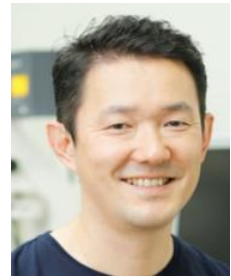


転写プログラムの理解と応用

研究代表者：宮成 悠介 金沢大学 ナノ生命科学研究所 准教授



1. 研究の背景と達成目標

ガン、ウイルス感染、糖尿病、精神疾患、免疫疾患、不妊など、現代社会を取り巻く様々な疾患の克服は急務である。それら疾患の多くは、「遺伝子発現の乱れ」が引き起こす細胞異常が原因である。遺伝子発現の乱れを理解するためには、転写制御機構を包括的に解明する必要がある。細胞の表現型を司る遺伝子発現の研究は、1960年代の mRNA および RNA ポリメラーゼの発見によりスタートし、それ以来、数多くの研究者が転写制御機構について研究してきた。これまでに、ヒトゲノム情報が解読され、転写制御因子や、エピジェネティクス、クロマチン高次構造などの重要性が明らかとなってきた。しかしながら、我々は未だにゲノムに刻まれた「転写プログラム」を理解できていない。「転写制御」の全容を明らかにすることができれば、様々な疾患の原因究明に留まらず、疾患予防、治療薬の開発など、その波及効果は大きい。また、転写制御を理解することによって、遺伝子発現を調整でき、最終的には細胞の表現型を自在に操作するが可能となる。一方で、転写プログラムを理解するためには、クロマチンの状態を1細胞レベルで計測し、転写反応の現場に形成される超分子複合体の実態、および機能を明らかにする必要がある。本研究では、細胞内のクロマチン状態を解析する技術、ならびに小型抗体を応用することにより転写超分子複合体を解析する技術を開発し、転写反応のメカニズムを明らかにする。本研究は、本研究構想の最終目標である、クロマチン操作による細胞運命決定の制御基盤の構築を目指す。

(2) 研究項目毎の目標

- ①クロマチン状態を1細胞レベルで解析する技術を構築し、転写制御機構の解明、ならびにそれを応用した細胞機能の制御をおこなう。
- ②小型抗体を用いた転写制御複合体の解析技術を開発し、細胞内における転写複合体の全容を明らかにする。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- **新規技術 ATACsee の開発により、新規クロマチン制御因子の同定ならびに、その応用例を示した (Nature Genetics, 2024, Methods Mol Biol. 2023)**

技術開発に立脚したアプローチにより(改良型 ATACsee の開発)、新規クロマチン制御因子を同定し、転写制御機構の一つであるクロマチンアクセシビリティの樹立メカニズムの一旦を明らかにした。また、研究結果を応用展開することにより、細胞内のクロマチン状態を人為的に操作し、ゲノム編集や iPS 細胞リプログラミングなどの既存技術の効果を改善することが可能であることを示した。特筆すべきは、本技術は、ゲノム編集やリプログラミングだけでなく、ワクチン開発や再生医療など様々な研究分野に広く応用することが可能であり、その応用範囲は非常に広い。また、「転写プログラムを理解して、細胞機能を人為的に操作する」という、本研究提案を象徴する研究成果である。

● **モジュール型小型抗体フォーマットを開発（現在投稿準備中）**

大腸菌を用いて簡便に作製することができるモジュール型小型抗体フォーマット FvClasp を開発し、クロマチンに結合する転写複合体を従来よりも高精度に検出することに成功した。本研究で開発されたモジュール型小型抗体フォーマットは、転写研究だけでなく、多くの基礎および臨床研究分野において活用することが可能であり、大きな波及効果が期待できる。また、コストを抑えて抗体分子を産生することが可能となることから、医療分野あるいは産業面での応用展開も期待できる。

● **小型ペプチドを用いて膵臓がんマーカーである Survivin の生体イメージングに成功（Chemical & Biomedical Imaging, 2024, Bioconjug Chem. 2022, 特許出願 2023）**

膵臓がんの代表的なマーカー因子である Survivin に特異的に結合するペプチド断片を開発し、細胞内イメージング並びに生体イメージング、並びに Survivin 機能阻害に成功した。また、本研究によって得られたペプチドおよび Nanobody を腫瘍マーカーの特異的プローブとして特許出願した。

3. 研究成果

研究成果 1

Ishii S, Kakizuka T, Park SJ, Tagawa A, Sanbo C, Tanabe H, Ohkawa Y, Nakanishi M, Nakai K, ***Miyanari Y.**

Genome-wide ATAC-seq screening identifies TFDP1 as a modulator of global chromatin accessibility. *Nature Genetics*, 2024 Mar 56(3):473-482. ***責任著者**



***Miyanari Y.** Imaging Chromatin Accessibility by Assay of Transposase-Accessible Chromatin with Visualization. *Methods Mol Biol.* 2023; 2577:93-101. ***責任著者, 筆頭著者**

■ 研究の背景

ゲノム DNA の大部分はヌクレオソームによって覆われているが、プロモーターやエンハンサーなどの転写制御領域はヌクレオソーム構造を取らず、裸の状態が存在する。このようなゲノム領域は、転写因子などの DNA 結合タンパク質が直接結合（アクセス）できるため、アクセシブル-クロマチンと呼ばれる。ゲノム DNA への結合のしやすさ、つまり「アクセシビリティ」は遺伝子の転写活性、DNA の複製反応、修復などのゲノム機能に関与しており、がんを含めた様々な疾患と密接に結びついている。

■ 改良型 ATAC-seq の開発とスクリーニング

我々は、細胞内のアクセシビリティをイメージングすることができる改良型 ATAC-seq を開発した。この技術は従来法と比べ、非特異的シグナルの低減、検出感度の向上(3-5 倍程度)、反応特異性の向上など、クロマチン状態を解析するうえで画期的な基盤技術である（図 1）。次に、CRISPR/Cas9 によるゲノムワイド遺伝子ノックアウト技術と、改良型 ATAC-seq 法を組み合わせたスクリーニングを行ったところ、多くの新規遺伝子群を同定することに成功した。スクリーニングで同定された新規因子群の機能解析を行った。特に、TFDP1 はヒストン遺伝子群の転写活性を制御するマスター因子であり、ヌクレオソームの量をコントロールしていることが明らかとなった。つまり、TFDP1 ノックアウトで

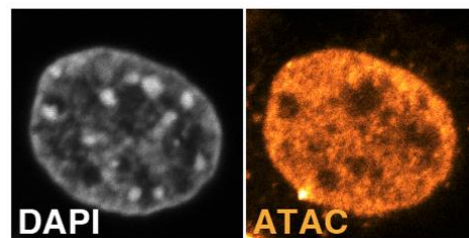


図1, ATAC-seqによるクロマチンアクセシビリティの可視化 (NIH3T3細胞)

は、プロモーターやエンハンサーだけでなく、普段はヌクレオソームによって覆われているようなゲノム領域でもアクセシビリティが高くなる。このようなゲノムワイドな表現型は、他の新規因子のノックアウトでも見られないような、非常にユニークなものであった。

■ ゲノム編集、体細胞リプログラミングへの応用

次に我々は、アクセシビリティを人為的に操作することで、新たなバイオテクノロジーへと応用展開できないかと考えた。CRISPRによるゲノム編集やiPS細胞への体細胞リプログラミングは、共にノーベル賞が与えられた革新的な技術であり、DNA結合タンパク質(Cas9あるいはOct4, Sox2, Klf4, cMycの山中因子)が標的ゲノムDNAに結合することが鍵となる。しかしながら、ゲノムDNAのほとんどの領域はアクセスしにくい状態にある。そこで我々は、TFDP1を一過的にノックダウンし、アクセシビリティを強制的に上昇させた。この細胞を用いて、ゲノム編集やiPS細胞へのリプログラミングを実施したところ、両者は全く異なる技術であるが、共にその効率が優位に上昇することを見出した(図2)。この様に、クロマチンアクセシビリティを人為的に操作することは、DNAをベースとした他の既存技術の効率を改善できる可能性を秘めている。

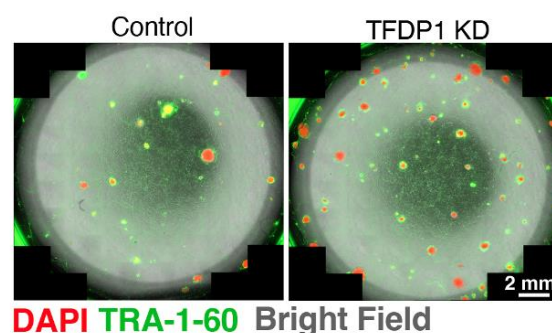


図2 TFDP1ノックダウンによるヒトiPS細胞へのリプログラミング効率の上昇
アクセシビリティを人為的に操作することで、TRA-1-60陽性(緑)のiPS細胞コロニー数が増える。

研究成果 2

Quyhn Pham, Ayako Tagawa, Takao Arimoto, Yusuke Miyanari, Development of small recombinant antibodies with modular functionalities for versatile biological applications. under preparation, 2024

モジュール型小型抗体フォーマットの開発 (現在投稿準備中)

■ 研究の背景

核内には、ゲノムDNAがクロマチンとして高密度に収納されており、転写因子やRNAポリメラーゼなどの多種多様なタンパク質が混在する。また、RNAやタンパク質を含んだ凝集体が形成されることで、核内に局所的な機能性空間を作り出している。核内空間は決して一様ではなく、個々のタンパク質によってアクセスできる核内領域が制限されている。CUT&RUN法などのクロマチン解析技術においてにおいて、IgGなどの大型抗体(150kDa)を用いると、1) 核内空間に抗体がアクセスできずに検出感度が低い、2) 二次抗体などによる非特異的な結合が偽陽性等のアーティファクトを引き起こす、などの問題点が以前から指摘されていた。複雑な転写制御様式を理解するためには、従来のIgG抗体のディスアドバンテージを克服した、革新的な次世代小型抗体技術が必要である。

■モジュール式小型抗体フォーマットの開発

本研究は、小型抗体 FvClasp をベースに、様々な実験技術に即座に使えるモジュール式小型抗体

混ぜるだけで機能付加できるモジュール式rAbシステム

30秒間混ぜるだけ

Fv-Clasp

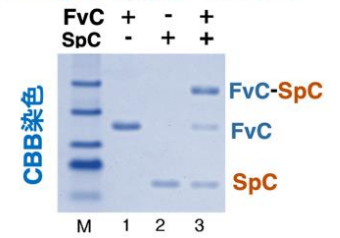


共有結合

SpyCatcher



機能分子X	アプリケーション
Alexa488	免疫染色
HRP	Western Blot
MNase	CUT&RUN
Beads	免疫沈降



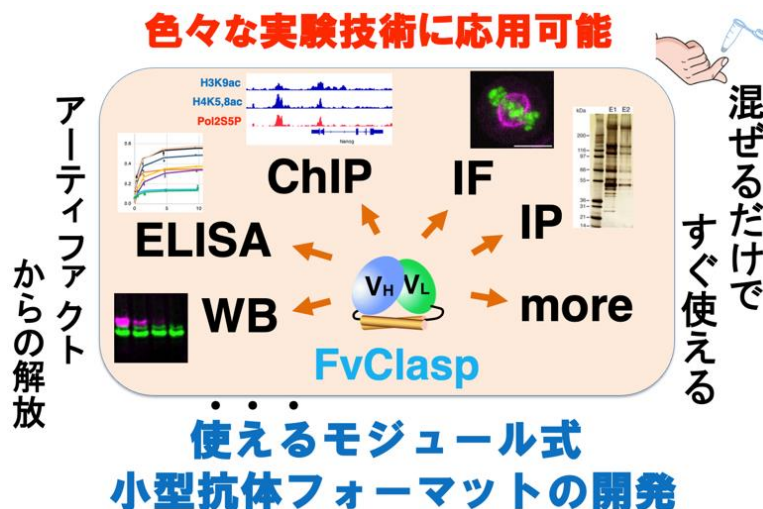
フォーマットを開発した。FvClasp とは H 鎖と L 鎖の抗原結合部位から構成される小型のリコンビナント抗体(30kDa)である (Arimori T, Structure, 2017, 上図)。scFv 等の従来型のリコンビナント抗体とは異なり、FvClasp は H/L 鎖が強固に連結されているため、抗原タンパク質への結合力は IgG 等の抗体と同等のレベルである。また FvClasp は、大腸菌を用いて簡単に調整することができる。更に我々は、タンパク質連結技術 SpyTag/SpyCatcher テクノロジーを利用して、Fv-Clasp を任意の機能分子で簡単に標識できるモジュール式小型抗体システムを構築した。目的の実験にあった標識 SpyCatcher と 30 秒間混ぜるだけで FvClasp を自在に標識することができるため、Western Blotting、免疫染色、ELISA, CUT&RUN などの様々な解析技術に使用することができる。

■モジュール式小型抗体フォーマットの利点

従来の IgG 抗体では、蛍光標識-抗 IgG 抗体などの二次抗体の使用が必須であった。今回開発したモジュール式小型抗体は、FvClasp を直接標識することができるため、以下の様なアドバンテージがある。

- 1) 実験に合わせて、瞬時に抗体へ機能付加できる。
- 2) 検出時の非特異的バックグラウンドの低減、ならびに検出感度の向上
- 3) プロトコルの短縮 (最短 10 分の抗体反応で標的を検出可能)

特にクロマチンプロファイリング解析において、様々な点でデータの質の向上が確認されることから、本モジュール式小型抗体はこれからの転写研究に革新をおこしうる基盤技術である。現在、細胞内における超分子複合体因子の同時検出に向けて、本抗体フォーマットを改良しているところである。



研究成果 3

Fuchigami T*, Nakayama T, **Miyanari Y**, et al. Peptide-based turn-on fluorescent probes for highly specific detection of survivin protein in the cancer cells. *Chemical & Biomedical Imaging*, 2024, in press.

Iori Nozaki, Natsumi Ishikawa, **Yusuke Miyanari**, et al, Borealin-Derived Peptides as Survivin-Targeting Cancer Imaging and Therapeutic Agents. *Bioconjug Chem.* 2022 Nov 16;33(11):2149-2160.

小型ペプチドを用いて膵臓がんマーカーである Survivin の生体イメージングに成功

膵臓がんの代表的なマーカー因子である Survivin に特異的に結合するペプチド断片および Nanobody を開発し、細胞内蛍光イメージング、並びに Survivin 機能阻害に成功した。また、本研究によって得られたペプチドおよび Nanobody を腫瘍マーカーの特異的プローブとして特許出願した。

4. 今後の展開

■ゲノムのポテンシャルを呼び覚ます。

ゲノム DNA には約 20000 個の遺伝子情報がコードされているが、そのうち限られた遺伝子セットのみ発現し、残りの遺伝子は不活性化状態にある。ヌクレオソームはゲノムが本来持つポテンシャルを抑え込む「バリアー」として機能する。今回、我々の研究では、ヌクレオソームの量を一過的に操作することによって、ゲノム DNA のバリアーを少しだけ緩め、ゲノム DNA のポテンシャルを可塑的な状態へとシフトさせることができるアプローチを世界で初めて提案した (Nature Genetics, 2024)。我々が試したゲノム編集や体細胞リプログラミング以外にも、アクセシビリティを操作することで、効率が改善される既存のバイオテクノロジーは他にも多くある。例えば、哺乳類の細胞を使って産生するワクチン開発、細胞の性質を人為的に操作する再生医療分野、がん等の疾患治療など幅広い研究分野に応用され活用されることが期待される。一方で、クロマチン構造を人為的に操作することは「意図せぬリスク」をはらんでいる。今後、更に検証を進めることで、クロマチン操作の可能性だけでなく、弱点も掘り下げる必要がある。

■モジュール式小型抗体が切り開く未来

今回開発したモジュール式小型抗体の利点は多く、抗体を使った幅広い研究分野および産業分野に応用展開することが可能である。一方で、小型リコンビナント抗体の弱点は、そのレパートリーの少なさである。現在も広く使われている IgG 抗体は、多くの市販商品が存在しており、その数は現在も増え続けている。小型抗体は FvClasp をベースに作り、その数は限られている。小型抗体の可能性をより発展させるためには、様々な標的因子を認識する FvClasp ライブラリーの構築が必要であろう。また、小型抗体を用いることは転写研究においては強烈な利点があり、これを基盤技術として転写制御機構の理解、さらにはそれを応用した細胞制御方法の開発などが期待される。

5. 発表実績

【論文】

1. Fuchigami T*, Nakayama T, Miyanari Y, et al. Peptide-based turn-on fluorescent probes for highly specific detection of survivin protein in the cancer cells. *Chemical & Biomedical Imaging*, **2024**, ID: im-2024-00017k.R2. **in press**
2. Ishii S, Kakizuka T, Park SJ, Tagawa A, Sanbo C, Tanabe H, Ohkawa Y, Nakanishi M, Nakai K, *Miyanari Y. Genome-wide ATAC-seq screening identifies modulators of global chromatin accessibility. *Nature Genetics*, **2024** Mar 56(3):473-482. *責任著者
3. Tareg Omer Mohammed, You-Rong Lin, Lucky Akter, Kai Weissenbruch, Kien Xuan Ngo, Yanjun Zhang, Noriyuki Kodera, Martin Bastmeyer, Miyanari Y, Azuma Taoka, Clemens M Franz, S100A11 promotes focal adhesion disassembly via myosin II-driven contractility and Piezo1-mediated Ca²⁺ entry. *J Cell Sci.* **2024** Jan 15;137(2):jcs261492.
4. Mizuki Sakamoto, Shusaku Abe, Yuka Miki, Miyanari Y, Hiroyuki Sasaki, Takashi Ishiuchi, Dynamic nucleosome remodeling mediated by YY1 underlies early mouse development. *Genes Development.* **2023** Jul 1;37(13-14):590-604.
5. *Miyanari Y, Imaging Chromatin Accessibility by Assay of Transposase-Accessible Chromatin with Visualization. *Methods Mol Biol.* **2023**; 2577:93-101. *責任著者, 筆頭著者
6. Iori Nozaki, Natsumi Ishikawa, Yusuke Miyanari, Kazuma Ogawa, Ayako Tagawa, Sakura Yoshida, Masayuki Munekane Kenji Mishihiro Akira Toriba, Morio Nakayama, Takeshi Fuchigami, Borealin-Derived Peptides as Survivin-Targeting Cancer Imaging and Therapeutic Agents. *Bioconjug Chem.* **2022** Nov 16;33(11):2149-2160.
7. Ancelin K, Miyanari Y, Leroy O, Torres-Padilla ME, Heard E. Mapping of Chromosome Territories by 3D Chromosome Painting During Early Mouse Development. *Methods Mol Biol.* **2021**; 2214:175-187.

【学会発表】

■ 国際会議での口頭発表 3件

1. Miyanari Y, The First International Symposium of Nano Life Science, Vietnam, 2023, **Keynote lecture**
2. Miyanari Y, The Reunion for chromatin, Munich, Germany, 2024, Jan, **Invited talk**
3. Miyanari Y, International Symposium on Tumor Biology, Kanazawa, Japan, 2021 Nov, **Invited talk**

■ 国内学会等での口頭発表 7件

【特許】

膵臓がん抗原に対するVHH抗体及び膵臓がん細胞検出方法, 特願 2023-032216, 2023

【その他】 特になし