

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03169

研究課題名（和文）タンパク質を標的とした新たな逆遺伝学技術の開発と個体での実用性の検証

研究課題名（英文）Development of a protein degradation tool applicable for in vivo

研究代表者

藤井 渉 (Fujii, Wataru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：40708161

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本計画では、セントラルドグマ最終産物である「翻訳産物」に対する汎用的な逆遺伝学的技術の確立を目標とした。生体内で効果を発揮し、任意の内在性タンパク質に設計でき、分解誘導する人工酵素を開発し、DNAやRNAに対する逆遺伝学的実験系では対応できない、生体内イベントの分子機構の解析への応用を目指し、人工酵素の実用性の検証を目的とした。卵母細胞、着床前胚およびマウス個体を利用した検証によって、E3ユビキチンリガーゼ複合体関連遺伝子を利用したタンパク質分解ツールは、内在性タンパク質に対する新たな逆遺伝学的アプローチに利用できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、動物個体内で発現する内在性タンパク質を分解するために必要な条件と、その有効なツールの発見に至った。今後、異常タンパク質による疾患に対する新たな治療方法としての利用が期待される。また、派生的知見として、新規のエピトープタグ、新規の抗eGFP抗体の有効性、簡便なトランスジェニック作製法、非モデル動物におけるiPS細胞の作製方法が得られており、これらは本研究課題のみならず、生命科学研究分野に幅広く貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：This project aimed to establish a versatile reverse genetic technique for "translation products," which are the end products of the central dogma. The goal was to develop artificial enzymes that are effective in vivo, can be designed into any endogenous protein, and induce degradation. Our investigations using oocytes, preimplantation embryos, and individual mice suggested that proteolytic tools utilizing the E3 ubiquitin ligase complex-related genes can be used for novel reverse genetic approaches for endogenous proteins.

研究分野：発生工学

キーワード：発生工学

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の生体内イベントの分子機構を理解する上で、標的遺伝子の発現を制御してその影響を観察する、いわゆる逆遺伝学的研究法が有用である。特に、ノックアウト動物は阻害の確実性が高いために、信頼性の高い技術として利用されている。近年のゲノム編集技術の進展はノックアウト動物の作製をより手軽にしており、受精卵を介したゲノム編集によって短期間で安価に標的座位の改変個体を得られる。また、転写後の RNA の制御には、RNA 干渉やそれに類する技術が有効であり、mRNA や非コード RNA の機能解析で利用されている。このように、DNA や RNA を標的とした逆遺伝学的研究法すでにコモディティ化されており、どのような遺伝子に対しても汎用的に利用できる状況にある(図1)。

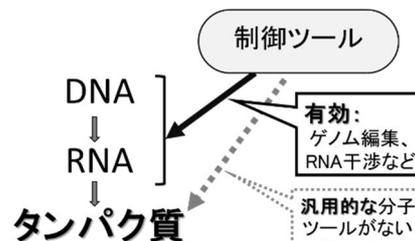


図1. セントラルドグマの各要素に対する発現制御技術の現状

一方、DNA や RNA とは異なり、セントラルドグマの最終産物であるタンパク質を標的とした場合、汎用的な逆遺伝学的実験系は未だ確立されていない(図1)。 現行の方法としては、分子標的薬と遺伝子工学ツールが挙げられる。分子標的薬は、低分子化合物や抗体、アプタマーなどが利用されるが、単に標的に結合するだけでなく阻害効果まで発揮してくれる薬を開発するのは非常にコストや労力を要するため、**新たな遺伝子を標的とする場合に汎用性が乏しく、限られた遺伝子にしか利用できず、制御も難しい**という問題がある。これに対して人工遺伝子などを利用した**遺伝子工学ツール**は設計の汎用性に勝る一方で、個体への応用や準備の煩雑さで課題を持つ。オーキシソグロン法、Shld/UnaG、SMASh、DeGradFP、AdPROM、ZIF1 などのツールは、標的タンパク質にタグ配列を付加し、小分子化合物などの誘導によって標的配列を分解する。しかし、いずれのタグ配列も、数百塩基からなるため、例えば受精卵を介したノックインなどでは煩雑な作業が必要となるために個体への応用は困難であり、標的タンパク質の構造変化を引き起こす可能性もあることから、使用条件が制限される。一方、近年新たに報告された Trim-Away 法は、抗体と Trim21 遺伝子の発現誘導で標的分解するため、内在性のタンパク質を後天的に標的とすることができるが、抗体のロットによって効率や精度が一定しない点や核内標的の分解効率が低い点、抗体の送達の点から個体への応用が困難である点が課題である。即ち、タンパク質を標的とした逆遺伝学を実施する場合、標的の汎用性や個体への応用などに不向きなのが現状である。

2. 研究の目的

本計画では、セントラルドグマ最終産物である「翻訳産物」に対する汎用的な逆遺伝学的技術の確立を目標とした。生体内で効果を発揮し、任意の内在性タンパク質に設計でき、分解誘導する人工酵素を開発し、DNA や RNA に対する逆遺伝学的実験系では対応できない、生体内イベントの分子機構の解析への応用を目指し、人工酵素の実用性の検証を目的とした。

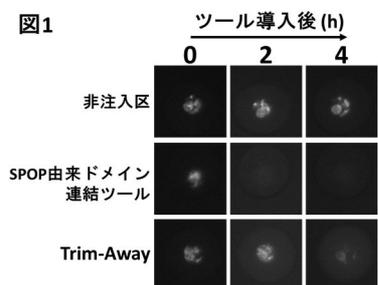
3. 研究の方法

本研究では、Cullin3 型ユビキチンリガーゼ複合体における基質認識受容体として働く SPOP 遺伝子の POZ ドメインに着目し、標的となるタンパク質の結合ドメインと連結した人工酵素を構築し、in vivo における有効性の評価を行った。はじめに、有効性の検証のために、マウス未受精卵を利用し、ツールの改良や既知のツールとの比較評価を行った(1. ツールの有用性の検証)。続いて、標的基質の汎用化を目指し、利用できるタンパク質結合ドメインの探索を行った(標的認識ドメインの探索)。以上の検討から、培養下で有効性が認められた基質と人工酵素の組み合わせで、in vivo におけるツールの通行性を検証した(in vivo への応用)。さらに、汎用的な in vivo 検証系の確立のために、外来 DNA を簡単に導入できる、新たなトランスジェニックマウス作製系について検討した(ツールの個体への外挿の効率化)。また、マウスとは異なる遺伝的背景における検討を可能とするために、様々な動物種における iPS 細胞の樹立を試みた(汎用性検証のためのツール開発)。

4. 研究成果

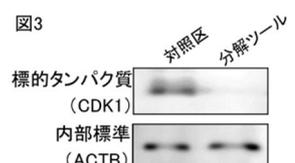
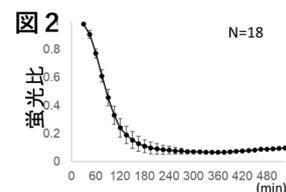
1. ツールの有効性の検証

本検討で着目した SPOP 由来ドメインを利用した培養細胞におけるタンパク質分解の検証が報告されている (Shin ら, 2015; Lim ら, 2020)。これらの報告では eGFP に対する Nanobody を利用し、分解効率を検討している。この Nanobody は前述の他のタンパク質分解ツールでも利用されており、eGFP に対する標準的な Nanobody として認知されている。一方で、既報 (Lim ら, 2020) において、標的基質に対する親和性が分解効率に影響することが示唆されており、この Nanobody が十分な結合親和性を持ち SPOP 由来ドメインを介した分解能を検証できるのか、それともより親和性の高いドメインであれば更なる分解能が発揮されるのかは不明であった。そこで、標準型 Nanobody よりもより高い親和性が報告されている新たな抗 eGFP Nanobody (Zhnag ら, 2020) を SPOP 由来ドメインと連結し、HEK293 細胞において標準型 Nanobody との分解能を比較したところ、標準型ツールでは細胞質における eGFP 発現が減少した一方で核内に eGFP シグナルが残存したのに対して、新型ツールでは細胞質内と核内の両方で eGFP シグナルの消失が認められた。本結果より、SPOP 由来ドメインを利用した eGFP 分解のこれまでの知見はその分解能のポテンシャルを十分に反映しておらず、より高効率な分解が期待できるツールであることが示唆された。加えて、これまで利用されてきた標準型 Nanobody に代わる極めて有用な抗 eGFP 結合ドメインを取得できた。そこで、このドメインを利用し、マウス未受精卵において、その他の分解ツールとの分解能の比較を行った。マウス受精卵は mRNA の顕微注入系を利用することで、各細胞で均一なレベルの遺伝子発現を行うことができるため、体細胞によるリポフェクション系よりも正確に比較検討が可能である。H2B-eGFP を全身で発現するマウスから卵母細胞を回収し、前述の新規抗 eGFP ドメインを SPOP 由来ドメインを連結したツールに加えて、卵母細胞で有効性が報告されている Ubiquitin 連結ツールに対して、同様に新規抗 eGFP ドメインを組み込み、各ツールをコードした mRNA を顕微注入して基質の発現をタイムラプス観察した。その結果、SPOP 由来ドメインおよび TrimAway で基質の迅速な分解が認められ、さらに、SPOP 由来ドメインによるツールが TrimAway よりもより効率的な分解能を示した (図 1)。TrimAway は現在卵母細胞におけるタンパク質分解の標準ツールとして利用されているが、genetically-encoded なシステムを利用する場合、本研究で提案するツールがより有用であることが明らかとなった。一方で、本検討において、導入ツール自体が迅速に分解されるため、極めて高濃度の mRNA を注入する必要が生じた。そこで、ツールそのものの分解を阻害するために、SPOP 由来ドメインの Lysine-less 変異体を作製して比較したが、分解能に影響しないものの、安定性に影響は認められなかった。また、TrimAway で利用されるユビキチンリガーゼである Trim21 やプロテアソーム複合体への輸送に参与する Ubiquitin などの遺伝子との連結ツールも検討したが、分解能の向上は認められなかった。これらの結果から、SPOP 由来ドメインは単独で有効な分解能を惹起できることが示唆された。



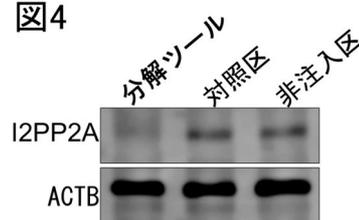
2. 標的認識ドメインの探索

標的基質を認識するドメインとして、細胞内で凝集せず標的となるタンパク質に結合できるドメインが利用できる。前述の通り、eGFP に対する新たな有効なドメインを得られたが、マウス個体で評価を行う上で、より短いエピトープタグに対して有効なものがあれば、基質ノックインマウスの作製とそれによる in vivo 検証が簡単になる。そこで、既報のエピトープタグ (FLAG, HA, SUN, MOON, ALFA, Zip) とその intrabody との組み合わせで分解ツールに有効なものを探索したところ、前述の eGFP と同等かそれ以下の分解能を示す組み合わせが得られた。そのうち、SUN-tag とその scFv による効果を検討するために、Sun-tag を付加した H2B-eGFP の mRNA をマウス受精卵に顕微注入し、2-細胞期において片方の割球にのみ分解ツールを導入し、その分解能を評価した。その結果、注入後およそ 3 時間程度で検出限界以下まで分解され、極めて効率よく分解誘導できることが明らかとなった (図 2)。また、既知のエピトープタグに加えて新たな新規タグ-intrabody を構築するために、PDB を探索し、最終的に HIV p24 由来の 19aa アミノ酸とそれを認識する Nanobody が既知の高親和性セットと同等の効率で分解ツールとして利用できることが明らかとなった。内在性タンパク質の分解へ応用するために、Sun-tag ノックインマウスを作製し、内在性タンパク質に対する分解能を評価した。卵母細胞で安定したタンパク質発現が報告されている Cdk1 の C 末端に SunTag をノックインしたマウスに由来する受精卵に分解ツールを導入し、Cdk1 発現をウェスタンブロッティングによって観察したところ、高効率な分解が認められた (図 3)。一方で、Rec8 に対して同様の戦略で検討を行ったが、Rec8 の分解は認められず、本システムは標的基質によって効果が異なる可能性が示唆された。また、タグ配列を介さずに内在性タンパク質を直接分解誘導できる intrabody を探索したが、大部分の既報のドメインは内在性タンパク質を十分に発揮できるほどの親和性を持たず、少なくとも



我々の検討では部分的な分解は認められたものの、前述のタグシステムと同等に内在性タンパク質発現を分解できるものは検出できなかった。唯一の効果的なドメインとして、PCNA に対するペプチドアプタマー-Con1 を利用した結果、内在性 PCNA の分解が認められた。Intrabody に代わり、標的タンパク質と複合体形成する遺伝子の結合ドメインについて検討したところ、SET/I2PP2A に対して、複合体形成する Setbp1 由来結合ドメインを利用したところ、内在性 SET の分解が認められた(図 4)。以上の結果から、内在性タンパク質を標的としたツール構築には、intrabody に加えて結合タンパク質に由来するドメインが有効である可能性が示唆された一方で、既報の intrabody の大部分は分解ツールへ応用できるほど十分な親和性を持たないことが示唆された。これらを「リサイクル」するための、分子進化法による配列最適化が有効であると期待され、現在新規手法を検討している。

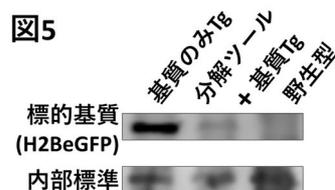
図4



3. in vivo への応用

本ツールの個体レベルの有効性を検討するために、本検討で得られた eGFP に対する新規結合ドメインを利用した分解ツールを恒常的発現するトランスジェニックマウスを作製した。得られたマウスでは各組織でツールの発現が認められた。また、体重や繁殖性に顕著な影響は認められなかった。このトランスジェニックシステムを恒常的に基質である H2B-eGFP を発現するマウスと交配したところ、いくつかの組織で基質の分解が認められ、特に小脳において高効率な分解が認められた(図 5)。体重や繁殖性は分解ツールのみ発現させた個体と比較して顕著な差は認められず、本システムは個体レベルのタンパク質分解ツールとして有効であることが示唆された。現在、より詳細な解析を進めるとともに、アデノ随伴ウイルスによって後天的に導入した場合の有効性を検証している。

図5



4. ツールの個体への外挿の効率化

前述の通り、トランスジェニック系によって本ツールの個体レベルの検証が可能であることが示唆された。今後、新たに構築したツールを検証する上でトランスジェニックマウスによる検証が有効であると期待されるが、その作製にはマイクロマニピュレーターによる前核注入への顕微注入実験を必要とするため、労力を要する。そこで、作製の効率化を目的として、エレクトロポレーターを利用したトランスジェニックマウスの新たな作製方法を検討した。トランスポゾンとプラスミド DNA を含むエレクトロポレーション溶液に受精卵を浸漬し、エレクトロポレーションを行うことで、外来 DNA を効率的にゲノムに導入できることが明らかとなり、さらに、その受精卵を移植することで、トランスジーンを持つ個体が得られた。さらに、交配を介して、次世代へトランスジーンが伝達することを確認した。以上の通り、エレクトロポレーションによるトランスジェニックマウスシステムの作製系を確立した。今後、本法によって、新たに構築した分解ツールの個体内評価を効率化できると期待される。

5. 汎用性検証のためのツール開発

将来的に幅広い動物種で本ツールが利用できるかを検討するためには、様々な動物種における iPS 細胞を樹立し、その分化系を利用することで検証できると着想した。一方で、iPS 細胞の樹立が報告されている動物種は限られている。そこで、バイオリソースから入手できる非モデル哺乳動物細胞を利用し、iPS 細胞の樹立系を検討した。一般的に利用されている Yamanaka4 因子によってマウスおよびラット胎子繊維芽細胞では効率よく iPS 細胞が樹立できたが、他の動物種では樹立が認められなかった。そこで、Yamanaka4 因子に加えてリプログラミングへの関与が報告されている 10 遺伝子を同時に導入することで、効率的に樹立できることが明らかとなった。現在はこれらの iPS 細胞を利用した分化系によって、マウスとは異なる遺伝的背景における分解ツールの有効性の検討を準備している。

以上の結果より、申請者の着目したタンパク質分解ツールを利用することで、初期発生や個体レベルにおいて内在性タンパク質に対する新たな逆遺伝学的アプローチが実施できることが示唆された。また、本研究を通じて、その検証のための新たなツールや実験系の確立に至った。これらを利用することで、今後、ツールの向上と有効性の研究を加速化させる予定である。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Holmlund Hayden, Yamauchi Yasuhiro, Durango Gerald, Fujii Wataru, Ward Monika A	4. 巻 107
2. 論文標題 Two acquired mouse Y chromosome-linked genes, <i>Prss1</i> and <i>Teyorf1</i> , are dispensable for male fertility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 752 ~ 764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioac084	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 Fujii Wataru	4. 巻 2637
2. 論文標題 Generation of Knock-In Mouse by Genome Editing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in molecular biology	6. 最初と最後の頁 99 ~ 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-3016-7_8	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Wataru Fujii
2. 発表標題 Genetic Engineering Via Mammalian Zygotes.
3. 学会等名 The Rising Stars in Reproductive Biology Webinar Series, Society for the Study of Reproduction (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井 渉, 池田 有沙, 杉浦 幸二, 内藤 邦彦
2. 発表標題 マウス受精卵におけるbioPROTACによるタンパク質分解能の評価
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井渉、池田有沙、杉浦幸二、内藤邦彦、角田茂
2. 発表標題 マウス卵母細胞および受精卵におけるbioPROTACによる標的タンパク質分解能の評価
3. 学会等名 第8回デザイン生命研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wataru Fujii, Shin Yoshioka, Koji Sugiura, Kunihiko Naito, Shigeru Kakuta, Kiyoshi Kano
2. 発表標題 Generation of transgenic mice by zygote electroperation.
3. 学会等名 Society for the Study of Reproduction Annual Conference
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井渉、吉岡伸、杉浦幸二、内藤邦彦、角田茂、加納聖
2. 発表標題 受精卵エレクトロポレーションによるトランスジェニックマウスの作製
3. 学会等名 第116回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 執筆者:96名、技術情報協会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 602
3. 書名 ゲノム編集技術を応用した製品開発とその実用化	

1. 著者名 藤井 涉	4. 発行年 2023年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 315
3. 書名 ゲノム編集技術～実験上のポイント / 産業利用に向けた研究開発動向と安全性周知	

〔産業財産権〕

〔その他〕

個人ホームページ http://wtrfujii.com/

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		
米国	ハワイ大学		