発現振動を作出することで、遺伝子発現リズムの発振原理解明を目指す。哺乳類型の概日時計では、正の転写調節因子である BMAL1, CLOCK が二量体を形成し、時計遺伝子 *Per* や *Cry* の転写を促進する。発現した PER および CRY タンパク質は複合体を形成して核内に移行し、BMAL1/CLOCK の転写活性を阻害することで自身の転写を抑制する。この転写・翻訳の負のフィードバックループはコアループと呼ばれ、これによって遺伝子発現リズムが生み出されている。さらに、PER や CRY 同様に BMAL1/CLOCK によって発現が誘導される REV-ERB $\alpha$ , REV-ERB $\beta$  は核移行後に *Bmal1* 遺伝子の転写を抑制しており、2次ループを形成している。このような多重のフィードバックループにより安定したリズムが維持されていると考えられている。本研究では、コアループのみによる転写リズム成立の可能性を検討するため、単一ループによる人工遺伝子回路の作製を目指す。

### 2. 研究の目的

本研究では、哺乳類細胞内に CRISPR/Cas9 システムを応用した人工的な転写フィードバックループを作製し、人工転写オシレーター(振動体)を創出することによって、遺伝子発現リズムの発振原理を解明することを目的とする。特に、概日時計を構成する転写翻訳フィードバックループを模した転写ループを作製することで、概日振動の周期長や頑健性を規定するメカニズムについての知見を得る。また、概日時計を形成する転写翻訳フィードバックループについて、その構成因子の必要性を調べることで、転写振動を維持するメカニズムについての新たな知見を得る。これらの結果から、生体内で見られる概日リズムや体節形成リズムのような転写ネットワークによる遺伝子発現リズムの発振原理を明らかにするとともに、内在性遺伝子の発現をコントロールするための応用技術開発に繋がる成果を得る。

### 3. 研究の方法

#### 細胞培養

Per2::Luciferase 融合遺伝子 (Per2::Luc) ノックインマウス由来 ES 細胞は Dr. Joseph Takahashi に分与いただいた (Yoo et al. 2004)。ES 細胞は 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で ES cell medium (G-MEM (Wako), 15% FBS (Hyclone), 0.1 mM 非必須アミノ酸 (ナカライ), 0.1 mM 2-メルカプトエタノール (Sigma), 1,000 U/mL LIF (Wako), 100 u/mL ペニシリン・ストレプトマイシン (ナカライ)) を用いて培養した。Per2::Luc ノックインマウス由来胚性線維芽細胞 (MEF) は 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で MEF medium (DMEM 高グルコース (ナカライ), 10% FBS, 1 mM ピルビン酸ナトリウム (ナカライ), 0.1 mM 非必須アミノ酸, 2 mM GlutaMAX I (Invitrogen), 0.1 mM 2-メルカプトエタノール, 100 u/mL ペニシリン・ストレプトマイシン) を用いて培養した。

#### Cas9-TA および Cas9-TR プラスミドの作製

Cas9-TA は Cas9 発現ベクター (Addgene #41815) 上の Cas9 に DNA 切断活性を失わせる変異 (D10A/H840A) を導入して作製した Cas9-D10A/H840A の C 末端に 3 つの VP16 転写活性化ドメインを連結した。Cas9-TR は Cas9-D10A/H840A の C 末端に転写抑制因子である Kox1 の KRAB ドメインを連結した。作製には In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) を用いた。

#### 内在性遺伝子発現の調節

Cas9-TA, Cas9-TR 発現ベクターおよびガイド RNA (gRNA) 発現ベクター (Addgene #41817) を Per2::Luc ノックインマウス由来 MEF にトランスフェクションし、2日後に発光測定を行った。

#### CRISPR/Cas9 によるゲノム編集

Cas9 発現ベクター (Addgene #41815) および gRNA 発現ベクターを用いて標的遺伝子に対するターゲティングを行った。各遺伝子の標的配列は以下の通りである。下線部は PAM を示す。

Rev-erb $\alpha$ -1: 5'-CCCAGACGTAGTTGATAGAGTT-3'

Rev-erb $\alpha$ -2: 5'-TGCAAGGTGAGGCGGGTTAGGG-3'

Rev-erb $\beta$ -1: 5'-CTACTGATAGATACCAGTAAGG-3'

Rev-erb $\beta$ -2: 5'-GGGTTTAAACTCACTATGGTTGG-3'

Per2::Luc ノックイン ES 細胞に FuGENE HD (Promega) を用いて Cas9 発現ベクターと gRNA 発現ベクターをトランスフェクションし、コロニーピッキングによって変異細胞株を樹立した。

### ES 細胞の分化誘導

0.25% トリブシンで ES 細胞を処理した後、ゼラチンコートディッシュ上に播種して 20 分静置し、フィーダー細胞を除去した。その後、96-well の低接着性丸底プレートに 2,000 細胞/well で播種し、分化用培地 (DMEM 高グルコース (ナカライ), 10% FBS, 1 mM ピルビン酸ナトリウム (ナカライ), 0.1 mM 非必須アミノ酸, 2 mM GlutaMAX I (Invitrogen), 0.1 mM 2-メルカプトエタノール, 100 u/mL ペニシリン・ストレプトマイシン) で培養した。2 日後、胚様体 (EB) をゼラチンコートした 24-well プレートに移して培養を続け、2 日おきに培地を交換した。

### リアルタイム発光測定

分化誘導後 28 日目に、100 nM デキサメタゾンおよび 0.2 mM ルシフェリンを含む培地に交換し、光電子増倍管 (PMT) を用いて発光を継続測定 (1 分間測定, 20 分間隔) した。

### リズムの周期解析

得られた発光リズムのデータに下記のサインカーブによるフィッティングを行い、リズムの周期長を算出した。

$$y(t) = Ae^{-kt} \sin\left(\frac{2\pi(t - \phi)}{\tau}\right)$$

A: 振幅, k: 減衰定数, t: 時間,  $\tau$ : 周期長,  $\phi$ : 位相

## 4. 研究成果

### CRISPR 標的配列の選定

20bp の CRISPR 標的配列をランダムに生成し、マウスゲノム上にオフターゲット配列の少ないものを CRISPR direct (<http://crispr.dbcls.jp/>) を用いて検索した。PAM 配列上流 12bp 以上の完全一致がない配列を選定条件とした。その結果、以下の配列を標的配列候補とした (下線は PAM)。

- 5'-gtacatagacagacgtcgcgNGG-3'
- 5'-gtcgtcagctagcgtcgcgNGG-3'
- 5'-gcctagctgtaacgattacgNGG-3'

### 内在性 Per2 遺伝子の転写制御

Cas9-TA および Cas9-TR をマウス胚性線維芽細胞 (MEF) に導入し、内在性 Per2 遺伝子を標的とした転写制御を試みた。標的配列として、mPer2 プロモーター上の配列 5'-GGGGCGGGCTCAGCGCGCGCGG-3' (T1) および 5'-CCACTATGTGACAGCGGAGGGC-3' (T2) を用いた (下線は PAM)。Cas9-TA または Cas9-TR を上記いずれかの配列を標的とする sgRNA とともに導入し、Per2 の発現量をレポーター発光の値として比較した。その結果、T1 では Cas9-TA, Cas9-TR とともに発現変化が見られず、T2 では Cas9-TA による発現上昇が見られたが、Cas9-TR による発現抑制の程度は低かった。このことから、内在性遺伝子の発現制御は可能であるが、効果は標的部位に依存することが示唆された。

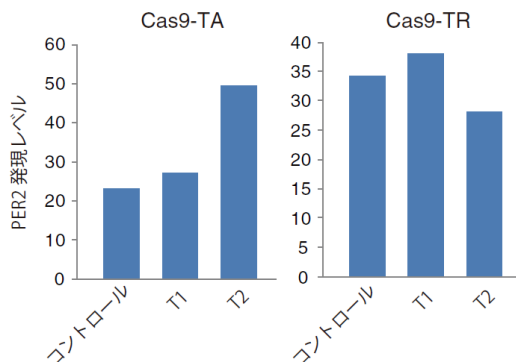


図 1. Cas9-TA, Cas9-TR による内在性 Per2 遺伝子の発現調節

### Rev-erba, Rev-erbβ ノックアウト ES 細胞の作製

概日時計を形成する転写翻訳フィードバックループにおいて、2 次ループを構成する Rev-erba, Rev-erbβ の重要性については依然として不明な点が多い。そこで、Rev-erba/β の二重欠損細胞を作製して REV-ERB のリズム形成における役割を調べた。まず、Per2::Luc ノックインマウス ES 細胞において、時計遺伝子 Rev-erba の第 3 エキソンおよび Rev-erbβ の第 4 エキソンを標的とした CRISPR によるエキソン欠失を導入した (図 2A)。作製した Rev-erba/β のダブルノックアウト (DKO) ES 細胞において、標的エキソンを含む mRNA の発現が検出できないことを確認した (図 2B)。

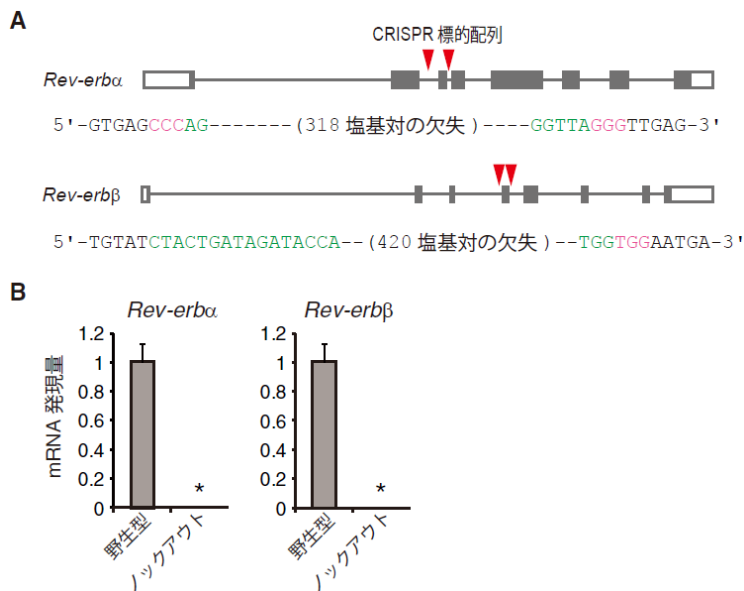


図 2. CRISPR/Cas9 による Rev-erba/β 遺伝子のノックアウト

### Rev-erb-DKO 細胞の分化誘導と Per2::Luc 発光リズムの測定

作製した Rev-erb-DKO 細胞を胚様体形成法により分化させ、分化誘導後 28 日目に細胞をデキサメタゾンで処理して概日リズム同調を行い、形成されたリズムを測定した。その結果、Rev-erb-DKO 細胞においても野生型と同等の PER2::LUC 発光リズムが観察された (図 3A)。リズムの周期及び振幅にも差は見られなかった (図 3B)。また、このとき REV-ERB によって発現抑制される Bmal1 の mRNA 発現リズムは消失し、恒常的に発現量が上昇していた (図 3C)。この結果から、REV-ERBα/β は Bmal1 遺伝子の発現を制御しているが、PER2 発現リズムの形成には必須ではないことが明らかになった。

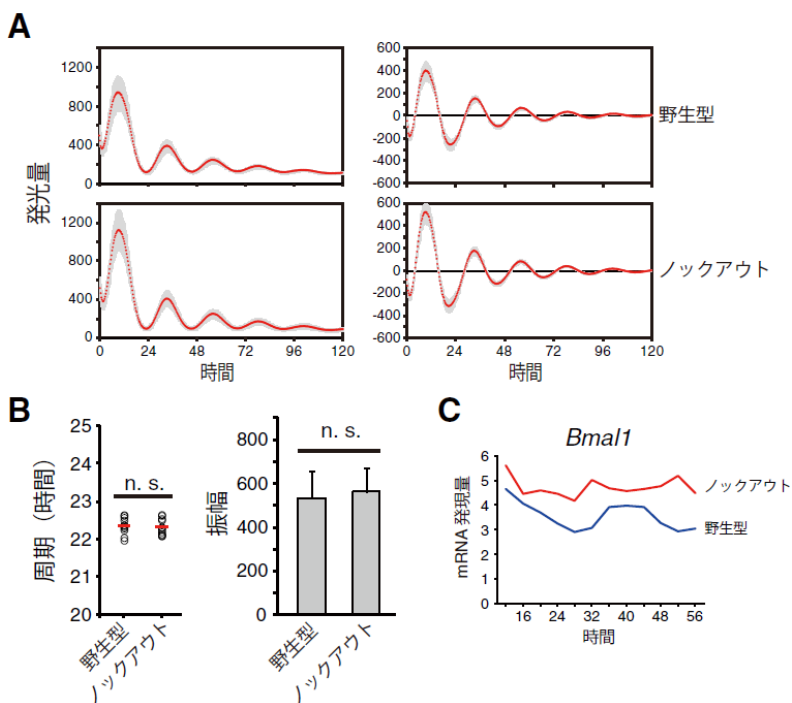


図 3. Rev-erba/β ノックアウト細胞の概日リズム

本研究では、Cas9-TA および Cas9-TR を用いた遺伝子回路の作製を行っているが、現在までのところ発現リズムの形成には至っていない。近年のゲノム編集とその応用技術の急速な発展により、精密な転写制御も可能となってきているが、転写振動の実現に向けて引き続き人工転写因子の改良及び条件検討を重ねる必要があると考えている。また、REV-ERB $\alpha/\beta$ の欠損実験からは、概日時計の形成には2次ループが不要であることが明らかとなり、概日時計が単一の転写ループのみで遺伝子の発現振動を維持している可能性が示唆された。REV-ERBは概日時計本体の制御よりも、概日時計からの出力に重要な働きをしていることを示唆するデータも得られており(論文投稿中)概日時計本体の発振機能と、それを様々なからだの生理機能に結びつけるメカニズムという観点からも興味深い結果である。今後さらなる研究により、単一の転写ループに基づく概日時計の発振機構が明らかになれば、概日リズムのように長い周期や外部刺激によって同調可能な性質など、様々な特性をもつリズムをコントロールできるようになることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計5件)

Oshima T, Niwa Y, Kuwata K, Srivastava A, Hyoda T, **Tsuchiya Y**, Kumagai M, Tsuyuguchi M, Tamaru T, Sugiyama A, Ono N, Zolboot N, Aikawa Y, Oishi S, Nonami A, Arai F, Hagihara S, Yamaguchi J, Tama F, Kunisaki Y, Yagita K, Ikeda M, Kinoshita T, Kay SA, Itami K\*, Hirota T\*. Cell-based screen identifies a new potent and highly selective CK2 inhibitor for modulation of circadian rhythms and cancer cell growth. *Sci Adv.*, 5, eaau9060. 2019. 査読有.

Ohashi M, Umemura Y, Koike N, **Tsuchiya Y**, Inada Y, Watanabe H, Tanaka T, Minami Y, Ukimura O, Miki T, Tajiri T, Kondoh G, Yamada Y, Yagita K. Disruption of circadian clockwork in in vivo reprogramming-induced mouse kidney tumors. *Genes Cells*, 23, 60-69, 2018. 査読有.

Yoo SH, Kojima S, Shimomura K, Koike N, Buhr ED, Furukawa T, Ko CH, Gloston G, Ayoub C, Nohara K, Reyes BA, **Tsuchiya Y**, Yoo OJ, Yagita K, Lee C, Chen Z, Yamazaki S, Green CB, Takahashi JS. *Period2* 3'-UTR and microRNA-24 regulate circadian rhythms by repressing PERIOD2 protein accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114, E8855-E8864, 2017. 査読有.

Umemura Y, Koike N, Ohashi M, **Tsuchiya Y**, Meng QJ, Minami Y, Hara M, Hisatomi M, Yagita K. Involvement of posttranscriptional regulation of Clock in the emergence of circadian clock oscillation during mouse development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114, E7479-E7488, 2017. 査読有.

Hara M, Minami Y, Ohashi M, **Tsuchiya Y**, Kusaba T, Tamagaki K, Koike N, Umemura Y, Inokawa H, Yagita K. Robust circadian clock oscillation and osmotic rhythms in inner medulla reflecting cortico-medullary osmotic gradient rhythm in rodent kidney. *Sci Rep*, 7, 7306, 2017. 査読有.

### [学会発表](計3件)

**土谷佳樹**, 梅村康浩, 小池宣也, 井之川仁, 笹脇ゆふ, 池田亮介, 小野龍太郎, 井上真帆, 八木田和弘. 時計遺伝子ノックアウトES細胞を用いた哺乳類概日時計制御機構の解析. 日本ゲノム編集学会 第4回大会, ポスター, 東京, 2019年6月4日

**Yoshiki Tsuchiya**, Ryosuke Ikeda, Nobuya Koike, Tess Grieten, Kazuhiro Yagita. The Role of REV-ERBs as Key Factors of Circadian Output. International Symposium on Biological Rhythms ~20 years since Discovery of Mammalian Clock Genes~, ポスター, Nagasaki, October 19, 2018

**土谷佳樹**, 池田亮介, Tess Grieten, 八木田和弘. The Role of REV-ERBs as Output Factors of the Circadian Clock. 第24回日本時間生物学会学術大会, ポスター, 京都, 2017年10月28日

## 6. 研究組織

(1)研究分担者なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 八木田和弘

ローマ字氏名: (YAGITA, Kazuhiro)

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。