

平成30年 5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04284

研究課題名(和文) ゲノム欠失の連続導入による遺伝子間ゲノム領域の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of intergenic regions by contiguous introduction of genomic deletion mutations

研究代表者

國府 力 (KOKUBU, CHIKARA)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70379238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、数百kb～数Mbのゲノム領域の機能解析を効率的に行う目的で、従来のゲノム工学とゲノム編集を組み合わせた新規技術の開発を試みた。マウスES細胞のゲノム上で、トランスポゾンを用いてloxP配列を転移させ、CreIによる部位特異的組換えを誘導すると同時に、CRISPR/Casを適切な部位に作用させ、長距離間の部位特異的組換え効率への影響を解析した。その結果、目的とするゲノム再構成変異の導入が可能であることが示されたが、有意な効率上昇が得られる条件を確立するには至っていない。今後、loxP部位とCRISPR標的の位置関係にさらに検討を加え、最適条件を見出す必要がある。

研究成果の概要(英文)：In order to enable effective functional analysis of genomic regions ranging from several hundred kilobases to several megabases, this study was focused on development of a new method by combining conventional genome engineering and editing technologies. LoxP elements were transposed in the mouse embryonic stem cell genome, followed by simultaneous induction of site-specific Cre-mediated recombination and CRISPR/Cas-mediated editing. This approach allowed introduction of the intended long-range rearrangements into the genome, but the introduction efficiency has not been significantly improved. The positional combinations of the LoxP sites and CRISPR targets remain to be further optimized.

研究分野：遺伝学

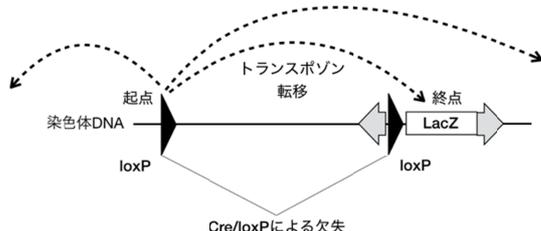
キーワード：ゲノム工学 疾患モデル

1. 研究開始当初の背景

2000年代以降、ゲノムワイド関連解析 (GWAS)をはじめとするゲノム解析技術の飛躍的な発展により、ヒトのさまざまな多因子性形質・疾患と関連する一塩基多型マーカー (SNP)の同定が進んでいる。ところが、SNPが同定されたとしても、それが該当する形質・疾患の病態解明にただちに結び付く例は当初の期待ほど多くはないという現状があった。その主たる理由として、SNPマーカーの多くが、いわゆる遺伝子本体ではなく、遺伝子間の長い非コード領域 (特に長いものを「遺伝子砂漠」と呼ぶ)の中に位置していることが指摘されている (Maurano et al, *Science* 2012)。

通常、さまざまな形質や疾患の原因と目される SNP が遺伝子配列の内部にある場合には、例えば、モデル動物であるマウスを用いて、該当する遺伝子を相同組換えやゲノム編集で破壊 (ノックアウト)することによって、そのメカニズムを実験的に検証するという方法が確立している。ところが、遺伝子間ゲノム領域に存在する遺伝子以外の機能エレメント (例えば、エンハンサーやサイレンサーなど)が対象となる場合には、それらを広大なゲノム領域の中に探し当て、実験的に改変するための効率的な方法が、各種ツールの豊富なマウスでさえ、まだ確立しているとは言えない。そして、このことが、GWAS 研究、ひいては多因子疾患の遺伝学の発展を阻む要因のひとつと考えられていた。

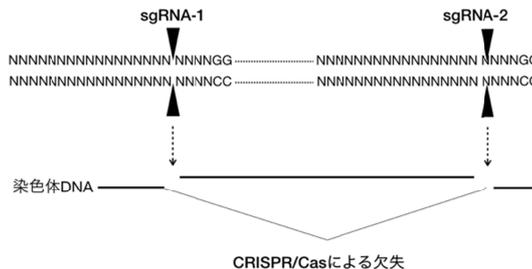
研究代表者らは、本研究の開始時点までに、マウスにおける遺伝子間ゲノム領域の機能解析ツールとして、トランスポゾンを利用した“ローカル・ホッピング”エンハンサー検出ベクター (LHED) の開発を行ってきた (Kokubu et al, *Nature Genetics* 2009) (図1)。LHED システムは、その後、エジンバラの Hill らによっても *Shh* 遺伝子ゲノム領域の解析に使用されるなどの成果を上げた (Anderson et al, *Development* 2014) が、比較的複雑なゲノム工学操作を要するため、作業効率や迅速性の面で改善の余地を残すものであった。



(図1) LHEDベクターシステム：トランスポゾンの起点と終点の間をCre/loxPによって欠失可能。LacZレポーターは汎用最小プロモーターと連結されており、ゲノム近傍のエンハンサー活性を検出して発現する。

このような状況のもとで、2013年初頭に登場した CRISPR/Cas システムが、ゲノム DNA への二重鎖切断 (DSB)の導入技術を大幅に簡略化したのは周知の通りである。くわ

えて、CRISPR/Cas を用いて同一染色体上の2箇所と同時に DSB を導入すると、中間のゲノム断片が抜け落ち、1kb~1Mb の欠失アレルを効率よく作製できるという報告もなされていた (Canver et al, *J Biol Chem* 2014)。(図2)



(図2) CRISPR/Casによるゲノム欠失導入：同一染色体上の2箇所の標的配列に対するsgRNAを、Cas9とともに同時導入すると、両切断点の間が欠失した細胞が得られる。その頻度は欠失のサイズと逆相関する。

さらに、本研究開始前の仕事として、研究代表者らは、培養マウス ES 細胞の系で、ゲノム安定化遺伝子 Bloom の抑制によりゲノムを不安定化したのち、人工的に DNA 二重鎖切断 (Double Strand Break, DSB) を導入する実験を行った。その結果、DSB の修復過程で数千ベースから数百キロベースの大欠失変異が生じる際に、両側断端の微小相同配列を介する再結合が優位であるという知見を得て報告していた (Yamanishi et al., *Genome Research* 2013)。このことは、大欠失をはじめとする大規模なゲノム再構成変異を人工的に制御された形で導入しようとする際には、途中の過程で一時的に出現すると考えられるゲノム断端の配列や構造を工夫することで、両断端の再結合効率を向上させ得る可能性があることを示唆していた。

2. 研究の目的

本研究は、これまで「ゲノム工学」や「ゲノム編集」と呼ばれてきたゲノム改変技術を独自の発想で組み合わせることにより、染色体ゲノムに様々な長さのゲノム欠失や複雑な構造の再構成変異を、良く制御された形で、かつ、効率的に導入する手法を確立し、対象となるゲノム領域に連続的に欠失等の構造変異を導入することにより、領域内の機能エレメント (エンハンサー、サイレンサー、インシュレーター等) を網羅的に探索する新たな実験系の開発を行うことを目的とする。

今回の実験対象とするゲノム領域としては、マウス 2 番染色体の *Pax1-Foxa2* 遺伝子座間に広がる約 670kb の「遺伝子砂漠」領域に標準を合わせる。このゲノム領域では、これまでに研究代表者らが LHED 法を用いて、*Pax1* 遺伝子の複数の新規エンハンサーを同定した実績があり、その過程で作製した様々な LacZ レポーター挿入アレルを研究資源として活用できるメリットがある。

ところで、この領域とオーソログなヒト

20 番染色体の *PAX1-FOXA2* ゲノム領域(約 860kb)の中には、GWAS 研究の成果として、男性型脱毛症(Androgenic alopecia: AGA)と強い相関を示す SNP マーカーが同定されている (Richards et al, *Nature Genetics* 2008; Li et al, *PLoS Genetics* 2012)。さらに、このゲノム領域の SNP は、思春期の女性に多いと言われる特発性側弯症と強く相関していることが報告された (Sharma et al., *Nature Communications* 2015)。以上のことから、本ゲノム領域の重要性は明白であるが、なぜ男性に多い脱毛症や、逆に女性に多い側弯症が、この領域のゲノム多型によってもたらされるのか。その分子メカニズムについては、まだほとんど分かっていないというのが実情である。そこで、本研究では、このゲノム領域の機能について、さらに知見を積み重ねることも研究の目的のひとつとなる。

3. 研究の方法

染色体ゲノム上に数メガベース~数十メガベースに及ぶような大欠失変異を導入しようとする際には、ゲノム改変部位の相の一致、すなわち、常染色体の場合、核内にそれぞれ 2 本ずつ存在する相同染色体のうち、どちらか一方の染色体に集中して改変操作を施すことが必要になる。この点で、研究代表者らが開発したトランスポゾンに基づく LHED 法にはアドバンテージがあると考えられた。すなわち、対象となるゲノム領域にトランスポゾンベクターをあらかじめ挿入しておき、そこへ転移酵素(トランスポゼース)を作用させると、高い確率で同一の染色体上の近傍に移動させることができる。トランスポゾンベクターは宿主ゲノムには存在しない人工配列を含むので、トランスポゾンの起点および終点は、ともに同一染色体上の離れた位置に挿入されたヘミ接合体挿入変異となる。

我々は、トランスポゾン内部の人工配列の中に、まず部位特異的組換えシステムの標的配列である loxP 配列を組み込んだ。このとき同時に、トランスポゾンの起点となる最初のベクター挿入部位にも loxP 配列を組み込んでおくと、Cre 蛋白の発現誘導により、同一染色体上に存在するトランスポゾンの起点と終点の間で Cre/loxP 組換えが成立し、loxP 間の欠失変異を導入することができる。

ところが、Cre/loxP 部位特異的組換えは、一般に、染色体ゲノム上の loxP 配列間の距離が増大するにつれて組換え効率が減少する。このことは、Cre/loxP 部位特異的組換えの効率が、細胞核内における複数の loxP 部位の空間的な位置関係や、loxP 間をつなぐ染色体ゲノムの力学的構造等に依存することを示唆していると考えられる。

そこで、我々は、長距離ゲノム部位間の Cre/loxP 組換えを促進する効果を期待して、Cre/loxP システムと CRISPR/Cas システムの同時併用を着想した。すなわち、Cre を作用

させると同時に、loxP 挿入部位周辺や loxP 間の任意のゲノム領域に対して、CRISPR/Cas による標的特異的 DSB を導入する等の変化を付加することにより、両 loxP 間の構造的な拘束を緩和し、組換え効率を向上させることが可能であるかどうかを検討した。

ここで、CRISPR/Cas システムを同時併用する場合、標的部位の相の不一致の問題は、上に述べた理由により、トランスポゾン挿入部位のヘミ接合変異を標的とする場合には容易に回避される。しかしながら、loxP 部位間のゲノム領域の一部を CRISPR 標的とする場合には、変異修復および組換えの過程で、もう一方の相同染色体がポジティブもしくはネガティブに干渉する可能性を排除できない。そこで、我々は、このような相同染色体の干渉可能性を排除し、可能な限りシンプルな実験系での条件検討を行う目的で、半数体マウス ES 細胞の利用も併せて検討した。

4. 研究成果

実験材料として、まず、先行する研究課題で研究代表者らが作製した LHED トランスポゾン挿入培養マウス ES 細胞に対し、あらかじめ特定の遺伝子座 (*Pax1*, *Nanog* など) にノックインされた LHED トランスポゾンベクターを同一染色体上の近傍に転移させた後の再挿入部位を Linker Ligation-mediated PCR 法によって多数同定し、トランスポゾンのヘミ接合挿入変異を有するマウス ES 細胞クローンのライブラリー整備を行った。

次に、これらのライブラリーに属する ES 細胞クローンの中から、ベクター挿入部位間の距離や方向がさまざまな組み合わせになるようにクローンを選択し、トランスポゾンの始点および終点のベクター配列を標的とする CRISPR 用 sgRNA の設計を行った。このとき、各ベクターの内部においても、sgRNA 標的配列と loxP 配列との距離や位置関係をさまざまに変化させる組み合わせを用意した。

ゲノム再構成変異導入実験では、対数増殖期にある個々のマウス ES 細胞クローンに対して、エレクトロポレーション法により、(1)Cre 発現プラスミド、(2)ゲノム上の 2 ヶ所の標的に対する sgRNA/Cas9 発現プラスミド、(3) Cre 発現プラスミドと上記 sgRNA/Cas9 発現プラスミドの混合物、以上 3 通りのトランスフェクションを行った。トランスフェクション後の ES 細胞は培養プレート上に希釈・播種を行い、発現プラスミドの組み合わせ毎に、シングルセル由来のコロニーを 100 クローン程度単離して、Competitive PCR および Sanger シークエンス等によるゲノム再構成変異の解析を行った。

実験の結果、数百 kb から数 Mb の範囲で、欠失変異の新規導入が検出されるクローンが得られた。Cre/loxP 部位特異的組換え単独と CRISPR/Cas 標的特異的切断単独を比較した場合、欠失距離が増大するにつれて、

CRISPR/Cas の方が高い導入効率を得られた。また、ヘミ接合部位を標的とする場合は、相同配列領域を標的とする場合よりも、目的とするゲノム欠失変異の獲得率が高いという結果が得られた。一方、設計通りのゲノム欠失変異を得るための controllability (可制御性) に関しては、予想通り、Cre/loxP 組換えの方が優れていた。次に、Cre/loxP と CRISPR/Cas を同時適用した場合、loxP 配列及び sgRNA 標的配列の位置によっては、従来よりも高い効率(70-89%)で可制御性の高いゲノム欠失変異の導入が得られた。しかしながら、その変異導入効率にもたらす効果を各々の単独使用群と比較したところ、今回の標的配列組み合わせの範囲内では、統計学的に有意な効率上昇は得られなかった。

続いて、上記実験と同様の方法により、同一染色体上の遠隔部位間(100MB 以上)の長距離逆位変異の導入を試みた。その結果、(1)Cre/loxP 単独、(2)CRISPR/Cas 単独、および(3)Cre/loxP と CRISPR/Cas 併用のいずれの場合においても、低頻度(1%以下)での逆位変異の成立が確認された。しかしながら、この長距離逆位変異は導入成立の頻度が低いため、(1)~(3)の方法間で導入効率の有意差を検出するには至らなかった。

なお、LHED トランスポソンのローカルホッピング特性に関しては、当初、上に述べたように、同一染色体上に転移する場合は殆どであると考えられていた。ところで、半数体マウス ES 細胞は、細胞培養の継続中に auto-diploidization (自発的 2 倍体化) を起こす。そこで、この系を用いて半数体 ES 細胞ゲノムにトランスポゾンベクターを挿入させた後、転移酵素の作用を遷延させると、結果的にトランスポゾンが相同染色体のもう一方のゲノム部位に転移する例が検出された (Yamanishi A. et al. Nucleic Acids Research 2018)。

以上の結果は、本研究のようにトランスポゾン、Cre/loxP、CRISPR/Cas の 3 種類のゲノム改変技術を組み合わせたゲノム再構成変異導入を行う場合、起こり得る結果の複雑性に注意を要することを示唆するものであった。今後の課題として、本研究が目的とする大規模かつ可制御性のあるゲノム再構成変異を得るためには、トランスポゾンによる loxP 配列の挿入部位と CRISPR/Cas 標的部位の位置関係と方向性の組み合わせをさらに変化させることにより、導入条件の最適化を進めることが必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Yamanishi A., Matsuba A., Kondo R., Akamatsu R., Tanaka S., Tokunaga M., Horie K., Kokubu C., Ishida Y. and

Takeda J. Collection of homozygous mutant mouse embryonic stem cells arising from autodiploidization during haploid gene trap mutagenesis. Nucleic Acids Research. 査読有. gky183、15 March 2018. DOI: 10.1093/nar/gky183.

Woltjen K., Yamamoto T., Kokubu C. and Takeda J. Report on the Conference on Transposition and Genome Engineering 2015 (TGE2015): advancing cutting-edge genomics technology in the ancient city of Nara. Gene to Cells. 査読無、21 巻、2016、392-395、DOI: 10.1111/gtc.12367.

[学会発表](計 2 件)

Kamitani T., Yamanishi A., Yoshimura Y., Kokubu C. and Takeda J. A combination and CRISPR/Cas9-mediated DNA cleavage may facilitate construction of a loss-of-heterozygosity library of the mouse genome. Conference on Transposition and Genome Engineering 2015、2015、奈良春日野国際フォーラム 薨。

Yamanishi A., Kondo R., Matsuba A., Tokunaga M., Kokubu C., Ishida Y. and Takeda J. Homozygous mutant mouse embryonic stem cell bank arising from autodiploidization during haploid gene-trap mutagenesis. Conference on Transposition and Genome Engineering 2015、2015、奈良春日野国際フォーラム 薨。

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國府 力 (KOKUBU Chikara)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：70379238

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

田中 幸代 (TANAKA Sachiyo)
大阪大学・医学系研究科・特任研究員