

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：26402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06202

研究課題名(和文) 発光タグHiBiTの高機能化・多機能化を通じた新規発生遺伝子解析手法の確立

研究課題名(英文) Multi-functionalization of the NanoLuc-based HiBiT tag

研究代表者

蒲池 雄介 (Kamachi, Yusuke)

高知工科大学・理工学群・教授

研究者番号：90263334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集技術によるノックイン動物の確立は時間を要するステップである。したがって、一つのペプチドタグを高機能化・多機能化できれば、研究の迅速化・高度化につながる。本研究は、NanoLuc由来の発光タグHiBiTの高機能化・多機能化を目的として実施した。HiBiTタグは、高い親和性でLgBiTと結合することでNanoLucが再構成される。したがって、発光タグに加えて、アフィニティタグとしても利用できる可能性がある。実際、F-boxタンパク質との組み合わせでプロテインノックダウンが可能であることや、蛍光タンパク質との組み合わせで細胞内におけるタンパク質の可視化が行える可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質に機能的なタグを付加することは、タンパク質の検出や分析を容易にし、研究を促進させる。一方、タグの導入を内在遺伝子に対して行う場合は、時間とコストが問題になる。したがって、1つのタグを多機能化することは、タンパク質の解析の迅速化と高度化に貢献することが期待される。本研究では、HiBiTタグが発光タグばかりでなく、アフィニティタグとしての利用可能なことを示し、HiBiTタグの利便性を格段に高めることができる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Establishing knock-in animals using genome editing technology is a time-consuming process. Therefore, if a single peptide tag can be multi-functionalized, it will accelerate research. This study aimed to multi-functionalize the HiBiT luminescent tag derived from NanoLuc. The HiBiT tag reconstitutes NanoLuc by binding to LgBiT with high affinity. Thus, the HiBiT tag has the potential to be used as an affinity tag. In fact, we demonstrate that the HiBiT tag can be used for protein knockdown in combination with an F-box protein, and for visualization of proteins within cells in combination with fluorescent proteins.

研究分野：分子発生生物学

キーワード：タグging

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集技術の発展にともない、さまざまなモデル生物において遺伝子のノックアウトやノックインの実施が比較的容易になってきた。しかし、単純なノックアウトやノックインでは、十分な遺伝子機能の解析が難しい場合が多い。例えば、遺伝子ファミリーのメンバー間に遺伝子機能の重複がある場合、単純なノックアウトでは表現型が現れないことが予想される。この場合、二重、三重あるいはそれ以上の多重のノックアウトが必要になる。一方、遺伝子産物の機能を *in vivo* で観察する場合は、GFP などの蛍光タンパク質を利用することで可能になる。しかし、胚発生過程における観察には蛍光タンパク質が成熟し実際に蛍光が観察されるようになるまでのタイムラグが問題となる。

ゲノム編集技術を用いたノックアウトやノックインによる遺伝子機能の解析を目指す場合、タグの挿入のようなゲノム編集ラインの確立は時間を要するステップである。したがって、一つのペプチドタグを高機能化・多機能化できれば、実験目的ごとのノックインやノックアウトの必要性を低下させ、研究の迅速化につながることを期待される。

最近開発された発光検出が可能な HiBiT タグシステムでは、NanoLuc ルシフェラーゼの N 末側 159aa ポリペプチド (LgBiT) と C 末側 11aa ペプチド (HiBiT) の相補性を利用して、HiBiT タグが付加されたタンパク質を極めて高感度に検出できる (図 1)。この研究では、HiBiT と LgBiT の相互作用の親和性に注目し、アフィニティタグとしても利用できる可能性が調べた。

2. 研究の目的

本研究では、発光タグ HiBiT の高機能化・多機能化を通して遺伝子機能解析の高度化・迅速化を行い、胚発生過程における遺伝子機能の解析手段のボトルネックを解消し、ゼブラフィッシュの初期発生過程における Sox を中心とした転写因子の機能解析の基盤を作ることを目的に、以下に挙げる項目の研究を実施した。

(1) HiBiT タグを利用した新規デグロン技術

プロテインノックダウン法では、タンパク質分解を誘導するデグロン配列を標的タンパク質に付加することにより、分解レベルでタンパク質発現を制御可能であり、同時に複数のタンパク質をターゲットできる。派生的なデグロン技術として、GFP に対するナノボディ抗体を利用してユビキチンリガーゼをリクルートし、標的タンパク質の分解を促す手法が開発されている。本研究では、LgBiT を HiBiT タグを認識するナノボディ的に利用することで、HiBiT タグ依存的にタンパク質が分解されるシステムの構築を行う (図 1)。

(2) HiBiT タグを利用したタンパク質の *in vivo* イメージング

生細胞内のタンパク質を検出するために蛍光タンパク質による標識がよく使用されるが、蛍光タンパク質は成熟時間が長いこと、新生ペプチド鎖が検出できないことや、タグとしては比較的大きいなどの問題がある。この問題を解決するため、ペプチドタグと一本鎖抗体を組み合わせる、HA フランケンボディなどのタンパク質検出法が開発されてきた。本研究では、HiBiT タグを一本鎖抗体的なバインダーとして利用する新たなタンパク質検出法の構築を行う (図 1)。

3. 研究の方法

(1) HiBiT タグを利用した新規デグロン技術

デグロンとして GFP を用いたものとして deGradFP システム、およびそれをゼブラフィッシュに適応させた zGrad システムなどがある。このシステムでは抗 GFP ナノボディと F-box の融合タンパク質を利用することでタンパク質のユビキチン化とそれに続く分解を引き起こす。この研究では、まず F-box タンパク質と LgBiT の融合タンパク質を作成し、zGrad システムとの比較をおこなった。F-box タンパク質を、LgBiT の C 末側および N 末側にそれぞれ挿入した 2 種類の融合タンパク質を発現させるベクターを作成した。これらの比較で、LgBiT と F-box の配置によって HiBiT と LgBiT 間の相互作用が影響を受ける可能性を検証した。

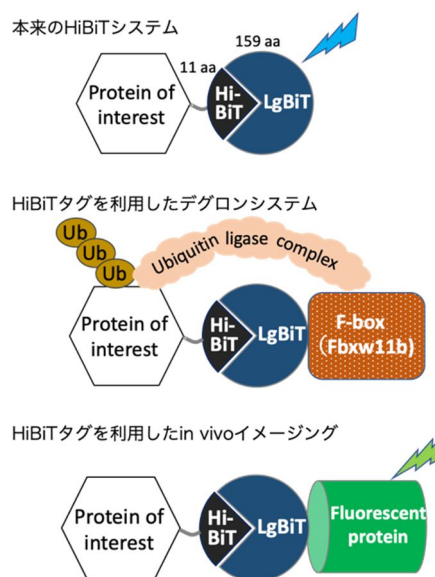


図 1. HiBiT タグの高機能化と多機能化

(2) HiBiT タグを利用したタンパク質の in vivo イメージング

LgBiT と蛍光タンパク質の融合タンパク質が、HiBiT タグを付加した目的タンパク質を細胞内で検出できるのかを調べた。まず、蛍光タンパク質として Achilles と mScarlet-1 を使用し、LgBiT の C 末側および N 末側にそれぞれ挿入した 4 種類の融合タンパク質を発現させるベクターを作成した (LgBiT-FP および FP-LgBiT)。これらの比較で、LgBiT と蛍光タンパク質の配置によって HiBiT と LgBiT 間の相互作用が影響を受ける可能性を検証した。目的タンパク質として、Sox3 転写因子を選び、C 末側に HiBiT タグがノックインされたアレルを持つラインを利用した。このノックインラインの胚では、HiBiT が付加された Sox3 である Sox3-HiBiT が中枢神経系などで発現される。

4. 研究成果

(1) HiBiT タグを利用した新規デグロン技術

この研究では、まず zGrad システムと新規 HiBiT デグロンシステムを比較するため、HiBiT タグが付加された EGFP タンパク質 (EGFP-HiBiT) を用意した。この EGFP-HiBiT を利用して、zGrad が報告された通りにタンパク質を分解するか調べた。まず、ゼブラフィッシュ胚に EGFP-HiBiT と zGrad (vhhGFP4 ナノボディと fbwx11b-F-box との融合タンパク質) を発現させるため、それぞれをコードする mRNA を混合したもの、およびコントロールとして EGFP-HiBiT の mRNA のみを顕微注入し、6 時間後に GFP の蛍光を比較することでタンパク質が分解されるか調べた。この際、顕微注入する液量の違いがわかるようにするために、赤色蛍光タンパク質である mCherry を同時に顕微注入した。6 時間の時点で蛍光を比較したところ、zGrad を注入した胚の方が蛍光が弱くなっていたことから、zGrad による EGFP タンパク質の分解誘導が実際に起こることが確認できた。

次に LgBiT をナノボディの代わりに使用してタンパク質の分解誘導が起こるか調べるため、LgBiT と fbwx11b 遺伝子由来の F-box との融合タンパク質 LgBiT-F-box を、相互の N 末-C 末の配置が異なるよう 2 種用意し、これらの融合タンパク質および EGFP-HiBiT をコードする mRNA を用いて、上記と同様の実験を行い、胚における蛍光を比較した。顕微注入後 6 時間の時点で蛍光を比較したところ、EGFP の蛍光が弱くなっていることから、zGrad システム同様に EGFP が分解されていると考えられる。2 種の融合タンパク質の結果の比較から、zGrad と同様に N 末端側に F-box がある融合タンパク質の方が効率よく働くことがわかった (図 2)。以上の結果は、ナノボディの代わりに LgBiT が利用可能であることを示したものである。

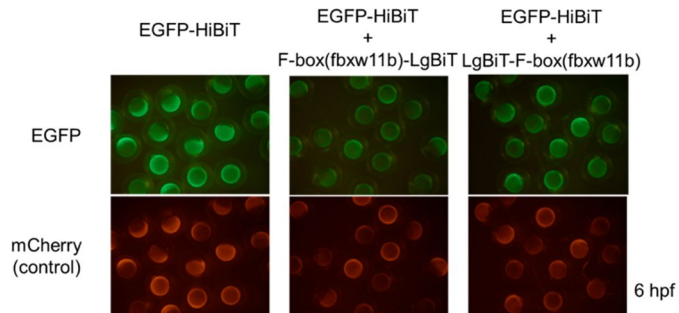


図 2. HiBiT タグを利用した EGFP の分解誘導

(2) HiBiT タグを利用したタンパク質の in vivo イメージング

HiBiT を付加する対象として転写因子 Sox3 を選び、LgBiT-FP 融合タンパク質でターゲットに付加した HiBiT タグが in vivo で検出可能かを調べた。このため、Achilles あるいは mScarlet-1 と LgBiT の融合タンパク質 4 種類 (LgBiT-FP および FP-LgBiT) をコードする mRNA を準備した。まず、Achilles の融合タンパク質 mRNA を、Sox3-HiBiT ラインの 1 細胞期のゼブラフィッシュ胚に顕微注入し、24 時間後の蛍光を観察した。Sox3-HiBiT 胚では Sox3 発現部位で蛍光タンパク質が核に局在することが観察されたが、野生型胚ではこのような蛍光タンパク質の局在はみられなかった。このことは、LgBiT-Achilles/Achilles-LgBiT 融合タンパク質が、細胞内で HiBiT タグに特異的に結合することを示唆する。また、LgBiT-Achilles と Achilles-LgBiT の蛍光分布を比較すると Achilles-LgBiT の方が核への局在が強いことが観察された。この結果は LgBiT-mScarlet-1/mScarlet-1-LgBiT の mRNA を顕微注入した胚においても同様であった。以上の結果は、LgBiT-FP 融合タンパク質が HiBiT タグを生きた胚内で検出できることを示唆しており、HiBiT システムを利用した新たなタンパク質検出法が利用可能であると考えられる。

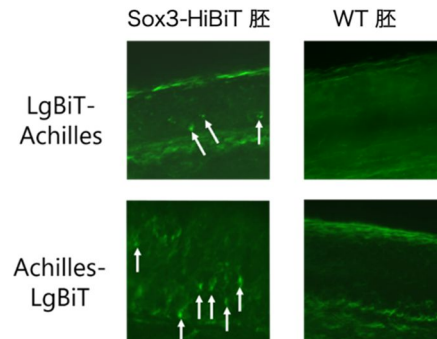


図 3. HiBiT タグを利用した in vivo イメージング

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 2件）

1. 著者名 Okada Keita, Aoki Kanae, Tabei Teruyuki, Sugio Kota, Imai Katsunori, Bonkohara Yuki, Kamachi Yusuke	4. 巻 50
2. 論文標題 Key sequence features of CRISPR RNA for dual-guide CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes assembled with wild-type or HiFi Cas9	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 2854 ~ 2871
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkac100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Aoki Kanae, Yamasaki Mai, Umezono Riku, Hamamoto Takanori, Kamachi Yusuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Systematic Comparison of Computational Tools for Sanger Sequencing-Based Genome Editing Analysis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 261 ~ 261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells13030261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶尾浩大、蒲池雄介
2. 発表標題 生きたゼブラフィッシュ胚のジェノタイピング法の確立
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神崎智宏、蒲池雄介
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ胚における緑色および赤色蛍光タンパク質バリエーションの比較
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木加奈枝、梅園理玖、瀨本崇典、山崎麻衣、蒲池雄介
2. 発表標題 ゲノム編集で生じたインデル頻度を分析するサンガー法に基づいたウェブツールの比較
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木加奈枝、岡田啓汰、梶尾浩大、田部井輝侑、今井捷智、盆子原友希、蒲池雄介
2. 発表標題 dual-guide CRISPR RNAと野生型またはHiFi Cas9からなるリボヌクレオタンパク質複合体の切断効率に影響を与えるcrRNAの配列特徴
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶尾浩大、漆原舞、川口雄也、蒲池雄介
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおけるIssDNAを用いた複合タグのノックイン: IssDNA構造の影響 評価とノックインラインの確立
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

高知工科大学 NEWS & TOPICS
 岡田 啓汰さんらの論文が英国科学雑誌「Nucleic Acids Research」に掲載されました
<https://www.kochi-tech.ac.jp/news/2022/005729.html>

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