

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06896

研究課題名(和文) ゲノム編集を利用したヒト染色体脆弱部位のクロマチン動態の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Deciphering molecular chromatin dynamics at the chromosomal fragile site via genome editing

研究代表者

中山 祐二 (Nakayama, Yuji)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・助教

研究者番号：40432603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：家族性の知的障害である脆弱X症候群の根本的病因は、責任遺伝子FMR1内に存在するCGGリピートの母性伝播時の伸長(不安定化)とそれに伴う遺伝子不活性化である。本研究ではその一連の分子病的な病態メカニズムを解明するために、染色体工学技術とゲノム編集を用いてリピートの不安定化を蛍光でモニターできる系を構築し、そこに関わる因子の同定を試みたが、ゲノム編集を用いた蛍光モニター系は本来ヒトで認められているFMR1の発現パターンを反映する結果を得られなかった。しかし、CGG リピートなどを主体とする染色体脆弱部位を安定に取り扱うことに関して、染色体工学操作が極めて有用な方法論であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Fragile X syndrome is the most common form of familial intellectual disability, and is caused via expansion (destabilization) of CGG repeat present within the responsible gene FMR1 and gene inactivation accompanying it at the maternal propagation. In the present study, in order to elucidate a series of molecular pathological mechanisms, we tried to establish a system that can monitor the instability of repeat with fluorescence using chromosome engineering technology and genome editing and to identify factors related to it. Fluorescence monitoring system using genome editing failed to obtain the result reflecting the expression pattern of FMR1 originally recognized in humans. However, it was shown that chromosomal engineering operation is a very useful methodology for stable handling of chromosome fragile sites mainly composed of CGG repeats and the like.

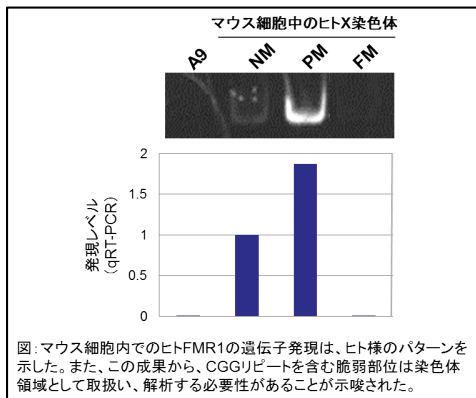
研究分野：染色体工学

キーワード：脆弱X症候群 染色体工学

1. 研究開始当初の背景

家族性の知的障害である脆弱 X 症候群 (FXS: Fragile X Syndrome) は、トリプレットリピート病と呼ばれる神経変性疾患のグループに属する難病である。責任遺伝子 FMR1 遺伝子の 5' 非翻訳領域に存在する CGG リピートは、正常では 40 以下の多型として存在する。しかし、リピートは世代を経るごとに徐々に長くなり、保因者とされる 50 以上 ~ 200 未満の長さの CGG リピート (PM: Pre-mutation) が、母性伝播する際に不安定化し、200 リピート以上 (FM: Full-mutation) へと一気に伸長 (ジャンプとも呼ばれる) する。さらに、その伸長によって FMR1 プロモーターと CGG リピート領域の高度メチル化が起き、FMR1 が発現抑制されるという一連の反応を通して発症する。

この一連のクロマチン動態変化はマウスモデルでも再現されておらず、FXS の根本的病因であるにもかかわらず不明な点が多い。この現象を再現し、分子基盤を明らかにすることで新しい FXS の治療戦略が開拓されることが期待される。本研究に先立ち、申請者は、細胞工学・染色体工学的技術により、保因者ならびに患者由来の完全長 X 染色体をマウス細胞に個別にクローニングすることに成功した。また、これらのマウス細胞内では CGG リピートの長さおよびメチル化が維持され、FMR1 遺伝子の発現様式もそれに相応じたパターンが認められた (下図、論文準備中)。



2. 研究の目的

FXS の根本的な病因である CGG リピートの伸長、メチル化、そして FMR1 遺伝子の不活性化という 3 つの連続したクロマチン動態変化を解析するためには、その動態をできるだけ正確に再現できる系を作り、そこに関わる因子を同定することが重要である。CGG リピート不安定化は垂直伝播の際に起こることなので、理想的にはモデル動物を利用した CGG リピート不安定化の再現系が必要であるが、本研究では細胞系での構築を目指した。その出発資材として上図のマウス細胞システムを用い、本研究ではゲノム編集技術を用いて蛍光レポーター遺伝子を FMR1 遺伝子にノックインし、これらのマウス細胞内で FMR1 遺伝子の発現と、それに相関する CGG リピ-

ト動態を蛍光で評価できる解析系を確立することを目的とした。さらに、FMR1 遺伝子座のレポーターの発現の高低を指標に、CGG リピートの動態を担う因子を同定するために、申請者が現在までに開発してきた、特定の染色体領域へ集積する因子を質量分析によって同定する定性解析技術である ChIP 法 (Chromatin- Immunoprecipitation 染色体免疫沈降法; H22-23 新学術領域研究) を適用する。FXS 発症の分子基盤解明に向けて、その初動である CGG リピート不安定化に関わる因子を同定し、新しい治療戦略の開拓に寄与しうる情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) ヒト正常および保因者由来の完全長ヒト X 染色体を保持するマウス A9 細胞内で、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 系を用いて、ヒト X 染色体上の FMR1 遺伝子にレポーター遺伝子をノックインし、CGG リピート動態をレポーターの発現で評価できる系を樹立する。
- (2) 作製した細胞を用いて、ヒト X 染色体を ChIP 法により回収し、FXS 脆弱部位の CGG リピートに集積し、CGG リピートの制御に関係のある因子を質量分析により同定する。ChIP 法は本来、人工染色体ベクターと組み合わせることを想定しているが、本研究ではヌクレアーゼ活性欠損型の Cas9 を CGG リピートあるいはその周辺領域に集積させて免疫沈降のタグとし、免疫沈降することを目指した。
- (3) (2) のために、CGG リピートに対する様々な gRNA を構築し、マウス細胞の中で、ヒト X 染色体上に dCas9 タンパク質のシグナル (実際には融合蛍光タンパク質のシグナル) が集積するかどうかを検証した。

4. 研究成果

※研究成果 (1) ~ (3) は方法の (1) ~ (3) に概ね対応するものとする。

(1) FMR1 遺伝子座への蛍光レポーター遺伝子のノックイン

ゲノム編集を用いて、FMR1 遺伝子の発現を蛍光レポーターの発現強度によって評価できる系の構築を試みた。FMR1 遺伝子の発現は、前出の図で示したように、CGG リピート長と逆相関する形で、正常に比べて CGG リピートの長い保因者 (不安定化の前段階) で高くなることが知られており、FXS 患者では抑制される。今回作製を試みたノックイン株は同様の発現強度パターンを示すかどうかを持って評価した。ヒト正常、保因者、並びに患者由来の完全長ヒト X 染色体を保持するマウス A9 細胞内で、ヒト X 染色体上の FMR1 遺伝子蛍光レポーター遺伝子のノックインを試みた。プロモーター直下へのノックインは CGG

リピート直下への挿入ということになり、ターゲットングベクター構築が難しいことから、エクソン2内へのノックインとした。まず正常アレル保持 A9 細胞においては、ノックイン後の蛍光の発現が非常に弱く、FMR1 プロモーター発現の評価が難しいクローンが多く得られた。さらに、患者アレルへのノックインでは、そもそも抑制されているはずの FMR1 プロモーターが発現している結果となった。本研究では CGG リピート不安定化の初動を検出できる系が理想であり、保因者由来アレルに対してのノックインは重要であったが、保因者アレルに関してはノックイン後の薬剤耐性クローンですら取得することができなかつた。以上のことから、方法(1)はいったん中止とした。原因としてはマウス A9 細胞のトランスフェクション効率の低さとエクソン2へのターゲットングだったことも考えられた。

(2) CGG リピート領域に対する ChrIP 法の dCas9 タグの検討

ChrIP 法では、ある特定の人工配列に結合するタンパク質に FLAG 等のタグや蛍光タンパク質を融合したものをバイトとして免疫沈降する。しかし本研究推進の段階で、テロメアやセントロメア、さらには CGG リピートなどの反復配列にも CRISPR システムの Cas9 タンパク質をターゲットできるという報告がなされ、本研究ではタグタンパク質に FLAG エピトープ及び蛍光タンパク質を融合した Cas9 (D10A nickase または dCas9) タンパク質を免疫沈降のタグとして利用するための条件検討を行った。具体的に集積(ターゲット)させる領域として、FMR1 遺伝子の CGG リピートまたはその周辺配列を選定した。これらの配列に対する gRNA は Cas9 (D10A) 発現ユニットを併せ持つ A10 (オールインワン) ベクターに組み込み、一過性に発現させ、Cas9(D10A) タンパク質の集積の程度を蛍光タンパク質の核内でのスポット様の観察を持って評価した。しかし、蛍光顕微鏡下で判断できるほど顕著な集積は認められなかつた。本研究では、タグのシグナルが一箇所、すなわちヒト染色体はマウス A9 細胞内に単一の染色体として存在するので、一つのスポットとして検出されなければ ChrIP 法のタグとして使用するには難しいと考え、CGG リピート領域に関しては8個の gRNA を単独、あるいは様々な混合で使用したが結果は改善されなかつた。

(3) 人工染色体セントロメアに対する ChrIP 法の dCas9 タグの検討

開始当初の計画としては、ChrIP 法によって得られた候補因子について、申請者が別途保有する、アメリカのセルバンク (Coriell Cell Repository) から購入している FXS 関連の保因者・患者由来のヒト細胞株における発現、エピジェネティクス、ならびに遺伝子

解析(変異を含む)解析を行い、病態解明と病態克服(治療)に向けたシーズを絞っていく予定であったが、本研究は(2)の試行の後、ChrIP に進むための結果を得ることができず、免疫沈降は実施しなかつた。CGG リピートの結果を受けて、我々は以前に作製した、ヒト人工染色体に保因者由来の約100-CGG リピートを人工的に複数個挿入した人工染色体を保持する細胞で ChrIP 法を実施することで、保因者の CGG リピートに普遍的に結合しうる因子が同定されるのではないかと考え、ヒト人工染色体を免疫沈降するためのタグについても検討を行った。ヒト人工染色体のセントロメアはヒト21番アルフォイド配列であり、それに対する gRNA を約20個作製した。CGG の時と異なり、アルフォイドに関する gRNA は、そのターゲット配列を予測ソフトウェア(web上のソフト)を用いて使用し、提示されたランクに従って、タンデムにベクターに挿入する方法や、組み合わせを変えるなどし、CGG リピートに対する gRNA/Cas9 と同様の評価法を持ってスクリーニングしたが、単一スポットを得ることができなかつた。

(4) 今後の展望

本研究では、ゲノム編集を想定通り機能させることができず、FMR1 発現のレポーター細胞の樹立および ChrIP 法のタグシステムとしての CRISPR/dCas9 系について有望な結果を得ることができなかつた。今後はタグシステムそのものの見直しも検討しながら、最適な ChrIP 条件を探る必要がある。目的のところで示したように、脆弱部位のダイナミクスは本来、動物モデルの作製が理想的である。現存する CGG リピート動態に着目した FXS 関連のモデルマウスは前変異(100)CGG リピートのノックインマウスであり2系統作製されているが、どちらのマウスでも子孫伝播によってヒトで見られるようなリピート伸長および高度メチル化が再現できていない。これらの CGG リピート動態モデルマウスの結果は、CGG リピートの不安定化にはリピートだけでなくその前後の cis エlement が重要であることを強く示唆している。よって、本研究を踏まえ、かつ、我々のグループの持つ、人工染色体導入動物 (Transchromosomal animal) の系を鑑みると、脆弱部位そのものを動物に導入して、CGG リピート不安定化の in vivo モデルを構築することも重要ではないかと考えられ、その構築に着手した。その際、前述の CGG リピートを複数ユニット挿入した人工染色体は CGG リピートのみということで対照サンプルとなるはずである。さらに脆弱部位そのものを搭載した人工染色体と CGG リピートのみ連結した人工染色体で ChrIP を行うことで、CGG リピートに結合するだけでなく、CGG リピート不安定化の動態制御に真に関連する因子をより効率よく同定することができる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Nakayama Y., Inoue T.,
Antiproliferative Fate of the
Tetraploid Formed after Mitotic
Slippage and Its Promotion; A Novel
Target for Cancer Therapy Based on
Microtubule Poisons. *Molecules*, (査読
有), 21, 663;2016,
doi:10.3390/molecules21050663

Nakayama, Y., Uno, N., Uno, K.,
Mizoguchi, Y., Komoto, S., Kazuki, Y.,
Nanba, E., Inoue, T., and Oshimura, M.
Recurrent Micronucleation through
Cell Cycle Progression in the
Presence of Microtubule Inhibitors.
Cell Struct Funct, 査読有,
40,51-59,2015

〔学会発表〕(計 26 件)

塩田倫史, 中山祐二, 足立香織, 久郷
裕之, 難波栄二, 脆弱 X 関連振戦 / 失調
症候群 (FXTAS) における RAN タンパク
質 FMRpolyG の産生と病態との関与:
Involvement of production and
pathology of RAN protein FMRpolyG in
fragile X-associated tremor / ataxia
syndrome (FXTAS), 2017 年度生命科学
系学会合同年次大会 (conBio2017: 第
40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日
本生化学会大会), 2017.12.8, 神戸ポ
ートアイランド (神戸)

中山祐二, 足立香織, 稲岡大悟, 押村光
雄, 久郷裕之, 難波栄二, An integrated
Chromosome-based approach to
decipher the mechanism of CGG repeat
expansion in Fragile X syndrome, 日
本人類遺伝学会, 2017.11.17, 神戸国際
会議場 (神戸)

Yuji Nakayama, Kaori Adachi, Daigo
Inaoka, Mitsuo Oshimura, Hiroyuki
Kugoh, and Eiji Nanba, An integrated
Chromosomal approach to decipher
molecular mechanism of CGG repeat
expansion in Fragile X syndrome, 18th
International Fragile X and Related
Neurodevelopmental Disorders
Workshop, ケベック州 (ホテル
Sacacomie, カナダ), 2017.10.15

難波栄二, 足立香織, 中山祐二, 松浦徹,
石井一弘, 後藤雄一, 脆弱 X 症候群なら
びに脆弱 X 随伴振戦 / 失調症候群の遺伝
学的検査体制の構築 ~ 保険診療でカバ
ーされる外注検査となる ~, 第 59 回日

本小児神経学会学術集会, 2017.6.15,
大阪国際会議場 (大阪)

稲岡大悟, 砂村直洋, 大平崇人, 片岡美
喜, 押村光雄, 中山祐二, 久郷裕之, 染
色体免疫沈降法による長鎖非コード
RNA Xist 関連分子群の同定, 第 39 回日
本分子生物学会年会, 2016.12.1, パシ
フィコ横浜 (神奈川)

中山祐二, 砂村直洋, 大平崇人, 押村光
雄, 久郷裕之, プラスミド免疫沈降法
(PLIP) における特定の DNA 配列への結合
タンパク質の同定, 第 39 回日本分子生
物学会年会, 2016.11.30, パシフィコ横
浜 (神奈川)

中山祐二, 井上敏昭, 押村光雄, 微小管
阻害剤の長期曝露によって倍数体化を
伴って繰り返し起きる微小核誘導, 第
75 回日本がん学会学術総会, 2016.10.8,
パシフィコ横浜 (神奈川)

Yuji Nakayama, Naohiro Sunamura,
Kaori Adachi, Akiko Kashiwagi, Daigo
Inaoka, Mitsuo Oshimura, Hiroyuki
Kugoh, and Eiji Nanba, An integrated
Chromosomal omics approach to
decipher molecular mechanism of CGG
repeat expansion in Fragile X
syndrome, the 13th international
congress of human genetics (ICHG),
2016.4.4, 京都国際会議場 (京都)

難波栄二, 松浦徹, 石井一弘, 中山祐二,
足立香織, 後藤雄一, 脆弱 X 症候群なら
びに脆弱 X 随伴振戦 / 失調症候群の治療
促進に向けた臨床基盤整備の研究, 日
本人類遺伝学会第 60 回大会, 2015.10.15,
京王プラザホテル (東京)

(他 17 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 祐二 (NAKAYAMA, Yuji)
鳥取大学・生命機能研究支援センター・助
教
研究者番号: 40432603