

令和 元年 5月 31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04408

研究課題名(和文) ゲノム編集技術応用によるシス制御因子駆動型進化メカニズムの実験検証

研究課題名(英文) Experimental approaches testing cis-regulatory element driven evolutionary mechanisms by genome editing tools.

研究代表者

隅山 健太 (Sumiyama, Kenta)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：00370114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム内在性のtoolkit遺伝子の周辺領域にシス因子を人為的に獲得させ遺伝子の発現進化を引き起こすことが可能かどうかを実験的に検証した。Dlx3/4遺伝子クラスターをモデル系とし、異所性エンハンサーノックインマウスを作製したところ、Dlx3/4遺伝子発現が増加している事を示す結果が得られた。異所性エンハンサーの適切な位置へのノックインによりターゲット遺伝子発現変更が実現できたと考えられた。また、ノックインのための効率の良いゲノム編集プロトコルが確立できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで有力な仮説とされてきたシス因子の新規獲得による遺伝子発現量変化の進化が実際に容易に可能であることを、適切な位置でのエンハンサーノックイン実験を行うことで示すことができた。制御配列により進化が駆動しうる事が示されたことで、進化メカニズムの理解が進む事が期待できる。また進化の理解だけでなく、その原理を応用することで新しい有用生物作製の方法論へ発展することも期待され、新規技術開発のシードとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We experimentally verified whether it is possible to artificially acquire cis-elements in the distal region of the genomic endogenous toolkit gene and cause gene expression evolution. When ectopic enhancer knock-in mice were generated using the Dlx3/4 gene cluster as a model system, Dlx3/4 gene expression was upregulated by the inserted enhancer. This result indicated that target gene expression change could be realized by knocking in the ectopic enhancer at appropriate genomic position. In addition, we have established an efficient genome editing protocol for knock-in.

研究分野：発生進化遺伝学

キーワード：シス因子 進化 ゲノム編集 Dlx遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 表現型進化のメカニズムとして toolkit 遺伝子の co-option 進化の重要性が指摘されている。toolkit 遺伝子はボディプランを決定する発生調節遺伝子であるが、これが新規のシス因子を獲得することにより新しい組織での遺伝子発現が生じ、新しい器官の進化が起きるといふ仮説である。toolkit 遺伝子の周辺には数百 kb にも渡って様々な組織空間的特異性をもつシス因子が多数存在することがわかってきており、私たちも新奇器官の進化と同時に獲得された組織特異的シス因子を次々と発見してきた。しかしながら、これまでの研究では、ゲノムのどの部分にどのようなメカニズムで新しい発現を生み出すシス因子が組み込まれるのかが明らかになっていない。

(2) TALEN、CRISPR といったゲノム編集技術を用いることでゲノムの任意の場所に欠失挿入変異を生み出すことができ、toolkit 遺伝子の周辺任意の場所に機能既知のエンハンサー配列を組み込んで新しい機能を付加することが可能なかどうかを実験で確かめることができるようになった。そこで本研究ではゲノム編集技術(CRISPR/Cas9)を用いることで、既知のシス因子を toolkit 遺伝子周辺に組み込み、組織特異的発現を変更することができるかどうかを実験で検証することを計画した。

### 2. 研究の目的

(1) 形態進化を引き起こす機構に toolkit 遺伝子のシス因子獲得による co-option があるとする仮説には未だその証拠が少ない。近年このようなシス因子獲得進化を模倣したゲノム変異を簡単に導入することがゲノム編集技術により可能になってきている。本研究課題では、ゲノム内在性の toolkit 遺伝子の周辺領域にゲノム編集技術によりシス因子を人為的に獲得させることで、遺伝子の発現進化を引き起こすことが可能かどうかを実験的に検証し、シス因子駆動型進化の条件と意義を再考する。そのために、モデル系となる toolkit 遺伝子を制御するさまざまなシス因子を同定、機能解析し、さらにゲノムのどの場所にどのようなシス因子が組み込まれれば発生調節遺伝子の発現変化を引き起こすことができるのかを明らかにする。このことにより実験室で進化可能性(evolvability)の原理を発見し検証することを究極の目標とする。

(2) シス因子獲得進化を模倣したゲノム変異導入に必要とされるゲノム編集技術の改良・新規の手法開発を並行して進める。エンハンサー機能解析のための Tol2 トランスジェネシス技術の改良や、ゲノム編集の効率を端的に表す完全両アリル遺伝子ノックアウト効率をさらに高めると共に、研究計画の基盤技術となる CRISPR/Cas9 応用による高効率ノックイン技術の開発、具体的には CRISPR/Cas9 と guideRNA および修復用テンプレート DNA をマウス受精卵に直接インジェクションすることにより高効率にノックインマウスを作製するプロトコルを確立する。

### 3. 研究の方法

(1) マウス内在性 toolkit 遺伝子を制御できると考えられる様々な領域(数 kb~数百 kb 離れた範囲)に、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて多様な機能既知のエンハンサーエレメントを打ち込み、toolkit 遺伝子の発現変化を引き起こせるかどうかを検証する。このためには TAD 範囲内でゲノム各領域がどのような性質を持つかを種々のゲノム情報から解析することがまず必要である。DNaseI Hypersensitive sites, ATAC-seq, CTCF ChIP-seq, CTCF/cohesin ChIA-PET, H3K27Ac, H3K4Me1, ncRNA などの各種データを収集、解析し、エンハンサー配列候補配列をトランスジェニックマウス作製により機能解析し、組織特異的機能配列がどこにどのように存在するかを確定し、エンハンサーが働く条件を備えた場所を異所性エンハンサー配列ノックインの候補とする。これにより in vivo でどのような条件が整えば toolkit 遺伝子が新しい発現部位を獲得できるようになるのかを調べる。具体的ターゲット遺伝子としては、これまでの研究データが比較的多い Dlx3/4, Dlx5/6 遺伝子クラスターを中心に解析する。

(2) ノックインにふさわしいターゲット領域を確定した後に、ゲノム編集技術を用いてノックインを行う。CRISPR/Cas9 を用いるゲノム編集技術による数百ベース以上のノックインは効率が低いことが知られているが、技術的な改良を行うことでノックイン効率を高め、目的のノックインマウスを確実に作製する。初代マウスでノックインが確認されたら系統化を行い、ホモ接合マウスを得てターゲット遺伝子の定量 PCR 発現解析および RNA-seq による全ゲノム RNA 発現解析を行い、挿入エンハンサー配列による発現変化への影響を調べる。

(3) 異所性エンハンサーノックインマウスとの比較解析のため、ノックイン候補領域周辺を欠失させたノックアウトマウスを作製し同様に遺伝子発現解析を行う。また、Dlx4, Dlx3 各遺伝子ノックアウトマウスをゲノム編集で作製し遺伝子発現解析を行う。また 3 次元ゲノム構造を決定するのに重要と考えられる CTCF 結合サイトのノックアウトマウスを作製し、その影響を評価する。これらのデータ比較統合から、ゲノムのどの場所にどのようなシス因子が組み込まれれば発生調節遺伝子の発現変化を引き起こすことができるのか、またその背景となる機構を調べ進化に与える影響を考察する。

#### 4. 研究成果

(1) 比較検討のため、各種遺伝子改変マウスを作製した。まずゲノム編集技術により、Dlx3 遺伝子および Dlx4 遺伝子のノックアウトマウス作製に成功した。Dlx3 遺伝子 KO ヘテロ接合マウスは発生に大きな影響を及ぼさず正常な発生を示したが、ホモ接合としたマウスでは胎盤形成不全により E9.5 で致死となることが確認できた。また、わずかに産まれてきた初代のモザイクマウスでは体毛の異常が確認された。これら表現型は以前報告されている Dlx3KO 表現型と一致しゲノム編集による KO と系統樹立に成功したことが確認された。Dlx4KO はヘテロ・ホモ接合ともほぼ正常な発生を示し、特段の表現型は観察されなかった。いずれも遺伝子発現の確認で遺伝子 KO を確認できた。さらに、Dlx3/4 領域の既知エンハンサー（四肢/毛根エンハンサーおよび胎盤エンハンサー）を欠失したノックアウトマウスをゲノム編集で作製し系統化に成功した。意外なことに致死の原因である胎盤での発現を制御するエンハンサー-KO マウスは、ホモ接合でも明らかな異常は示さなかった。これはまだこのエンハンサーの他に胎盤発現を制御する機構が存在することを示唆した。

(2) Cas9 タンパク質、crRNA+tracrRNA, DNA プラスミド修復テンプレートのマウス受精卵前核へのインジェクションによる lacZ レポーター遺伝子の Dlx3 遺伝子への挿入実験を行った。DNA プラスミド修復テンプレートにはインサート両端部に Cas9 による切断部位を組み込み、NHEJ でのゲノム組み込み後再度 Cas9 切断ターゲットとなるようにデザインされ、最終的に MMEJ により正確な配列を再現するようにした。この結果、33 匹中 1 匹に約 4kb の全長が相同組換えにより正確に挿入されている事を確認した。この結果は比較的長いインサートの KI 個体作製としてはかなり良い効率であった。残念ながらこの初代雌マウス個体から作製した 3 個体の F1 マウスはいずれも離乳後すぐに死亡し系統化は実現できなかったが、高効率の KI プロトコルを確立することができた。

(3) ChIA-PET 解析データから明らかになった複数の CTCF-cohesin 結合領域 (TAD2, TAD3, TAD4, TAD5) について、その周辺配列を含めエンハンサー活性があるかを、トランスジェニックマウス解析を詳細に行って発現のステージや発現領域の解析を行い確認した。その結果 TAD3 領域が E10.5 前後に特異的な鰓弓エンハンサー関連領域であることを発見した。TAD3 領域には保存配列が存在し、エンハンサーの存在を示唆するヒストン修飾なども見られた。ChIA-PET 解析データから、この TAD3 領域は CTCF を介して Dlx3, Dlx4 遺伝子プロモーターと相互作用があると考えられたことから、異所性のエンハンサー挿入候補領域として決定した。

(4) パラログである Dlx5/6 領域にも CTCF ループで繋がっている 500kb プロモーターから離れた鰓弓エンハンサーが同定されている。この Dlx5/6 鰓弓エンハンサーを (3) で同定した Dlx3-4 クラスターの TAD3 CTCF 結合領域周辺へゲノム編集技術による相同組換えでノックインした。(2) と同様の方法により KI 作製実験を行ったところ、11 個体中 2 個体で KI 個体が得られ、その系統化、ホモ接合 KI マウス作製に成功した。この異所性エンハンサー挿入ヘテロ、ホモマウスについて、Dlx3/4 遺伝子の定量 RT-PCR 発現解析を行ったところ、Dlx3/4 遺伝子の発現が増加している事を示す結果が得られた。この結果から当初の目的であった、外部エンハンサーのノックインによるターゲット遺伝子発現変更を実現できたと考えている。このエンハンサーノックインした位置にはもともとの機能配列等が存在しない無きことを確認するため、挿入位置にデリションを起こした個体を作製し系統化して発現解析したところ、ターゲット遺伝子の発現量には野生型と比較して変化が見られず、この結果ノックイン個体の発現上昇はノックインしたエンハンサー配列により引き起こされたことが明らかになった。これらの結果をさらに確認するため RNA-seq 解析を現在引き続き行っており、さらにノックインマウスの形態学的解析も進めている。これらの結果は近日中に論文としてまとめ投稿する予定である。

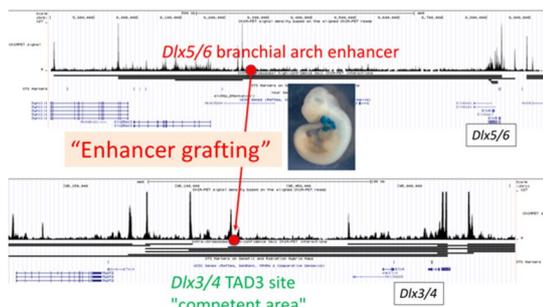


図 2 Dlx5/6 鰓弓エンハンサーの Dlx3/4-TAD3 へのノックイン

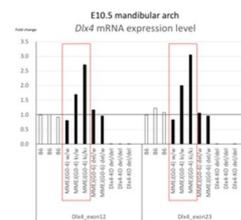


図 1 KI による発現上昇制御

(5) この他関連する研究として、ゲノム編集技術の洗練化を進めノックイン、ノックアウト、トランスジェネシスの効率化プロトコルを確立し応用した研究として 4 報の論文 (Ono et al 2019, Niwa et al 2018, Kamioka et al 2017, Fumoto et al. 2017) を発表した。また、胚操作法の改良を進めた結果、ES 細胞を用いるノックインマウス作製効率化技術確立を発表した (Sumiyama et al. 2018)。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Yoshiyasu Ono, Yasunori Mori, Yoshihiro Egashira, Kenta Sumiyama, Shigeo Takamori. "Expression of plasma membrane calcium ATPases confers Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in rodent synaptic vesicles" *Scientific Reports* (2019) volume 9, Article number: 4289 (2019) 査読有り

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-40557-y>

Kenta Sumiyama\*, Naomi Matsumoto, Junko Garçon-Yoshida, Hideki Ukai, Hiroki R. Ueda, Yo Tanaka\*. "Easy and efficient production of completely embryonic-stem-cell-derived mice using a micro-aggregation device." *PLOS ONE* (2018) 13(9): e0203056. \*Corresponding authors 査読有り

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203056>

Yasutaka Niwa, Genki N. Kanda, Rikuhiko G. Yamada, Shoi Shi, Genshiro A. Sunagawa, Maki Ukai-Tadenuma, Hiroshi Fujishima, Naomi Matsumoto, Koh-hei Masumoto, Mamoru Nagano, Takeya Kasukawa, James Galloway, Dimitri Perrin, Yasufumi Shigeyoshi, Hideki Ukai, Hiroshi Kiyonari, Kenta Sumiyama, Hiroki R. Ueda. "Muscarinic Acetylcholine Receptors Chrm1 and Chrm3 Are Essential for REM Sleep" *Cell Reports* (2018) Volume 24, Issue 9, p2231-2247. 査読有り

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.082>

Yuji Kamioka, Kanako Takakura, Kenta Sumiyama, Michiyuki Matsuda. "Intravital Förster resonance energy transfer imaging reveals osteopontin mediated polymorphonuclear leukocyte activation by tumor cell emboli" *Cancer Science* (2017) 108: 226-235. 査読有り

DOI: 10.1111/cas.13132

Katsumi Fumoto, Hisako Takigawa-Imamura, Kenta Sumiyama, Tomoyuki Kaneiwa, Akira Kikuch. "Modulation of apical constriction by Wnt signaling is required for lung epithelial shape transition." *Development* (2017) 144: 151-162. 査読有り

DOI: 10.1242/dev.141325

#### [学会発表](計 21 件)

隅山 健太 「ゲノム重複前の脊椎動物表現型を推定する新しい試み」シンポジウム S5: Basal lineage は「原始的」か? ~生物界と分野を超えて 日本進化学会第 20 回大会 2018 年

Kenta Sumiyama " Inferring ancestral state before WGD from enhancers and CTCF/cohesin loops in developmental genes." SMBE 2018 at Yokohama 2018 年

隅山 健太 「遺伝子改変マウスを用いた非コード領域の進化的研究」WS6-3

日本遺伝学会第 89 回大会 (招待講演) 2017 年

隅山 健太 「Dlx4 遺伝子の進化的解析とゲノム編集による実験検証」

日本進化学会第 19 回大会 2017 年

隅山 健太 「哺乳類 Dlx 遺伝子クラスターにおけるシス制御因子の機能解析と進化」

第 39 回日本分子生物学会年会 (招待講演) 2016 年

#### 6 . 研究組織

分担者の該当無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。