

単一遺伝子を搭載した最小人工染色体モデルのリポソーム内再構成

研究代表者： 辻 岳志（工学系部門・助教）

概要	単一遺伝子を搭載した最小人工染色体モデルのリポソーム内再構成
関連キーワード	リポソーム・再構成・染色体機能・合成生物学・エピジェネティクス

本研究期間では、(1)ヌクレオソーム構造の再構成およびリポソームへの封入法の開発と(2)SLOによるリポソーム膜を介したタンパク質の供給法の確立を行った。(1)では、リポソーム内にヌクレオソーム構造を封入できたが、それをオンタイムで検出する系がないため、蛍光を用いてヌクレオソーム構造の有無を識別できる新規検出系の開発が必要である。(2)では、今後のリポソーム内での染色体構造制御を見据えた、外部からのタンパク質供給法として、SLOを用いたリポソーム膜孔を介したタンパク質供給法を確立した。この方法により、実際に酵素をリポソームに供給し、生化学反応を駆動できることを示した。これらの手法を用いて、今後はリポソーム内での染色体構造再構成とその利用を目指す。

研究の背景および目的

染色体構造は、長鎖DNAを核に収納するために必要な構造だが、それだけでなく染色体構造を構成するタンパク質や遺伝子をコードするDNAがメチル化やアセチル化などの化学修飾されることで、遺伝子の発現量が調節されることが分かってきた。このようなエピジェネティックな制御は、生物の発生や細胞の分化に必要であり、その破たんがガンなどの難治性疾患の原因の一つであることが示唆されている。そのため、酵母や培養細胞を用いて、エピジェネティクスに関わる様々な因子が同定されてきた(Laura N. R. et al. 2003)。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(Mano Y, et al., 2013)、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(Zukowski A. et

al. 2017, Kujirai T. et al. 2018)。だが、これまでの手法は、構造解析にのみ注目しており、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、染色体構造上を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、ライフステージの後期に発症する難治性疾患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。

現在、染色体の構造と染色体上の遺伝子発現、そして構造制御因子が揃った再構成モデルは存在していない。そこで、遺伝子をコードしたDNAを用いて、染色体構造を再構成した、人工ミニ染色体を構築することで、単純な系で構造制御タンパク質の変異による影響を解析できるようになる。本研究では、このような人工ミニ染色体をリポソーム内で再構成することを目指している。

研究の内容および成果

本研究期間では、(1)ヌクレオソーム構造の再構成およびリポソームへの封入法の開発と、(2)

Streptolysin O (SLO)によって形成された膜孔を介したタンパク質の供給法の確立を行った。

(1)ヌクレオソーム構造のリポソーム内再構成および封入法の開発

リポソームを用いた最小人工染色体モデルを開発するためには、ヌクレオソーム構造をリポソームに封入する必要がある。そこで、精製ヒストンタンパク質を用いて塩濃度を利用してヌクレオソームを再構成し、従来の MNase 処理によるヌクレオソームの検出を行った。次に、得られたヌクレオソーム構造をリポソームに封入した。しかしながら、現在、ヌクレオソーム構造を蛍光などにより簡便かつオンタイムで検出する系が確立されていない。そこで、ヌクレオソーム構造の有無を蛍光によって識別できる新規検出系の開発に取り組んでいる。

(2) SLO を用いたリポソーム膜を介したタンパク質の供給法の確立

リポソームに内封した人工染色体モデルに対して、メチル基転移酵素などの修飾酵素を供給し、遺伝子発現を指標として染色体構造制御機構の解明を目指している。そのためには、人工染色体を内封したリポソームに対するタンパク質供給法の確立が必要である。従来のリポソームへのタンパク質供給法は、膜タンパク質を用いた 3 kDa 以下のタンパク質供給やリポソーム同士の電気融合や凍結融解融合など様々な手法での膜融合を介した供給法に限られていた。これらは、酵素のような巨大分子を供給することができない、あるいはリポソームの破裂を伴い、反応区画が安定しないなどの課題が挙げられた。そこで、本研究では、細胞膜に孔を開けることが知られている SLO タンパク質を用いて、タンパク質の供給法を確立した。

SLO を細胞膜に添加した研究では、細胞質に含まれるタンパク質の流出入が可能であることが示されていた (Kano F. et al. 2012)。しかし、同じ条件でリポソームに SLO を用いて孔を開けようとしたところ、80 kDa のトランスフェリンアレキサタンパク質 (緑色蛍光タンパク質 TA488 と赤色蛍光タンパク質 TA647) は全く通過しないことが分かった。そこで、リポソーム膜の組成について、チャージを持つ脂質 (POPG) とコレステロール含有

量 (w/v %) を検討したところ、POPG 20 % (w/v %) かつコレステロール 50% (w/v %) 以上の時に TA488 および TA647 が通過することが分かった。また、この時、SLO の濃度は高ければ高いほど有効であるだけでなく、SLO の添加量に依存して、リポソームの構造を保ったままタンパク質が通過する量が増え、コレステロール含有量によって SLO の量は調節する必要があることを見出した (図 1)。そして、およそ 90 kDa の RNA 合成酵素 T7 RNA polymerase を同様の条件で供給し、DNA を基質として、RNA を合成できることを示した。これによって、タンパク質の活性を保ったまま、リポソーム膜を介して酵素を供給し、反応を駆動可能なことが分かり、これらの成果を、学術論文として発表した (G Tsuji et al. 2021)。本手法を応用することにより、リポソーム内の人工染色体モデルを基質として、細胞外での染色体構造を介した遺伝子制御機構の再構成が可能になると期待される。

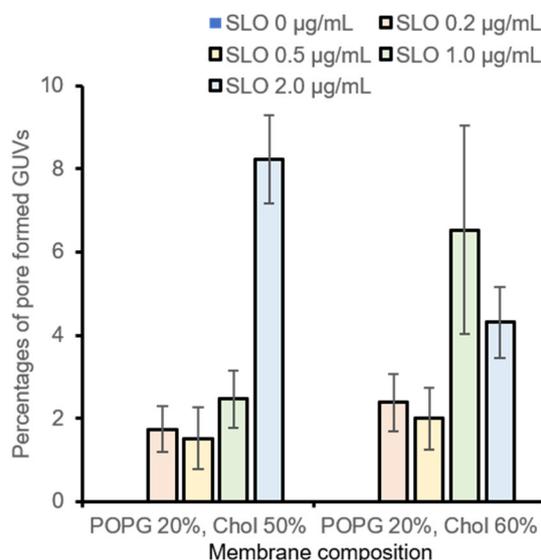


図 1 孔を形成したリポソームの割合

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

[Exchange of proteins in liposomes through streptolysin O pores](#)

Gakushi Tsuji, Takeshi Sunami, Masaya Oki, Norikazu Ichihashi

Chembiochem 2021, DOI: 10.1002/cbic.202100029

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

人工ミニ染色体のリポソーム内再構成

上原記念財団 2020年度 研究奨励金 研究代表者
200万 採択

科学研究費補助金 若手研究

出芽酵母とリポソームの融合による in vitro 核モデルの開発 (研究代表)

研究期間: 2019-04-01 - 2022-03-31 直接経費
260万 研究課題番号: 19K16103