

# 研究報告書

## 「光による革新的ゲノム改変技術の開発」

研究タイプ：通常型

研究期間：2017年4月～2020年3月

研究者：野間 健太郎

### 1. 研究のねらい

遺伝子の異常は様々な疾患を引き起こす。一遺伝子の異常によって起こる疾患についての理解が進んできた今、次の重要な課題は、「複数の遺伝子が関連する複雑な疾患を理解すること」と「重要な遺伝子がコードするタンパク質の機能を一アミノ酸レベルで深く理解すること」である。本研究の目的は、これらの生物学的課題に挑戦するために、世界初の光を用いたゲノム改変技術を確立することである。

本研究の一つ目の課題は「機能が重複した遺伝子群の発見」である。これまでの研究では、単一の変異では表現型があらわれない、機能が重複した遺伝子群についての解明が進んでいない。そこで、ゲノム全体ではなく、機能重複が疑われる一部の遺伝子群に重点的に変異を導入し、未知の多重変異体を単離することを目指す。この研究は、複数の遺伝子の変異が原因となって生じる疾患の理解につながる可能性がある。二つ目の課題は「特定のタンパク質内における重要なアミノ酸の発見」である。重要な遺伝子が同定された後に必要なことは、その遺伝子がコードするタンパク質がどのようにかはたらくかを一アミノ酸レベルで理解することであるが、多細胞生物でこれを行うことは難しい。そこで、多細胞生物での一遺伝子に対するランダムなアミノ酸置換変異導入方法の開発を目指す。この研究はタンパク質機能メカニズムの本質的理解につながるだろう。

これらの課題の実現のために、私はこれまでに光依存的に活性酸素を産生するタンパク質 (miniSOG) を利用した変異導入方法を開発し、線虫を用いて研究を進めてきた (Noma and Jin, *Nat. Comm.*, 2015)。本さきがけ研究では、miniSOG を様々な DNA 結合タンパク質と組み合わせることにより、上記の課題を実現することを目指す。

本研究で開発する光を用いたゲノム改変技術は幅広い遺伝子スクリーニングへの応用が可能であり、また、線虫のみならず光を通しやすい細菌、酵母、ショウジョウバエ、哺乳動物細胞など多様な生物に利用できる。たとえば、ヒトのガン化に関わる転写因子の標的を発見することなどに、本研究を応用できるだろう。このように、光を用いたゲノム改変技術は、多くの分野、モデル生物で新たな発見に貢献し、生命現象の理解、さらには遺伝子疾患の原因解明につながる事が期待される。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

これまでの研究で、ヒストンに miniSOG を結合したタンパク質を用いて、ゲノム全体への変異導入を行ってきた。この技術を応用して、関連する遺伝子群 (たとえば神経系ではたらく遺伝子群) に重点的に変異を導入すれば、機能が重複した遺伝子群の多重変異体を得られるのではないかと発想した。そこでゲノムの特定の領域に結合する転写因子に miniSOG を融

合したタンパク質を発現する線虫を作製し、光による変異の導入を試みた。しかしながら、光照射依存的な変異の導入は確認できなかった。同様に単一遺伝子に様々なアミノ酸置換変異を導入するために、不活性化 Cas9 と miniSOG の融合タンパク質を用いた変異導入を試みたが、光照射によって変異体が生じなかった。

上記の事実は、これまで全ゲノムに対する変異導入に用いてきたヒストン-miniSOG とは異なる、転写因子-miniSOG や不活性化 Cas9-miniSOG に特有の問題が存在することを示唆している。そこで、原因と考えられる以下の三つの問題それぞれについて対策を講じた：1) 生殖細胞におけるトランスジーンサイレンシング、2) miniSOG による変異導入効率が不十分であること、3) miniSOG と標的タンパク質を融合する条件が不適切。1) については、PATC イントロン (Frokjaer-Jensen et al., *Cell*, 2016) の挿入によって、サイレンシングが抑制されることを見出した。2) については、miniSOG をタンデムに結合することによって、変異導入効率の上昇が見られることを明らかにした。3) については、条件検討すべき課題が多く、線虫を用いた実験ではスループット性が低すぎるのが問題になった。そこで新たに、酵母と生化学的手法を用いて、転写因子-miniSOG による光依存的な変異導入系の開発を行った。

以上のように、線虫を用いた原理の証明には至らなかったものの、本さきがけ研究を通して、この目的を達成するための基盤となる技術の開発や知識の蓄積を行うことができた。

また、当初は予定しなかったが、ヒストン-miniSOG を用いて、光依存的に簡便にトランスジーンをゲノムに挿入する方法を開発し、論文として発表した (Noma and Jin, *G3*, 2018)。

## (2) 詳細

### 研究テーマ1「転写因子-miniSOG による特定の遺伝子群への変異導入方法の開発」

既知の転写因子として DAF-16 と UNC-3、また、生殖細胞に発現する DNA 結合因子として PIE-1 と TBP-1 を選択し、それぞれについて、miniSOG 融合タンパク質を生殖細胞で発現する線虫を作製した。これらに光照射を行ったが、変異導入はトランスジーンを発現していない線虫と比べて優位に高くはならなかった。また、DAF-16 を用いた系統については、全ゲノムシークエンスを用いた解析も行ったが、光照射依存的な変異導入は確認できなかった。この問題を解決するために以下の三つの課題に取り組んだ。(1) 生殖細胞においては、多コピーの外来遺伝子がサイレンシングされることが知られているため、単一コピーの挿入を行った。しかしながら、転写因子-miniSOG を用いた場合には、単一コピーにもかかわらず、ヒストン-miniSOG には見られないサイレンシングが起こった。そこで、生殖細胞でのサイレンシングを抑制するとされる PATC イントロン (Frokjaer-Jensen et al., *Cell*, 2016) を挿入したコンストラクトを作製し、サイレンシングが抑制されることを見出した。(2) 活性酸素を用いた変異導入方法の効率化を目的として、miniSOG 以外の活性酸素産生タンパク質の検討 (SuperNova など)、光照射条件の検討、miniSOG のタンデム化を行い、ヒストン-miniSOG による変異導入を用いて効率を評価した。その結果、miniSOG をタンデム化した場合にのみ、変異導入効率の上昇が見られた。ただし、タンデム化する miniSOG の分子数を増やすことによって、(1) で述べたサイレンシングが起きやすくなったため、PATC イントロンを増やすなどの工夫が必要である。(3) 転写因子と miniSOG との融合タンパク質をつくる場合、転写因

子のどの部分を用いるか、また、リンカーの長さ・種類・位置など検討項目が多い。さきがけの期間内に線虫を用いてこれらの検討を行うことは困難であると判断し、出芽酵母と *in vitro* の系を導入することにした。現在、GAL4-miniSOG と GAL4 に結合する UAS 配列をもとにした、光による変異導入方法の構築を行っている。

以上のように、研究テーマ1に関しては、原理の証明を行うことに予想以上に時間がかかっており、当初目的としていた二重変異体の単離には至らなかった。しかしながら、光によるゲノム改変の基盤となる技術やノウハウを蓄積することができ、さらに当初は予定していなかった酵母や *in vitro* の実験系を立ち上げることができた。

### 研究テーマ2「不活性化 Cas9-miniSOG による特定の遺伝子に対する網羅的変異導入方法の開発」

不活性化 Cas9-miniSOG と、*dpy-10* のガイド RNA を用いて、光依存的な変異の導入を試みた。miniSOG は多数のヌクレオチド置換変異を導入することが明らかになっているので (Noma and Jin, *Nat. Comm.*, 2015)、この方法が成功すれば、Cas9 では得ることが難しい、アミノ酸置換変異体を得ることができるはずである。しかしながら、ポジティブコントロールとして用いた Cas9 では変異導入が起こるのに対して、不活性化 Cas9-miniSOG については光依存的な変異の導入が見られなかった。これはおそらく上記で示したサイレンシングと、miniSOG を用いた変異導入効率が不十分であることが問題であると考えられる。この研究を進めていた 2017 年に、Harvard 大学の David Liu 博士らのグループから、不活性化 Cas9 と塩基置換酵素を組み合わせた方法により、原理的には一遺伝子に対して、網羅的にアミノ酸置換変異を導入できる方法が報告された (Gaudelli et al., *Nature*, 2017)。このことから、2017 年以降はテーマ1と3を中心に研究を進めた。

### 研究テーマ3「光依存的変異導入法によるトランスジーンゲノム挿入方法の開発」

これまで、線虫における多コピーのトランスジーンゲノムへの挿入は、多くの時間と労力を要する作業であった。そこで、当初の研究計画にはなかったが、これまでに開発してきた光による変異導入方法を用いて、トランジーンゲノムへの挿入を短期間かつ簡便に行う方法を開発した (Noma and Jin, *G3*, 2018)。現在、この論文を元にした二つの共同研究が進んでおり、一つについては論文査読中である。

## 3. 今後の展開

これまでの研究で、酵母と *in vitro* の系を用いて、光依存的変異導入を検出する系を立ちあげた。まずはこれらの系を用いて、光依存的な変異導入がどのように起こるのかを明らかにする。これまでの研究で、光依存的変異導入を多細胞生物である線虫に応用する際に問題となる、効率の低さや生殖細胞での外来遺伝子の発現方法についての知見を蓄積してきた。そこで今後は、それらをいかして、線虫を用いた原理の証明を行う。さらに、この方法を用いて、神経系ではたらく機能が重複していると思われる遺伝子群に変異を導入し、未知の多重変異体の単離を目指す。

#### 4. 自己評価

##### ・研究目的の達成状況

当初予定していた研究目的である *in vivo* での原理証明、および二重変異体の単離には至らなかった。しかしながら、研究を進めていく上で生じた問題を一つ一つ解決していくことによって、今後、原理の証明にいたる上で必要な基礎技術や、当初は予定していなかった酵母や *in vitro* の系を確立することができた。

##### ・研究の進め方

研究期間が始まってすぐに、名古屋大学に特任助教としてのポジションを獲得し、研究室のセットアップをすることができた。このことにより、当初予定していたよりも多くの研究費を、機器の購入などの設備費に使用することになった。また、常時一人から二人の研究補助者とともに研究を行うことによって、効率的に研究を進めることができた。

##### ・波及効果

本研究は基礎研究に利用するためのツール開発が主たる目的であるため、すぐに社会実装ということにはならないが、この技術が完成すれば、遺伝子スクリーニングをデザインする際の幅が広がり、重要な遺伝子群の発見に寄与できると考えている。また、本研究で開発に成功した光を用いたトランスジーンゲノムへの挿入方法については、現在までに問い合わせや共同研究の申し込みをいただいております。今後さらなる普及が期待できる。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Noma and Jin, Rapid Integration of Multi-copy Transgenes Using Optogenetic Mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*, *G3*, 2018, 8, 2091-2097

##### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

##### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- ・2018.9.14-15, Kentaro Noma, Future of the nematodes studies, Mishima, Oral and Poster
- ・2019.8.21-22, Kentaro Noma, Future of the nematodes studies, Nagoya, Poster
- ・2019.9.26-30, Kentaro Noma, JAGFoS, Kyoto, Poster