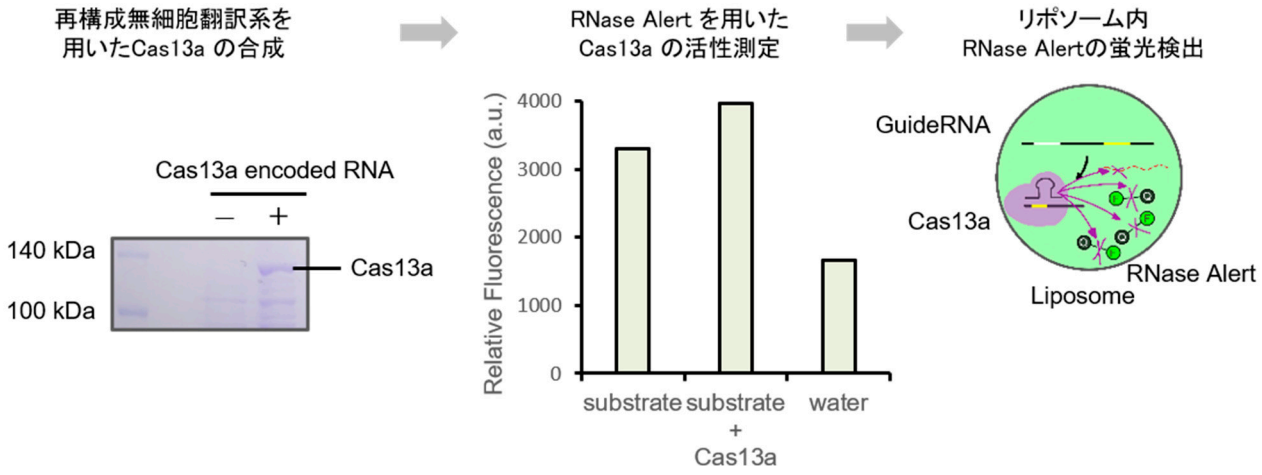
153　人工ミニ染色体のリポソーム内再構成法の開発	辻　岳志

【目的】染色体構造は、長鎖 DNA を細胞の核内に収納するだけでなく、染色体を構成するタンパク質や DNA が化学修飾を受けることで、ゲノム情報に依存しないエピジェネティックな経路で遺伝子の発現制御に重要な機能を持っている。この構造を人工的に再構成することは、細胞の新規制御法の確立や、非天然修飾による染色体構造制御機構の開発、染色体構造の生化学的な機能解明など様々な分野・技術開発に重要である。しかし、未だ、染色体構造を再構成し、非細胞環境下で転写・翻訳することや、エピジェネティック制御の細胞外再構成は達成されていない。その理由として、細胞外で、Widom 601 配列などのヒストンタンパク質と相互作用しやすい配列を用いずにヌクレオソーム構造を再構成することが困難である、という課題が挙げられる。そこで、ヌクレオソーム構造を脂質二重膜小胞（リポソーム）に封入し、セルソーターによってヌクレオソーム構造を検出・分取することで、再構成効率の低いヌクレオソームを精製できるようになり、人工染色体の作製と発現系の開発が可能になると考えた。具体的には、ヌクレオソーム構造を形成していない DNA を内封したリポソーム内では、活性化された Cas13a により RNase Alert の蛍光が検出され、ヌクレオソーム構造が形成されている場合には、リポソーム内で赤色蛍光タンパク質が無細胞翻訳されることで、蛍光の種類によってヌクレオソームの有無を識別し、分取する手法の開発に取り組んでいる。本研究では、その基盤技術となる Cas13a の精製、無細胞翻訳系による Cas13a の合成、Cas13a の RNA 切断活性の検出を行った。

【方法】再構成無細胞翻訳系 PURExpress 1.0 を用いて Cas13a を合成した。その後、独自に設計した crRNA と target RNA を加え、RNA 切断により蛍光が検出できる RNase Alert を用いて、無細胞翻訳した Cas13a の酵素活性を検出した。まず、UV ランプによる切断された RNase Alert の蛍光検出と plate reader を用いて Cas13 の有無による相対的な蛍光輝度を測定した。

【結果】再構成無細胞翻訳系によって合成された Cas13a が構造を形成し、酵素活性を有すること、および本研究でデザインした crRNA および target RNA が機能することを示した。しかし、Cas13a の分子数に対して、crRNA、target RNA 分子が不足しており、RNase Alert 切断量が低いためにフローサイトメーターを用いて蛍光を検出できない可能性が示唆された。そのため、無細胞翻訳系で Cas13a を合成した後に精製するため、N 末端に His-tag を導入し、精製、濃度の決定と RNA 濃度の検討を行う必要がある。RNase Alert を RNaseA で切断した場合にはフローサイトメーターで蛍光を検出できたため、Cas13a の活性を上げることで、セルソーターでの検出は可能になると考えられる。

ヌクレオソーム構造がないときのリポソーム内蛍光検出の概略



153. 人工ミニ染色体のリポソーム内再構成法の開発

辻　岳志

福井大学 学術研究院 工学系部門 生物応用化学講座

Key words：リポソーム，ヌクレオソーム，エピジェネティクス，再構成

緒　言

染色体構造は、ゲノム DNA という長鎖 DNA を細胞の核内に収納するために必要な構造であるだけでなく、染色体上の遺伝子を複雑に制御するための基盤構造でもある。例えば、染色体構造を構成するヒストンタンパク質や、遺伝子をコードする DNA がメチル基やアセチル基などの化学修飾をされ、その化学修飾を認識するタンパク質により、染色体構造が密になったり疎になったりする。この染色体構造の変動は、遺伝子を転写するタンパク質が染色体上にリクルート（運ばれてくる）される量を調整し、結果としてタンパク質の合成量を制御している。化学修飾による染色体構造制御は可逆的であり、環境変動や薬剤刺激、あるいは栄養飢餓など細胞の状態に応じて必要なタンパク質の時間的空間的供給量の制御を可能にする。これまでに、出芽酵母や培養細胞を用いて、このようなゲノム情報に依存しないエピジェネティックな制御に関わる様々な因子が同定されてきた［1］。しかし、エピジェネティクス制御に必要なタンパク質の欠損や変異は、細胞内で大規模な遺伝子転写量の変動を引き起こすうえ、近年の一細胞解析から、出芽酵母のような単細胞生物でも、細胞ごとに染色体構造や遺伝子の発現状態が異なっていることが分かっており［2］、細胞を用いた従来の研究では、エピジェネティクス制御関連タンパク質の機能を定量的に解析することは困難である。そこで、正常なタンパク質の機能や変異タンパク質との機能の違いを定量的に比較・解析するために *in vitro* 系における染色体構造モデルが必要となる。細胞外での染色体構造の再構成は、染色体の基本単位であるヌクレオソームの構造解析などで技術的には確立されている［3］。だが、これまでの手法は、遺伝子をコードしていない、Widom 601 配列などが用いられてきた。このヌクレオソームモデルでは、染色体構造に対して DNA 複製酵素がどのような挙動を示すかなど、物理的な現象を解明できる一方で、染色体の修飾による遺伝子発現の制御や、それに関わるタンパク質の機能、変異による表現型を解析することはできていない。このような解析が可能になれば、エピジェネティック制御の分子機構の解明だけでなく、遺伝子発現制御の後天的破綻によって発症する可能性が示唆されているガンや白内障などの治療ターゲットの発見や染色体構造の人工的制御による新規機能細胞の構築など様々な分野への波及が期待される。これを達成する際のおおきな課題の一つは、染色体の基本構造であるヌクレオソーム構造を簡便に検出し、構造を取ったヌクレオソームを回収する方法がないことである。そこで、本研究ではリポソーム内のヌクレオソーム構造を蛍光によって検出し分取する技術の開発を目指した。具体的には、ヌクレオソーム構造の基質となる DNA 上に、RNA 切断酵素 Cas13a（c2c2）の crisprRNA（crRNA）と相補的なガイド配列を末端に入れておき、ヌクレオソーム構造が形成されておらず、DNA から RNA が転写された場合には、Cas13a が RNA の両端に蛍光物質と消光物質がそれぞれ結合した基質（RNase Alert）を切断し、緑色蛍光が得られるようにする。一方、ヌクレオソーム構造が形成されている場合には、Cas13a が活性化されず、リポソーム内で再構成無細胞翻訳系により、赤色蛍光タンパク質 RFP が合成される系を確立する。これによりセルソーターを利用することで、ヌクレオソームの再構成率が低くとも、再構成されたヌクレオソームを選択的に分取し、遺伝子発現などの他の反応系へ利用することが可能となる。

方法および結果

1. Cas13 タンパク質の精製

過去の文献［4］を参考に、大腸菌内で Cas13a タンパク質を発現誘導し精製を行った。pET28a プラスミドを *Nde* I、*Bam* HI を用いて切断し、pC019［5］プラスミドから PCR で増幅した Cas13a 遺伝子配列を挿入した。この時、pGEX-KG を用いて、GST を N 末端に付加した Cas13a および N 末端に GST かつ C 末端に、GFP、RFP、mcherry、mKATE2、tagGFP、tagRFP を付加した Cas13a タンパク質のコンストラクトを BL21（DE3）および Rosetta 2（DE3）に形質転換し IPTG 誘導を行ったが、増殖阻害が認められ、さらに、蛍光顕微鏡、フローサイトメーター、SDS-PAGE 後の CBB 染色、GST-抗体を用いた Western blot でタンパク質の検出を行ったところ、蛍光タンパク質融合 Cas13a の発現が認められなかったため、これらのコンストラクトは本研究では用いないこととした。次に、N 末端に His-tag を付加した Cas13a をコードしたプラスミドを Rosetta 2（DE3）に形質転換し、得られたコロニーを液体 LB 培地で一晩培養した。その後、OD600 が 0.5 になるまで 37℃で培養し、IPTG を 0.2 mM になるように添加した後、18℃で 20 時間培養した。得られた菌体を超音波破砕し、抗 His-tag ビーズを用いて精製した。そして、遠心濃縮カラムを用いて濃縮後、SDS-PAGE し、CBB 染色により Cas13a を検出した（図 1）。同様の操作を His-tag GFP でも行い、His-tag GFP を精製し、CBB 染色により検出した。。その結果、 His-Cas13a の方では、130 kDa 付近に目的のバンドがわずかに見られたため、Image J を用いてバンドパターンを比較した。しかし、精製量が低く、インクルージョンボディの形成や不溶化の可能性を考え、それぞれの画分の検出を行ったが、Cas13a の検出はできなかった。そのため、現在、発現法の改善や、Urea などを用いた可溶化の検討を行っている。

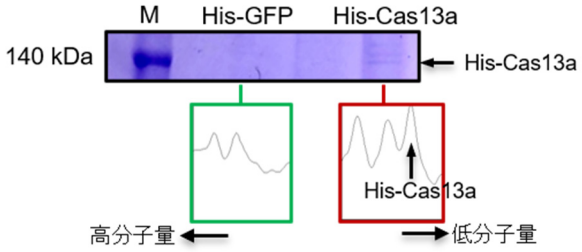


図 1. His-tag Cas13a の CBB 染色

His-tag GFP と His tag Cas13a を発現させた大腸菌から抗 His-tag ビーズを用いてタンパク質を精製し、SDS-PAGE 後に CBB 染色を行った。得られたバンドを Image J を用いて解析した。M：protein size marker。

2. Cas13 タンパク質の酵素活性検出

精製した Cas13a に対して RNase Alert および RNase Alert v2 を用いて、RNA 切断能を調べた。この時、クリスパーRNA（crRNA）は下記のオリゴをプライマーかつテンプレートとして用いて、target RNA は下記 primer と BY5445（NBRP）のゲノム DNA をテンプレートとして、PCR によって目的の DNA 断片を作製し、T7 RNA polymerase を用いて *in vitro* 合成を行った。

crRNA primer 1：gaattaatacgactcactatagggagaccacaacggtttccctgatttagactaccccaaaaacgaaggg

crRNA primer 2：ataagataagataggataagataacaaagttttagtccccttcgtttttggggtagtctaaatc

target RNA primer 1：gaattaatacgactcactatagggagaccacaacggtttccctaacaggtgtgcttgcacc

target RNA primer 2：cgcaatgatttgttatcttatccta

合成した RNA を精製し、Cas13a の酵素活性の測定に用いた。この時、反応溶液として、45 nM Cas13a protein、22.5 nM crRNA、125 nM RNase Alert v2 substrate、100 ng target RNA を混合し、37℃で 2 時間反応させた。その後、plate reader（TECAN、infinite F500）および、反応後の溶液を内封した脂質二重膜小胞（リポソーム）をフローサイトメーター（FCM；BD、FACS Canto Ⅱ）を用いて測定したが、緑色蛍光は検出できなかった。リポソームは過去の報告［6］の条件に、上記の反応後の溶液を内液組成に加えて作製した。

3. Cas13 タンパク質の無細胞翻訳と酵素活性検出

大腸菌を用いた Cas13a の精製と並行して、PURE frex 1.0（Gene frontier）を用いて、Cas13a の無細胞翻訳手法の確立を行った。再構成無細胞翻訳系を用いた Cas13a の合成と、合成した Cas13a が立体構造を形成し、酵素活性を持つかは未だ報告されていない。そこで、pC019 プラスミドを鋳型として、RBS（リボソーム結合部位）と T7 promoter 配列を付加したプライマーを用いて、Cas13a の遺伝子配列を増幅した。その後、T7 RNA polymerase を用いて RNA を合成し、PURE frex に加えて無細胞翻訳を行った。その後、SDS-PAGE および CBB 染色により Cas13a タンパク質を検出した（図 2A）。次に、合成した Cas13a に、上記と同様の crRNA および target RNA を加え、RNase Alert を用いて RNA 分解活性を測定した。精製 RNase A を対照とし、UV light によって蛍光を簡便に見たところ、Cas13a を加えたときに RNA 分解が起こっていることが分かった（図 2B）。さらに、相対蛍光強度を plate reader を用いて測定した（図 2C）。これらの結果から、今回、無細胞翻訳系によって合成した Cas13a は立体構造を形成し、*in vitro* 合成した crRNA と target RNA を取り込んで RNA 切断能を持つことが分かった。そこで、反応後の RNase Alert をリポソームに封入し、フローサイトメーターで蛍光測定を行ったが、Cas13a の有無に対して有意に蛍光を示したリポソームの割合は 0.7%程度であった。一方で、RNase A によって完全に基質を分解した場合にはフローサイトメーターで蛍光を検出できたため、RNase Alert の基質量は十分であることが分かった。

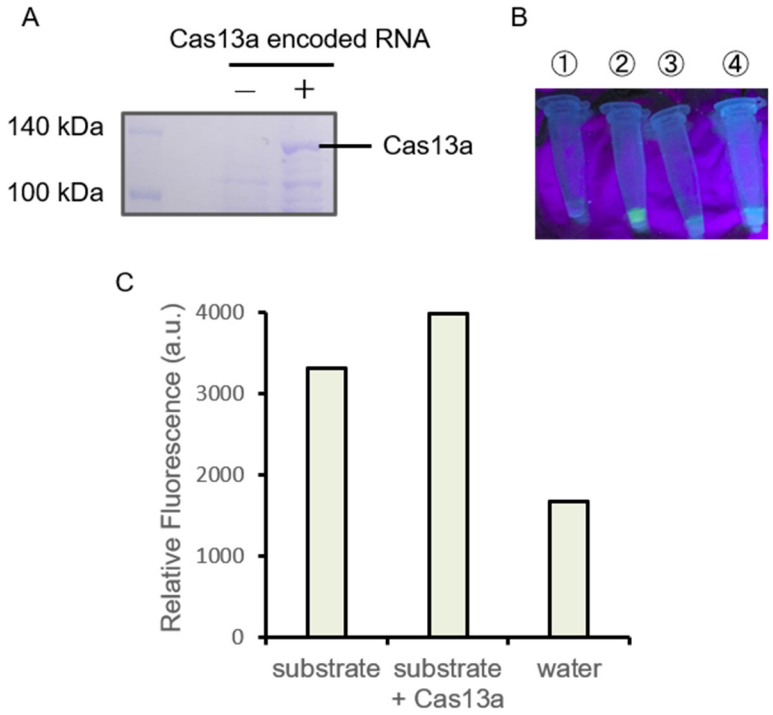


図 2. Cas13a の無細胞翻訳と活性測定

A) PURE frex v1.0 に Cas13a の遺伝子およびリボソーム結合配列を付与した RNA を加え、Cas13a を合成した。その後、SDS-PAGE、CBB 染色により Cas13a を検出した。

B) Cas13a を用いて RNase Alert を分解し、UV ランプを用いて蛍光を検出した。
①：－ RNase A、②：＋ RNase A、③、④：＋ Cas13a

C) 基質のみ、基質＋Cas13a、基質なしの 3 つの溶液の反応後、plate reader を用いて蛍光を測定した。縦軸は、基質＋Cas13a を基準とした相対輝度。基質+ RNase A の相対輝度は、基質＋Cas13a の 10 倍の値であった。

考　察

本研究では、ヌクレオソーム構造を蛍光によって検出する系を確立するために、その系に用いる Cas13a タンパク質の精製と活性測定を行った。Cas13a タンパク質を、大腸菌を用いて発現・精製する手法は過去に報告されており、その報告をもとに精製を行ったが、精製した Cas13a タンパク質は活性を検出することはできなかった。IPTG 誘導時に増殖阻害が見られたことから、現在は、IPTG 誘導ではなくラクトース含有培地を用いた誘導や、Urea などを用いてタンパク質の凝集などを防ぎ、精製する手法を検討している。

大腸菌を用いた Cas13 タンパク質の精製の代替案として、再構成無細胞翻訳系を用いた Cas13a の合成法を確立した。本手法では、Cas13a タンパク質を大量に得ることはできないが、一方で、大腸菌由来のタンパク質の混入が減り、精製および下流の反応系への利用が容易である。再構成無細胞翻訳系による Cas13a の合成は報告されていないが、合成された Cas13a が酵素活性を持つこと、および本研究で設計した、crRNA および target RNA が機能することを示した。また Cas13a はウイルス RNA などの検出に用いられているが、リポソームに封入しフローサイトメーターで検出できるかは不明であった。リポソームに Cas13a 反応後の RNase Alert を封入し、蛍光をフローサイトメーターで測定したところ、0.7%程度のリポソームからのみ蛍光が見られた。この原因として、今回 Cas13a タンパク質は再構成無細胞翻訳系のタンパク質と混在しており、タンパク質濃度を決定していなかったため、crRNA および target RNA の量が不足しており、RNA 切断能の測定ができなかった可能性が考えられる。実際に、大腸菌から精製してきた Cas13a を用いて、ウイルスの RNA を検出する際には、target RNA となるウイルス RNA を事前に増幅することで、Cas13a の RNA 検出能を向上させたことが報告されている［7］。そこで、His-tag を付与した Cas13a の無細胞翻訳と精製、濃度の決定を行い、crRNA と target RNA の最適濃度の決定を行っていく予定である。Cas13a の RNA 切断能を FACS で検出できるようになれば、本研究の目的である、ヌクレオソームの分取のみならず、特定の配列を持つウイルス・細胞を分取し、培養・解析が可能になるなど、Cas13a を用いた研究・応用への展開が期待される。

本研究で目指している、細胞外での染色体の再構成と、染色体からの無細胞翻訳系の確立は、ボトムアップ型人工細胞リアクタの応用範囲を飛躍的に広げ、かつ、染色体の機能を非細胞環境下で詳細に調べ、利用するために重要な技術である。本研究期間で、大腸菌からの Cas13 タンパク質精製は達成できなかったものの、Cas13a の無細胞翻訳合成法の確立および合成したタンパク質の活性の検出に成功した。今後は、本研究期間では達成できなかった、ヌクレオソームの検出系の構築を目指したい。具体的には、Widom 601 配列に target 配列を付与した断片を用いてヌクレオソームを作製し、リポソームに封入した後に、Cas13 タンパク質と再構成無細胞翻訳系を用いて、ヌクレオソーム構造を蛍光検出し、セルソーター（BD FACS Melody）を用いて分取する手法の確立に取り組む。

共同研究者・謝辞

本研究は福井大学学術研究院工学系部門生物応用化学講座生物化学研究室で行いました。共同研究者の沖昌也教授および、crRNA と target RNA の設計をしていただいた東出望花博士に深く御礼申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました上原記念生命化学財団に深く御礼申し上げます。

文　献

1）　Rusche LN, Kirchmaier AL, Rine J. The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in Saccharomyces cerevisiae. Annual review of biochemistry. 2003;72:481-516. Epub 2003/04/05. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161547. PubMed PMID: 12676793.

2) Mano Y, Kobayashi TJ, Nakayama J, Uchida H, Oki M. Single cell visualization of yeast gene expression shows correlation of epigenetic switching between multiple heterochromatic regions through multiple generations. PLoS biology. 2013;11(7):e1001601. Epub 2013/07/12. doi: 10.1371/journal.pbio.1001601. PubMed PMID: 23843746; PubMed Central PMCID: PMCPMC3699475.
3) Kujirai T, Arimura Y, Fujita R, Horikoshi N, Machida S, Kurumizaka H. Methods for Preparing Nucleosomes Containing Histone Variants. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2018;1832:3-20. Epub 2018/08/04. doi: 10.1007/978-1-4939-8663-7_1. PubMed PMID: 30073519.
4) Zhang C, Konermann S, Brideau NJ, Lotfy P, Wu X, Novick SJ, et al. Structural Basis for the RNA-Guided Ribonuclease Activity of CRISPR-Cas13d. Cell. 2018;175(1):212-23.e17. Epub 2018/09/23. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.001. PubMed PMID: 30241607; PubMed Central PMCID: PMCPMC6179368.
5) Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, Han S, Joung J, Belanto JJ, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. Nature. 2017;550(7675):280-4. Epub 2017/10/05. doi: 10.1038/nature24049. PubMed PMID: 28976959; PubMed Central PMCID: PMCPMC5706658.
6) Tsuji G, Fujii S, Sunami T, Yomo T. Sustainable proliferation of liposomes compatible with inner RNA replication. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2016;113(3):590-5. Epub 2015/12/30. doi: 10.1073/pnas.1516893113. PubMed PMID: 26711996; PubMed Central PMCID: PMCPMC4725462.
7) Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. Science. 2017;356(6336):438-42. doi: 10.1126/science.aam9321.