

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22441

研究課題名(和文)mRNAでオンになるスイッチ分子の開発と脳発生解析における応用

研究課題名(英文)Development of RNA dependent protein switches and application to neuroscience.

研究代表者

下向 敦範(Shitamukai, Atsunori)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・専門職研究員

研究者番号：00442971

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文): Cas13をベースとしたgRNAによる特異的RNA結合活性を利用した分子スイッチの設計を行い、Cas13タンパク質、インティン、リンカー、gRNA、局在シグナルの選別と改良を行った。その結果、培養細胞レベルで、性質の異なるインティンをベースにした活性の異なる二つのスイッチ分子の作成に成功した。バックグラウンドの高さや活性の低さから、まだ実用面では克服すべき問題点があると考えている。この両者を克服するために、今後、活性の高いgRNAの選定と、バックグラウンドを下げるための局在制御ドメインの検討が重要であり、引き続き研究を継続し、生体での実証を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究の成果は、新しい原理に基づいた細胞認識ツールの開発において重要な基礎知見をもたらすとともに、問題点も明確にした。本研究課題で作成した分子スイッチは、他のRNAをベースにした認識ツールや分割型のGFPなどとのコンビネーションが容易であり、今後、RNAをターゲットとする編集技術においての要素として重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文): To develop a molecular switch utilizing the specific RNA-binding activity of Cas13 protein and target crRNA, we investigated the effect of the following aspects: Cas13 protein, intein, linker property, number of and length of crRNA, and localization signal for controlling the non-specific interaction. As a result, we succeeded in creating two switch molecules with different activities based on the different properties of an intein in the cultured cell-based assay system. There are still problems to be overcome in terms of practical use, because of the high background and low activity. To overcome both, it is important to select highly active crRNA and study localization control domains to lower the background, and we will continue our research and aim to demonstrate it in vivo.

研究分野：神経科学

キーワード：分子スイッチ Cas13 RNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体を構成する多様な細胞群は、多くの場合、遺伝子発現の違いによって個別の機能や状態が規定されており、その遺伝子発現の違いで細胞種を識別することができる。特に近年、シングルセル解析技術の一般化により、多様な細胞種、状態が遺伝子の発現によって、記述されるようになった。しかし、爆発的な情報の増加に比べ、特定の遺伝子発現をもつ細胞を生きたまま、ラベル付けする技術は非常に限られている。一般的には、遺伝子発現の違いを捉えるのに、ターゲットとなる遺伝子のミニプロモーターや、ターゲット遺伝子領域に対して遺伝子組換え技術によって、蛍光タンパク質などのレポーターを組み入れることによって実現してきた。近年、CRISPR/Cas9 などの簡便なゲノム編集技術の普及により、様々な種で遺伝子組み替え操作が可能となってきた。しかし、DNA をターゲットとする場合、不可逆的にゲノムに変異を生じる可能性を排除することはできない。そのため、近年、RNA をターゲットとする技術が注目されつつある。Cas13 酵素群は、ターゲットに相補的なガイド RNA (gRNA) 配列を介して、狙った mRNA に結合し作用する DNA 編集に利用される Cas9 の RNA 版である。Cas13 の不活性型は、狙った mRNA に結合する事が可能であり、mRNA の編集や、可視化に利用されている。そこで、Cas13 を利用して、RNA の存在によりスイッチをオンする分子の開発に挑戦した。

2. 研究の目的

二つの Cas13 に分割した転写因子を融合し目的の RNA の存在により、転写因子を再構成するスイッチの分子の開発を試みた。培養細胞による最適化を通して、最終的には、実際の生体の脳をモデルとして、特定の神経をラベルできるかを検討する。

3. 研究の方法

HEK293 培養細胞を用いたアッセイ系の作成

最初に HEK293 培養細胞を用いた蛍光によるアウトプットを指標とするアッセイ系を構築した。ターゲットとして、発現が特異的で組織内においても抗体で容易に発現細胞が確認できる大脳新皮質の層マーカーである SATB2 遺伝子の 3' UTR 領域 2.0kb を使用した。このターゲット 3' UTR 領域を核移行型の赤色蛍光タンパク質 Scarlet-i-NLS の 3' UTR 領域に挿入し、ターゲットとした。また、再構成する因子として、TetOn 転写因子を用い、そのレポーターとして、核移行型の緑色蛍光タンパク質 EGFP-NLS を利用した。これによって、GFP/RFP の割合をスイッチの活性の指標とした。トランスフェクションの 1 日後にドキシサイクリン (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) による誘導をかけて、さらに 1 日後に固定、評価した。このアッセイ系を用いて、以下の項目について検討を行なった。(1) Cas13 タンパク質の選定、(2) インテインの選定、(3) gRNA の数、長さの検討、(4) リンカーの検討、(5) 核内外移行シグナルの検討。

4. 研究成果

(1) Cas13 タンパク質の選定

候補として、EsCas13d, RspCas13d, RfxCas13d, PspCas13b について、検討を行なった。当初、コロナウイルスの感染拡大により研究所のロックダウンが施行され、培養細胞の維持が困難であったため、購入によって即時入手が可能であった、マウスの発生脳を用いて、検討を行なった。結果、gRNA 依存的にわずかながら、レポーター活性の上昇が見られた組み合わせとして、RfxCas13d と PspCas13b の組み合わせが残った。ただし、この時点でどの組み合わせも、非特異的なバックグラウンドのシグナルが強く観察されており、培養細胞による詳細な改良の必要性が判明した。

また、最終的に選定された組み合わせは、RNA の局在化や mRNA ノックダウンにおいても、哺乳動物細胞で高い活性を持つものが残ったことから、順当な組み合わせであったと考えられる。次に、この二つのタンパク質の組み合わせに固定して、各パーツの詳細な検討を HEK293 培養細胞ベースのアッセイ系で行なった。また、RfxCas13d に関しては、C 末側に double strand RNA binding domain (dRBD) の付加が活性を上げることが報告されており (Han et al., 2020)、本スイッチにおいても、このドメインの付加により安定的な結果が得られるようになった。また、PspCas13b に対しても dRBD の付加を行なったが逆に活性を下げる結果になったので、採用していない。

(2) インテインの選定

インテインに関しては、非特異的なバックグラウンドを考慮して、相互作用の低い、出芽酵母の VMA インテイン (Brenzel et al., 2006) を採用した。結果、非常に低いバックグラウンドを示したが、活性も低かったので、さらに、幅広い条件で活性の反応が早いインテイン gp41-1 (Carvajal-Vallejos et al., 2012) をベースのスイッチを作成した。予想通り、非常に高い活性を示したが、バックグラウンドの活性も高く、このバックグラウンドの低下が課題とされた。この活性の異なる VMA スwitch と gp41-1 スwitch をベースに各パーツの変更によるスイッチ活性

の改良を行った。また、バックグラウンド低減を目的に強力に近接しないと活性を持たない caged インテイン(Gramespache et al., 2019)も検討したが明確な活性を示さなかった。このことより、スイッチ同士の RNA 上での接触はかなり一過的で弱い相互作用ではないかと想定される。

(3) gRNA の数、ターゲット配列の長さの効果

gRNA の選定に関しては、これまでに RNA ノックダウンのツールとして利用されている RfxCas13d の gRNA デザインツール(Wessels et al., 2020)を利用して、上位に位置する gRNA を用いて、1 ペア(RfxCas13d gRNA x1, PspCas13b gRNA x1)から、同時に 4 ヶ所の gRNA(合計 8 gRNA) のについて比べた。gRNA の数が増えると活性が上昇すると期待されたが、実際には、最も活性の高い 1 ペアの gRNA の活性を上回することはなかった。また、ターゲットへの結合を強化する目的で、認識配列を 23bp から、徐々に 30, 40, 50, 60bp と増やしたが、活性に変化はなく、むしろ低下する傾向が見られた。これらの結果から、特定の活性の高いペアの gRNA を見つけることが重要であることが示唆される。しかし、これまでのプログラムは、近接効果を考慮したものではなく、RNA への結合を指標としたものから、今後、最適な近接効果をもたらす gRNA ペアを見つけ出すアルゴリズムの必要性が浮かび上がった。以降のアッセイには、現状で最も活性の高かった 1 ペアの gRNA を用いて解析を行った。

(4) リンカーの効果

Cas13 タンパク質とインテイン-転写因子複合体を繋げるリンカー部分は、二つの分子の相互作用に影響する重要なパーツと考えられ、一般的に使用される GGGGS x3 のリンカーをベースに、機能ドメインの接続によく用いられる XTEN リンカー(SGSETPGTSESATPES x1)、また、電気的反発力によるバックグラウンドの低下を目的にリジン(KKKKG x3)、グルタミン酸(EEEEE x3)を導入し比べたが、ともに、元に比べ活性の低下が見られた。GGGGS リンカーとの違いは、電荷を持つアミノ酸を含むことで、同じく電荷を持つ gRNA、ターゲット RNA へ適切な結合を乱したのではないかと、考察している。これらの結果から、GGGGS x3 のリンカーを採用することにした。

(5) 核内外移行シグナル

本スイッチ分子は、RNA に結合する前の段階での非特異的な分子の会合を防ぐために、それぞれの分子に核移行シグナル(NLS)と核外移行シグナル(NES)を付加して、空間的に分離してバックグラウンドのコントロールを行っている。Cas13 は、Cas9 と同様にかかなり大きな分子量を持っており、適切な核内への移行には、高い活性を持つ核内移行シグナルが重要であることが想定される。本スイッチにおいては、核内移行シグナルとして初めに、Cas9 で利用されている Nucleoplasmin NLS(NP-NLS)をベースに、SV40-NLS, BP-NLS について検討を行っている。活性の違う二つのスイッチにおいて、検討を行った結果、活性が高くバックグラウンドの高い gp41-1 のスイッチにおいては、バックグラウンドの低下の効果が見られたが、再現が悪く、NLS の数を増やすなどの詳細な検討が必要であると考えている。また、すでにバックグラウンドの低い VMA のスイッチにおいては、大きな変化は見られなかった。NES に関しては、N 末側と C 末側の二ヶ所に付加することにより、バックグラウンドの低下が確認されたので、以後これに固定している。核移行シグナル(NLS)については、まだ詳細な検討が必要であると考えられ、検討を続けてゆく。

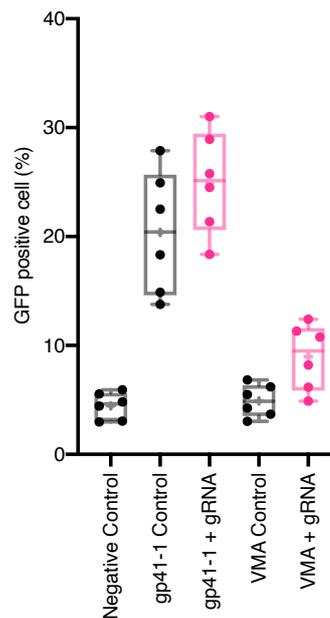


図1. 現状でのスイッチの活性

現状においては(NP-NLS x1, NES x2)、図 1 に示すような活性となっており、gp41-1 版に関しては、活性は高いが非常に高いバックグラウンドシグナルを持っている。また、VMA 版は、非常に低いバックグラウンドであり、ネガティブコントロールと同等である。バックグラウンドの低減と活性の上昇が今後の課題である。

今後の方針

これまでの検討の結果より、VMA と gp41-1 インテインをベースにした二つのスイッチ分子の作成に成功した。バックグラウンドの高さや活性の低さから、まだ実用面では克服すべき問題点があると考えている。この両者を克服するために、活性の高い gRNA の選定と、バックグラウンドを下げるための核内外移行シグナルの検討が重要であると考えられ、本研究課題による支援の終了後も、あらたな別の研究費の支援を受けて、現在更なる検討を行っている。特に、適切な gRNA

の選定に関しては、現在ターゲットとしている 2kb の RNA 配列に対して、網羅的な gRNA を作成し、レポーターの GFP の活性を指標に FACS で細胞を取得して、高活性を持つ gRNA 小スケールのスクリーニングを計画している。これから得られるデータによって、最適な gRNA ペアを見出すアルゴリズムの最初の基盤としたい。また、核内外移行シグナルは重要な改良部位と考えられるので、この部分の最適化について、培養細胞を用いて行い、最終的に、マウスの脳を用いて、生体での活性を調べたい。これによって、原理および概念証明が果たせたら、論文への投稿を予定している。

引用文献

Brenzel et al., *Biochemistry*, 45, 1571-1578, 2006

Carvajal-Vallejos et al., *J. Biol. Chem.*, 287, 28686-28696, 2012

Gramespache et al., *J. Am. Chem. Soc.* 141, 35, 13708-13712, 2019

Han et al., *PNAS*, 117, 22068-22079, 2020

Wessels et al., *Nat. Biotech.*, 38, 722-727, 2020

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 1件 / うちオープンアクセス 2件）

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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