

令和元年6月18日現在

機関番号：82508

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07208

研究課題名(和文) ゲノム上の標的遺伝子領域に修飾塩基を含むDNAを直接的に導入する手法の開発

研究課題名(英文) Development of a method to directly introduce a chemically modified DNA cassette into the target region of a genome

研究代表者

中山 学 (Nakayama, Manabu)

公益財団法人かずさDNA研究所・先端研究開発部・主任研究員

研究者番号：30370927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム上の塩基修飾を含めたエピジェネティックな状態は近接する領域の状態により影響を受けることが知られている。新規部位特異的組み換え酵素システムであるVCre/VloxPとSCre/SloxPの両サイトを利用したDual RMCE(部位特異的組み換え酵素依存的カセット交換)法を用いて効率的に外来の遺伝子や修飾されたDNAをゲノム上へ直接的に導入を行なった後に、DNAカセット内の分子バーコードを用いて次世代シーケンサーで解析する手法を開発した。更にVCre発現マウス、SCre発現マウスとそれぞれのレポーターマウスを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が独自に開発した新規部位特異的組み換え酵素システム(VCre/VloxPとSCre/SloxP)の発展型としての研究であり、ゲノムツールとしてはユニークな存在である。近年、ゲノム編集ツールのCRISPR/Cas9システムが注目を集めているが、CRISPR/Cas9システムは相同組み換えを利用してノックインを行うために、本研究のようなin vitroで修飾したDNAカセットを直接的にゲノム中に挿入するような手法には用いることはできない。合成した修飾塩基をゲノム中に直接的に導入した後の影響を調べることで修飾塩基の役割とエピジェネティックな状態との関係性がより直接的に明確になるであろう。

研究成果の概要(英文)：It is already known that the epigenetic state of a genome is influenced by the epigenetic state of the adjoining region. We developed a novel method to directly introduce a modified DNA cassette into the genome and analyze the influence on its epigenetic state. The foreign gene or chemically modified DNA cassette was effectively introduced into mouse genome by Dual RMCE (recombinase-mediated cassette exchange) using both VCre/VloxP and SCre/SloxP systems. The molecular bar code in the introduced DNA cassette could distinguish the state of each cell by NGS (next generation sequencing) analysis. Moreover, we established VCre- or SCre-expressing mice and their corresponding reporter mice for further analysis using this method.

研究分野：機能ゲノム学

キーワード：バイオテクノロジー ゲノム改変技術 部位特異的組み換え酵素 VCe/VloxP SCre/SloxP エピジェネティクス 修飾塩基 ゲノムエンジニアリング

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノム上の遺伝子は様々なシス配列や DNA 配列の修飾、さらにクロマチン構造により発現が調節されていることが知られている。しかしながらそれらの知見の多くが発現過程や発現誘導後の DNA の修飾やクロマチンの変化を観察した結果から得られたものである。最近ではより積極的に DNA 結合蛋白質と DNA 塩基の修飾酵素やヒストン修飾酵素を結合させて、遺伝子発現の制御を行った実験が試みられている。また、CRISPR/Cas9 システムの Cas9 の切断活性を欠損させた変異蛋白質に DNA 塩基の修飾酵素やヒストン修飾酵素を結合させて同様に遺伝子発現の変化を調べる実験が行われている。これらの実験結果は非常に重要な結果を我々に与えてくれてはいるが、人工的に融合させたキメラ蛋白質が特定の DNA 領域に結合して近傍の DNA やヒストンだけを修飾するだろうという間接的な状況での実験結果だと言わざるを得ない。現在までのところゲノム上の特定の遺伝子領域に修飾塩基を含む DNA を直接的に効率よく導入して解析する一般的な手法はない。我々が開発した部位特異的組み換えシステムである VCre/VloxP と SCre/SloxP システムを用いてゲノムに効率的に DNA 断片を導入する系を開発している過程で、他の CRISPR/Cas9 ゲノム編集ツールのように相同組み換え機構を用いる方法とは異なり、本システムでは両端に存在する 34bp の組み換えサイトに挟まれた DNA 断片はたとえ修飾されていてもゲノム上に直接的に導入できることに気付くことができた。しかも、我々の VCre と SCre を用いた Dual RMCE (部位特異的組み換え酵素依存的カセット交換)法は高効率に遺伝子カセットを導入することができるので、修飾された DNA の影響や周辺領域への効果を比較的容易に解析することができると考えられる。

(2) 今回の鍵となる VCre と SCre システムは以下のような経緯で我々自身によって開発を行ってきた。Cre/loxP や Flp/FRT システムは、部位特異的にゲノムを改変することができる広く汎用されているテクノロジーであり、Cre や Flp 組み換え酵素依存的に 3 4 塩基の組み換えサイトに挟まれた領域を除去、反転することができる。とりわけマウスのコンディショナル KO の実験では、コアとなる技術であり Cre/loxP がエクソン除去のために、Flp/FRT が (発現を邪魔する可能性がある) 薬剤耐性遺伝子の除去のために両者のシステムが同時に用いられている。我々は理化学研究所・生命医科学研究センターと共同で「ヒト一般病の関連遺伝子同定のためのコンディショナルノックアウトマウス・パイプラインの構築」を進めており、年間 5 0 遺伝子以上のペースでコンディショナル KO マウスを作製している。我々が実際に様々な遺伝子改変マウスを作製し部位特異的な組み換えシステムを多用する中で、これらの 2 種類以外に認識サイトが異なる新規の部位特異的組み換えシステムが存在するならば、より緻密なゲノム改変ができると考えた。そこで、Cre/loxP と認識サイトが異なり、同一細胞内で使用することができる新しい部位特異的組み換え酵素システムを開発した。海洋微生物であるピブリオ菌とシュワネラ菌に含まれるプラスミド由来の蛋白質は Cre 蛋白質と 30% 程度の弱い相同性を示すことに注目し、それらの特異的組み換えのための認識サイトをバイオフィーマティクスのアプローチにより同定した後、HEK293 細胞で実験的に特異的組み換え反応を確認することができた。これらの新規部位特異的組み換えシステムを VCre/VloxP と SCre/SloxP と名付け、ゲノムエンジニアリングの有用なツールとして使用できることを実証してきている。また、VCre と SCre に関しては既に特許を取得済み(特許第 5336592 号, 特許第 5336676 号)であり、多くの方々から分与依頼や共同研究の申し込みがある状況である。VCre と SCre の研究の延長上の発展技術として、これらの 2 つサイトを同時に用いた Dual RMCE (recombinase-mediated cassette exchange)法を用いると非常に高い効率で細胞のゲノム上の遺伝子カセットを交換することが出来ることが予備実験で明らかになった。この効率の良いゲノムへの導入法を用いて修飾塩基を含む DNA カセットの導入手法を考案することが出来た。

2. 研究の目的

ゲノム上の塩基修飾を含めたエピジェネティックな状態は近接する領域の状態により影響を受けることが知られている。その解析方法として修飾酵素を DNA 領域に固定する間接法は存在するが直接的に特定の場所に修飾塩基を導入する方法は存在していない。ゲノム上の標的となる遺伝子の上流部分に、*in vitro* で塩基修飾を施した DNA カセットを直接的に導入する実験手法を開発するとともに、5-メチルシトシン等の修飾塩基が近接するエピゲノムの状況からどのように影響を受けるのか、逆に近接領域にどのような影響を与えるのかに関して次世代シーケンサーを用いて解析する手法を開発する。本手法を用いることで修飾塩基の導入で受けるエピゲノムの変化を細胞 1 個 1 個ごとに明確に区別した詳細な解析を行うことができる。

3. 研究の方法

従来の方である Cas9 の切断活性を欠損させた変異蛋白質に DNA 塩基修飾酵素を結合させて特定の DNA 領域に修飾酵素を固定して DNA 塩基の修飾を促進させる間接的な方法ではなく、*in vitro* で確実に塩基を修飾させた DNA をゲノムの狙った場所に導入する実験手法を開発する。5mC 修飾した CpG 配列を標的の遺伝子の上流に VCre と SCre を用いた Dual RMCE

(recombinase-mediated cassette exchange)法で導入した後に、近接するエピジェネティックな状態の影響をどのように受けるのか、逆に近接する遺伝子領域にどのような影響を与えることができるのかを調べる。修飾塩基の影響が細胞ごとに異なる可能性が存在するために、各1個1個の細胞のメチル化の状態を区別して解析できる方法が必要である。また、複製が行われた後でも各細胞を区別して解析を行う必要がある。そのためにゲノム上に導入するDNAの各分子を区別できるようにする分子バーコード配列をオリゴの合成時に含めておくことにより、次世代シーケンサーで解析した後に、DNAカセットを導入時の各細胞を区別できるようにしておく。このような次世代シーケンサーの特徴を有効に使用した解析系を開発して、ゲノムに直接的に修飾塩基を含むDNAが導入された後の効果を解析する。(図1参照)

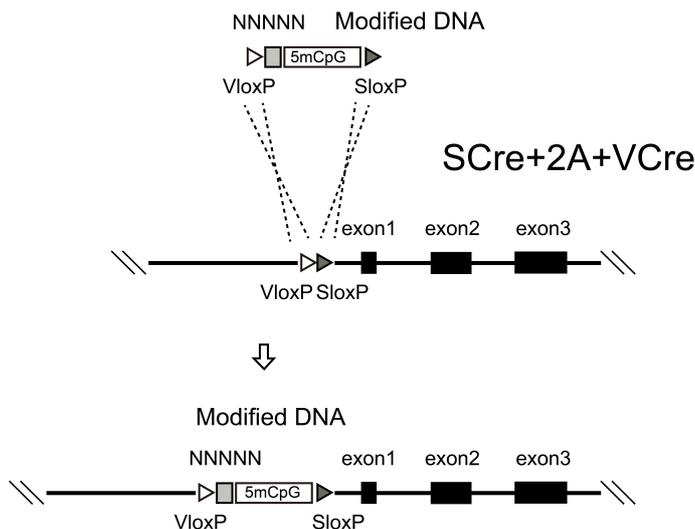


図1 ゲノム上の遺伝子領域に修飾塩基を含むDNAを直接的に導入する手法の概略

4. 研究成果

(1) 部位特異的組み換えシステムである VCre/VloxP と SCre/SloxP は、汎用されている Cre/loxP や Flp/FRT システムと認識サイトが異なるためにクロス反応を起こさず、同一細胞内で同時に使用することが出来るように我々が開発した新しい部位特異的組み換え酵素システムである。VloxP サイトと SloxP サイトの両サイトを使用した Dual RMCE (部位特異的組み換え酵素依存的カセット交換)法を用いて効率的に外来の遺伝子や修飾された DNA をゲノム上へ直接的に導入を行なう。CFP1/CXXC1 遺伝子の上流部分に修飾塩基を含む DNA カセットを導入するために作製した受け手側の細胞を作製した。ヒトゲノムを含む BAC クローン (RP11-111D6) を用いて、hCXXC1 遺伝子の相同領域、上流側 2.6kbp と下流側 2.0kbp を含む DNA 断片を第一段階の Red 組み換えで抜き取った。hCXXC1 遺伝子のエクソン 1 の上流 159bp の領域に VloxP-Puro-del taTK-SloxM1-Km-SloxM1 の PCR 断片を第二段階の Red 組み換えで挿入した。大腸菌の中で pSIMSCre から SCre 蛋白質を発現させることにより、SCre/SloxP 反応を起こし、Km 遺伝子カセットを除いた。出来上がったターゲティングベクターは hCXXC1 の相同領域と VloxP-Puro-del taTK-SloxM1、陰性マーカーの DT-A を含む。Puro-del taTK はピューロマイシン抵抗性遺伝子とチミジンキナーゼの融合蛋白質であり、細胞内でピューロマイシンによる薬剤選択と、ガンシクロビルによるネガティブ選択を行なうことができる。hCXXC1 のエクソン 1 の上流 56bp の位置で切断できる gRNA をデザインし pX330 (pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9) にクローニングした。Flpin TREX 293 細胞に CRISPR/Cas9 のプラスミドと直鎖状にしたターゲティングベクターを導入し、ピューロマイシンで選択後、正しく相同組み換えされた細胞をスクリーニングした。(図2参照)



図2 VCre/VloxPとSCre/SloxPを用いたDual RMCE法による導入用細胞

(2) Flpin TREX 293 細胞(Vlox-Puro-deltaTK-Slox)に、NNNN 配列(N12 個)を含む DNA カセットを VCre/VloxP と SCre/SloxP の Dual RMCE 法で導入した。Dual RMCE の導入では SCre と VCre の順番で間に 2A ペプチドでつないだ発現プラスミド(SCre-2A-VCre)が最も効率が良かったので、この SCre-2A-VCre 発現プラスミドを Dual RMCE の導入のために用いた。リポフェクタミン 3000 を用いて、VloxP と SloxM1 サイトを両端に持ち、分子バーコードの NNNN 配列(N12 個)と Neo 耐性遺伝子を含む DNA カセットと SCre-2A-VCre 発現プラスミドを Flpin TREX 293 細胞(Vlox-Puro-deltaTK-Slox)にトランスフェクションを行なった。トランスフェクション 2 日後にトリプシン処理により細胞の分散を行なった後、G418 で薬剤選択を行なって、Dual RMCE 法でゲノムに導入された細胞を選択した。得られた細胞が少数の細胞由来のものではなく、実際に多数の細胞で独立に Dual RMCE が行われたことであることを明らかにするために、細胞から染色体 DNA を精製し、DNA カセット中の分子バーコードの NNNN 配列(N12 個)を調べた。分子バーコードの NNNN 配列はオリゴ合成時に ATGC の 4 種類のいずれかの塩基が挿入されるので、各オリゴ分子は異なる配列を持つ。そのオリゴを用いた PCR 産物は 1 分子ごとに異なったバーコードと呼ばれる配列(12 塩基配列からなるユニーク配列)を持つ DNA 断片である。VCre と SCre を用いた Dual RMCE で細胞のゲノム上へ遺伝子カセットの導入を行った後に、NNNN のバーコード配列を調べることによって実際に組み換わった細胞の種類がどのくらいあるかを調べることが出来る。Dual RMCE 法でゲノム上に挿入された DNA と挿入されていないトランスフェクションされた DNA カセットの残存物を区別できるように、VloxP サイトの上流側の hCXXC1 のプライマーと DNA カセット内の Neo 遺伝子のプライマーを用いて、PCR で増幅を行なった。PCR 産物には VloxP サイトと分子バーコードの NNNN 配列(N12 個)が含まれる。PCR 産物を pGEM-T Easy プラスミドを用いた TA クローニングを行ない、独立したコロニー 100 クローン以上をサンガー法でシーケンスを行なった。分子バーコードの NNNN 配列を調べた結果、同じ配列はほとんどなかったことから、十分に多くの細胞で Dual RMCE 法によりゲノムに導入されたことが明らかになった。更に、同様の PCR 産物を次世代シーケンサー(MiSeq)を用いてシーケンスを行ない、分子バーコード部分を解析した結果、導入された DNA カセット分子の 1 分子 1 分子を区別することができた。修飾塩基の導入に伴うエピゲノムの変化を細胞 1 個 1 個ごとに明確に区別した詳細な解析を次世代シーケンサーを用いて行なうことができることが明らかになった。

(3) 更に本解析手法を ES 細胞で用いることができるように、VCre 発現マウス、SCre 発現マウスとそれぞれのレポーターマウスを作製した。VCre 発現マウスは、CAG プロモーターの下流に VCre 蛋白質の遺伝子を配置し、ウサギ グロビンのポリ A 付加シグナルを用いた。両サイドに ROSA26 の相同領域、陽性マーカーとして Neo 耐性遺伝子発現カセットと陰性マーカーとして DT-A 遺伝子を含むターゲティングベクターを作製した後に、マウス ES 細胞にエレクトロポレーションを行なった。Neo 耐性の ES 細胞コロニーから DNA を抽出して、相同領域の外側のプライマーと Neo 耐性遺伝子発現カセット内のプライマーを用いた PCR を 5'側と 3'側のそれぞれに関して行なった。PCR 産物の大きさと PCR 産物を用いたダイレクトシーケンスを行い陽性 ES 細胞のスクリーニングを行なった。陽性 ES 細胞を用いてキメラマウスを作製し、交配によってヘテロマウスを作出した。VCre のレポーターマウスは CAG プロモーターと EGFP 遺伝子の間に、2 個の VloxP サイトで両端を挟まれた STOP カセットを配置した。この STOP カセットは、通常は EGFP 遺伝子の転写・翻訳の抑制を行なうが、VCre/VloxP の反応が起こると STOP カセットが除去されて、EGFP の発現が行なわれる。この VCre 用レポーターのターゲティングベクターも作製後、マウス ES 細胞の ROSA26 遺伝子座に相同組み換え法で導入し、キメラマウス、ヘテロマウスを作製した。SCre 発現マウスは、VCre 発現マウスと同様に作製した。SCre のレポーターマウスは、VloxP サイトの代わりに SloxM1 サイトを用いたことと EGFP の代わりに赤色蛍光蛋白質の tdTomato を用いた以外は VCre 用のレポーターマウスと同様に作製した(図 3)。VCre 発現マウス、SCre 発現マウスとそれぞれのレポーターマウスを作製した後に、各マウスを交配させて VCre/VloxP と SCre/SloxP のマウス個体内での反応に関して検討を行なった。VCre 遺伝子と VCre 用のレポーターを両方持つマウスでは、全身で EGFP の蛍光が観察されたことから、マウス個体内で VCre/VloxP 反応が効率行なわれることが明らかになった。同様に SCre 遺伝子と SCre 用のレポーターを両方持つマウスでは、マウス全身で dtTomato の赤色蛍光が観察されたことから、マウス個体内で SCre/SloxP 反応が効率行なわれることが明らかになった。一方、VCre と SloxM1 レポーターの組み合わせ、SCre と VloxP レポーターの組み合わせでは、蛍光蛋白質の発現は見られず、クロス反応は検出できなかった。更に Cre 発現マウスを用いたクロス反応の確認実験でもクロス反応は全く検出できなかった。これらのことから、VCre/VloxP と SCre/SloxP はマウス個体内でもクロス反応なく、効率よく使用することができることが明らかになった。このような VCre/VloxP と SCre/SloxP マウスを用いた更なる発展研究として、エピジェネティクス関連遺伝子のノックアウト ES 細胞を用いて、Dual RMCE 法を利用した本解析手法を用いることで、より詳細な解析を行なうことができることが期待できる。

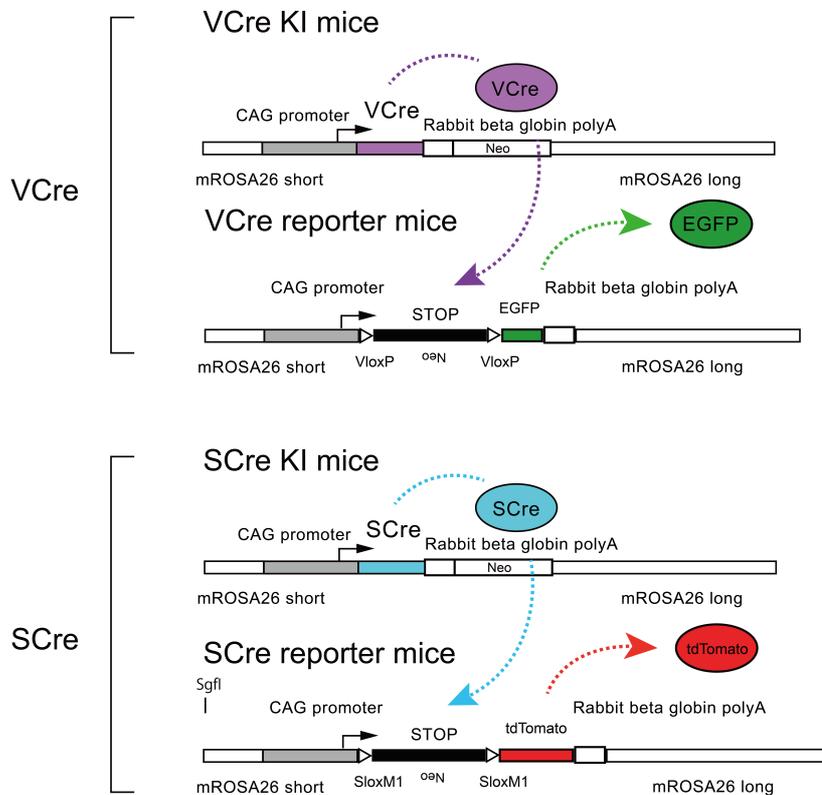


図3 VCre発現、SCre発現マウスと、それらのレポーターマウス

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Yoshimura Yuki, Ida-Tanaka Miyuki, Hiramaki Tsuyoshi, Goto Motohito, Kamisako Tsutomu, Eto Tomoo, Yagoto Mika, Kawai Kenji, Takahashi Takeshi, Nakayama Manabu, Ito Mamoru, Novel reporter and deleter mouse strains generated using VCre/VloxP and SCre/SloxP systems, and their system specificity in mice. Transgenic Research、査読有、27、2018、193-201

DOI: 10.1007/s11248-018-0067-0

〔学会発表〕(計 0件)

〔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：
 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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

公益財団法人かずさ DNA 研究所 バイオ産業技術支援センター バイオリソース普及センター
ホームページ

http://www.biosupport.kazusa.or.jp/sub_center1/ssr.html

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。