

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19402

研究課題名（和文）4Dケミカルヌクレオミクス基盤技術の開発

研究課題名（英文）Development of Fundamental Technique for 4D Chemical Nucleomics

研究代表者

堀 雄一郎（Hori, Yuichiro）

大阪大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00444563

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ゲノム動態を可視化する4Dヌクレオーム解析の基盤ツールを開発することを目的として、標的DNA配列を蛍光検出する技術を開発した。そのために、独自のタンパク質ラベル化技術を用い、ゲノム編集に用いられるDNA結合タンパク質と合成核酸結合色素からなるハイブリッドプローブを構築した。このハイブリッドプローブは、標的とするテロメアDNA配列に結合し、蛍光強度を上昇させる機能を持つことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光タンパク質を用いたDNA配列の検出技術は、バックグラウンドシグナルの大きなものであるが、本研究のハイブリッドプローブは、DNAへの結合に伴い蛍光強度が増大するため、より高精度に検出できる。DNAの高精度な検出をもとにした4Dヌクレオーム解析は、ゲノム動態を精密に明らかにすることができ、遺伝子発現制御や疾病発症のメカニズムの解明に繋がる。この観点から、本研究では、ゲノム動態解明のための基盤ツールの開発に成功しており、生命科学や医学の発展に貢献するといえる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a technique for fluorescent detection of target DNA sequences with the aim of developing a fundamental tool for 4D nucleome analysis to visualize genome dynamics. For this purpose, we will construct a hybrid probe consisting of a DNA-binding protein used for genome editing and a synthetic nucleic acid-binding dye using our protein labeling technology. This hybrid probe was shown to have the ability to bind to the target telomeric DNA sequence and increase the fluorescence intensity.

研究分野：ケミカルバイオロジー、蛍光イメージング

キーワード：Chemical Nucleomics dCas9 TALE PYP Hybrid probe

1. 研究開始当初の背景

全細胞核内分子の機能・局在に時間軸を加えた包括的情報は4Dヌクレオームと呼ばれ、近年大きな注目を集めている。なかでもゲノムの三次元配置の動的変化は、遺伝子発現の制御や疾病の発症において決定的な役割を果たす。例えば、エンハンサー配列は、数千塩基以上離れたプロモーター配列に空間的に近接することで遺伝子発現を活性化できる。また、空間的に離れた遺伝子間で転座が起きると、癌などの疾病の原因となることが報告されている。このようなゲノム動態を生細胞においてリアルタイムで可視化することは、4Dヌクレオーム解析の基盤となるうえに、遺伝子発現制御や疾病発症のメカニズムを解明する観点から、生命科学・創薬の大きな課題となっている。

これまでに、ゲノム動態を解析するために、3C法やFISH法などが用いられてきた。しかしながら、これらの方法では細胞の破碎や固定を伴うため、同一細胞でゲノム動態を時々刻々と捉えることは不可能であった。これに対し、生細胞での特定塩基配列の可視化は、蛍光タンパク質を用いて行われてきた。この方法では、CRISPR/dCas9やTALEに蛍光タンパク質を融合させ、その局在を可視化するものであった。しかしながら、この方法の問題は、標的DNAに結合していない融合タンパク質の方が結合しているものよりも、圧倒的に分子数が多く、標的DNAに結合したもののみを識別する際、バックグラウンドシグナルが大きくなることであった。このため、標的DNAに結合したときのみ蛍光性となるプローブはこの問題を解決できると考えられ、その開発が期待されていた。

2. 研究の目的

本研究では、標的DNA配列に結合したときに、蛍光強度が増大する蛍光プローブを開発した。そのために、タンパク質と合成蛍光色素のそれぞれの利点を最大限活用した。タンパク質は、一般に高い特異性で標的分子を認識できるのに対し、合成蛍光色素には、化学反応に伴い蛍光特性を変化させるスイッチ機能を持たせることができる。標的DNA配列に特異的に結合するタンパク質部位としてゲノム編集で用いられるタンパク質を用い、色素部位として核酸に結合した時蛍光強度が増大する色素を用いた。これらの二つの分子をタンパク質ラベル化法で連結することで合成色素/タンパク質ハイブリッドプローブを構築し、そのハイブリッドプローブのDNAへの結合特性及び蛍光特性を評価した。

3. 研究の方法

(1) ハイブリッドプローブの設計・構築

DNA結合タンパク質部位として、ゲノム編集ツールであるCRISPR/Cas9またはTALENに着目した。本研究では、これらの分子の改変体で、DNA切断活性をなくし高い配列特異性でDNAに結合するCRISPR/dCas9またはTALEを用いる。蛍光色素部位には、遊離状態では非蛍光性で、DNAに結合すると蛍光性となる色素を用いる。このとき、色素は非標的配列に結合しないことと、タンパク質部位が標的配列に結合したときのみ、色素が近接効果により初めてDNAに結合することが必要となり、本研究では、該当する色素としてオキサゾールイエロー(YO)を選んだ。

上記のDNA結合タンパク質と色素を連結したハイブリッドプローブを構築するために、タンパク質ラベル化技術を応用する。報告者は、これまで独自にPYP(Photoactive yellow protein)タグと合成蛍光プローブを利用したタンパク質ラベル化技術を開発してきた。PYPタグは、細菌由来の小タンパク質(14kDa)であり桂皮酸リガンドと特異的に共有結合する。これまでに、合成蛍光プローブにより、PYPタグ融合タンパク質の特異的な生細胞標識に成功してきた¹⁻⁷。そこで、YOにPYPタグリガンドを繋いだ合成分子YOCNBでPYPタグ融合DNA結合タンパク質をラベル化することで、合成色素/タンパク質ハイブリッドプローブを構築した。なお、ゲノム編集ツールの改変体を用いたハイブリッドプローブの研究の予備検討として、細胞核内に比較的豊富なメチル化DNAを標的としたハイブリッドプローブの構築も行い、細胞内でハイブリッドプローブの構築が可能かについても検討している。YOCNBでPYPタグとメチル化DNA結合ドメインMBDの融合タンパク質PYP-MBDをラベル化し、合成色素/タンパク質ハイブリッドプローブを開発した。このプローブは、MBD部位がDNAメチル化部位に結合し、その結合時のみ、色素部位が近接効果によりDNAに結合し蛍光を発する。このハイブリッドプローブは、選択的にメチル化DNAに結合し、その結合に伴い蛍光強度が上昇することが判明していた。更に、PYP-MBDを細胞内で発現させ、その細胞にYOCNBを添加したところ、細胞内でハイブリッドプローブが構築され、メチル化DNAに結合し蛍光を発することが示されていた(図1)⁸⁻¹⁰。このため、

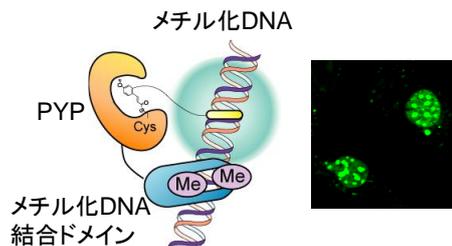


図1. ハイブリッドプローブの生細胞構築。

ハイブリッドプローブのシステムは、生細胞内でも機能しうることから、ハイブリッドプローブのタンパク質部位を CRISPR/dCas9 や TALE に変更することで、それらのタンパク質が標的とする DNA 配列に結合し蛍光強度を増大させるハイブリッドプローブへ展開できると考えられた。

(2) ハイブリッドプローブの DNA 結合特性と蛍光特性

ハイブリッドプローブが標的 DNA に選択的に結合するかを検証するために、異なる濃度のハイブリッドプローブと標的もしくは非標的 DNA を反応させ、ゲルシフトアッセイを行った。更には、ハイブリッドプローブの蛍光強度が DNA 存在下において変化するかを調べるために、蛍光分光光度計で蛍光スペクトルを測定した。

4. 研究成果

(1) CRISPR/dCas9 型ハイブリッドプローブの構築と評価

PYP と dCas9 を融合させたタンパク質 PYP-dCas9 をタンパク質部位として、YOCNB でラベル化したハイブリッドプローブを試験管で作成した。ラベル化反応を行い、紫外可視スペクトルを測定したところ、時間の経過に伴いベースラインの大幅な増加が確認された。これは、YOCNB の疎水性が高く水に可溶化させるために 5% DMSO を添加しているが、その DMSO により PYP-dCas9 が凝集したことが分かった。そこで、YOCNB の水溶性をあげ添加する DMSO 濃度を低下させるために、YOCNB の脱離基の部分にカルボキシ基を導入した YOCNB2 を開発した。この YOCNB2 に添加する DMSO 濃度は 1% でよく、水溶性の向上が確認された。また、YOCNB2 を PYP-dCas9 と反応させたところ、紫外可視スペクトルのベースラインの上昇は抑制され、PYP-dCas9 が水溶性を維持していることが分かった。また、YOCNB2 の PYP リガンド部位は、PYP との反応に従い、450 nm 付近の吸光度が上昇することが知られている。実際に、ラベル化反応時に、吸光度の上昇が確認され、YOCNB2 と PYP-dCas9 の結合が確認された。次に、ラベル化反応の共有結合性を確認するため、ラベル化反応後に SDS-PAGE を行った。その結果、変性条件下でも PYP-dCas9 を示すバンド部位から蛍光が観測されたことから、YOCNB2 と PYP-dCas9 は、共有結合で結合していることが示された。以上のことから、YOCNB2 と PYP-dCas9 からなるハイブリッドプローブが構築できることが分かった。

次に、ハイブリッドプローブの DNA 結合特性を調べるため、ゲルシフトアッセイを行った。標的配列をテロメア由来 DNA とし、それに相補的な gRNA を調整し、gRNA とハイブリッドプローブを反応させた後、テロメア DNA もしくは非テロメア DNA と反応させた。その結果、テロメア DNA と反応させた場合は、ハイブリッドプローブ濃度を増加させるにつれて遊離 DNA のバンドが消失しハイブリッドプローブ/gRNA/テロメア DNA の複合体を示すバンドが確認された (図 2)。これに対し、非テロメア配列の場合は、遊離 DNA の減少は確認されず、複合体の明確なバンドが観測されなかった。以上の結果から、ハイブリッドプローブは、標的テロメア配列に選択的に結合することが示された。このハイブリッドプローブの蛍光特性を調べるために、蛍光スペクトルを測定したところ、gRNA を添加した段階で蛍光強度の上昇がみられ、DNA 添加してもそれ以上の蛍光強度上昇が確認されなかった。この原因は、dCas9 と DNA の複合体の立体構造から、PYP に結合した色素と DNA の距離が長く、十分に色素と DNA が相互作用できなかったことが考えられる。

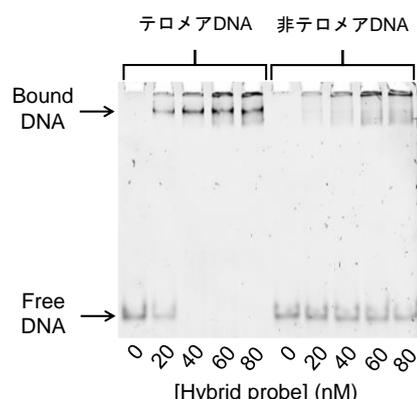


図 2. ハイブリッドプローブによるテロメア DNA への結合。

(2) TALE 型ハイブリッドプローブの構築と評価

テロメア配列に結合する TALE に PYP タグを融合させた TALE-PYP を作成し、大腸菌にて発現させ精製し、YOCNB 及び YOCNB2 によるラベル化実験を行った。dCas9 とは異なり、YOCNB, YOCNB2 とともにラベル化に伴い吸収スペクトルのベースラインの上昇は見られなかった。また、450 nm 付近の吸光度が上昇したため、ラベル化分子の TALE-PYP の結合が起こっていることが示された (図 3)。次に、YOCNB2 によるラベル化反応を行い、ハイブリッドプローブを構築した後に、ゲルシフトアッセイを行ったところ、テロメア DNA とハイブリッドプローブを反応させたときは、ハイブリッドプローブの濃度を上昇させるにつれ遊離 DNA のバンド強度が減少し、ハイブリッドプローブ DNA 複合体のバンドが明確に現れた (図 4)。これに対し、そのような明確なバンドは、非テロメア DNA のときは現れなかった。以上の結果から、

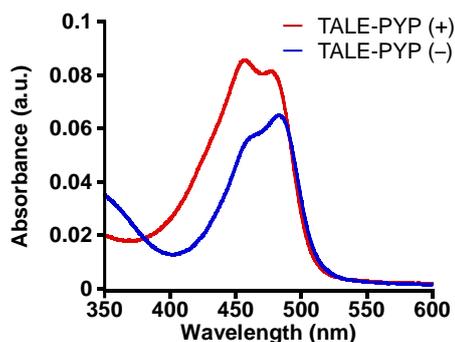


図 3. ハイブリッドプローブの構築。

ハイブリッドプローブは、テロメア DNA に選択的に結合することが示された。

次に、ハイブリッドプローブの蛍光特性を調べるために、蛍光スペクトル測定を行った。遊離の YOCNB2 は無蛍光性であったが、TALE-PYP のラベル化反応により蛍光強度の上昇が観測された。このハイブリッドプローブに対し、テロメア DNA を加えたところ、大きく蛍光強度が上昇した。一方で、非テロメア DNA をハイブリッドプローブに加えた時は、大きな蛍光強度の上昇は確認されなかった。以上の結果から、ハイブリッドプローブは、標的 DNA 配列に結合し、蛍光強度を上昇させることが示された。

このことから、前述した蛍光タンパク質の限界を克服できると期待される。また、生細胞で標的 DNA 配列を可視化するためのイメージングツールの基盤が整ったといえ、今後のゲノム動態可視化への展開が期待される。

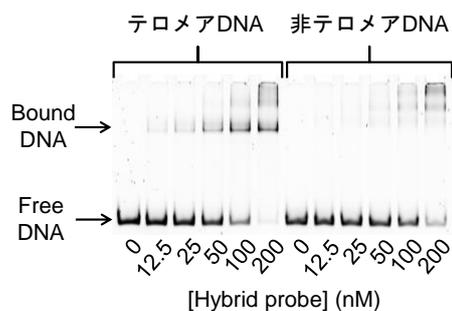


図 4. ハイブリッドプローブによるテロメア DNA への結合。

<引用文献>

- ① Reja, S. I., Minoshima, M., Hori, Y., Kikuchi, K. Development of an Effective Protein-Labeling System Based on Smart Fluorogenic Probes. *J. Biol. Inorg. Chem.* Vol. 24, pp. 443–455, 2019
- ② Kumar, N., Hori, Y., Kikuchi, K. Photoactive Yellow Protein and Its Chemical Probes: an Approach to Protein Labelling in Living Cells. *J. Biochem.* Vol. 166, pp. 121–127, 2019
- ③ Gao, J., Hori, Y., Nishiura, M., Bordy, M., Hasserodt, J., Kikuchi, K. Engineered Protein-Tag for Rapid Live-Cell Fluorogenic Visualization of Proteins by Anionic Probes. *Chem. Lett.* Vol. 49, pp. 232–235, 2020
- ④ Gao, J., Hori, Y., Takeuchi, O., Kikuchi, K. Live-Cell Imaging of Protein Degradation Utilizing Designed Protein-Tag Mutant and Fluorescent Probe with Turn-Off Switch. *Bioconjug. Chem.* Vol. 31, pp. 577–583, 2020
- ⑤ Kumar, N., Hori, Y., Nishiura, M., Kikuchi, K. Rapid No-Wash Labeling of PYP-Tag Proteins with Reactive Fluorogenic Ligands Affords Stable Fluorescent Protein Conjugates for Long-Term Cell Imaging Studies. *Chem. Sci.*, Vol. 11, pp. 3694–3701, 2020
- ⑥ Gao, J., Hori, Y., Shimomura, T., Bordy, M., Hasserodt, J., Kikuchi, K. Development of Fluorogenic Probes for Rapid High-Contrast Imaging of Transient Nuclear Localization of Sirtuin 3. *ChemBioChem*, Vol. 21, pp. 656–662, 2020
- ⑦ Reja, S. I., Minoshima, M., Hori, Y., Kikuchi, K. Near-Infrared Fluorescent Probes: a Next-Generation Tool for Protein-Labeling Applications. *Chem. Sci.*, Vol. 12, pp. 3437–3447, 2021
- ⑧ Hori, Y., Otomura, N., Nishida, A., Nishiura, M., Umeno, M., Suetake, I., Kikuchi, K. Synthetic-Molecule/Protein Hybrid Probe with Fluorogenic Switch for Live-Cell Imaging of DNA Methylation, *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 140, pp. 1686–1690, 2018
- ⑨ Kumar, N., Hori, Y., Kikuchi, K. Live-Cell Imaging of DNA Methylation Based on Synthetic-Molecule/Protein Hybrid Probe. *Chem. Rec.* Vol. 18, pp. 1672–1680, 2018
- ⑩ Hori, Y., Kikuchi, K. Chemical Tools with Fluorescence Switches for Verifying Epigenetic Modifications. *Acc. Chem. Res.* Vol. 52, pp. 2849–2857, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Gao J, Hori Y, Shimomura T, Bordy M, Hasserodt J, Kikuchi K	4. 巻 21
2. 論文標題 Development of Fluorogenic Probes for Rapid High-Contrast Imaging of Transient Nuclear Localization of Sirtuin 3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chembiochem	6. 最初と最後の頁 656-662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900568	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 該当する
1. 著者名 Hori Y, Kikuchi K	4. 巻 52
2. 論文標題 Chemical Tools with Fluorescence Switches for Verifying Epigenetic Modifications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acc Chem Res	6. 最初と最後の頁 2849-2857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.accounts.9b00349	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 Gao J, Hori Y, Takeuchi O, Kikuchi K	4. 巻 31
2. 論文標題 Live-Cell Imaging of Protein Degradation Utilizing Designed Protein-Tag Mutant and Fluorescent Probe with Turn-Off Switch	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioconjug Chem	6. 最初と最後の頁 577-583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.9b00696	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 Kumar N, Hori, Y. Nishiura M, Kikuchi K	4. 巻 11
2. 論文標題 Rapid no-wash labeling of PYP-tag proteins with reactive fluorogenic ligands affords stable fluorescent protein conjugates for long-term cell imaging studies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem Sci	6. 最初と最後の頁 3694-3701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0SC00499E	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 Gao J, Hori Y, Nishiura M, Bordy M, Hasserodt J, Kikuchi K	4. 巻 49
2. 論文標題 Engineered Protein-tag for Rapid Live-cell Fluorogenic Visualization of Proteins by Anionic Probes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem Lett	6. 最初と最後の頁 232-235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.190875	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 Kumar Naresh, Hori Yuichiro, Kikuchi Kazuya	4. 巻 18
2. 論文標題 Live Cell Imaging of DNA Methylation Based on Synthetic Molecule/Protein Hybrid Probe	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Chemical Record	6. 最初と最後の頁 1672 ~ 1680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tcr.201800039	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 Hori Yuichiro, Nishiura Miyako, Tao Tomomi, Baba Reisuke, Bull Steven D., Kikuchi Kazuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Fluorogenic probes for detecting deacylase and demethylase activity towards post-translationally-modified lysine residues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 2498 ~ 2503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0sc06551j	査読の有無 無
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2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hori, Y.
2. 発表標題 Chemical Probes with Fluorogenic Switch for Imaging Modified Protein and DNA
3. 学会等名 Institute for Protein Research International Seminar "Frontiers in Peptide Science 2018" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hori, Y.
2. 発表標題 Fluorescence Imaging of Endogenous Biomolecules Using Synthetic Fluorogen and Proteins
3. 学会等名 Chemical Biology Mini-Symposium (Bath University) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究協力者	クマール ナレッシュ (Kumar Naresh)		
研究協力者	レジャ シャヒ イマーム (Reja Shahi Imam)		
研究協力者	西浦 美也子 (Nishiura Miyako)		
研究協力者	高 靖馳 (Gao Jingchi)		
研究協力者	西田 会友子 (Nishida Ayuko)		

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
---------	---------