

令和元年5月23日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18402

研究課題名(和文) 効率的ゲノムヒト化マウス作製技術で明らかにするヒト大脳化の遺伝的基盤

研究課題名(英文) Genetic functions for human encephalization with efficient technology to produce genetically humanized mice

研究代表者

吉見 一人 (Yoshimi, Kazuto)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50709813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト大脳化への影響が期待される遺伝子、非コード領域の両方を対象としてゲノムヒト化マウスの作製および表現型解析を実施した。ゲノム編集技術によりCdk5rap2遺伝子のノックアウトおよびヒト型改変マウスを作製した結果、摂餌量の増加に伴う肥満様の表現型を示したことから、本遺伝子のヒト型配列が体のサイズに影響を示す可能性が示唆された。一方、霊長類ゲノムとの比較ゲノム解析により選抜した7番染色体のゲノム領域についてヒト型改変マウスを作成した結果、個体の産子率が低いことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進化過程でヒトが獲得した高度な認知能力・言語能力は、神経細胞数の増加による大脳皮質の肥大化やしわ構造の獲得といった脳形態の変化(大脳化)により生じたと考えられている。こうした大脳化関連ゲノム領域の生体内における機能を明らかとするため、ゲノム編集技術を用いてヒト型にゲノム改変したマウスモデルを作成し、その表現型を解析した。本研究を通じて効率的なゲノムヒト化マウスの作製基盤を構築したとともに、進化で保存されてきたヒト特異的配列が発生や体重などの表現型に影響することを明らかにした。この結果はヒト大脳化や認知能力の高度化における遺伝的基盤の重要性を示している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established and analyzed several knockout and genetically humanized mice at both candidate gene and non-coding regions associated with human encephalization. The KO and SNP-humanized mice at Cdk5rap2 were established by genome editing technologies. Phenotyping analysis of the KO and KI mice revealed that the human-specific sequence of this gene can have an influence on the size of the body via feeding behavior. Second, we also established the genetically humanized mice at the non-coding region in chromosome 7 which was selected by comparative genomic analysis with primate and non-primate genome. The strain demonstrated the decline of birth rate.

研究分野：実験動物学

キーワード：ゲノムヒト化 マウス ゲノム編集

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

1. 研究開始当初の背景

進化過程でヒトが獲得した高度な認知能力・言語能力は、神経細胞数の増加による大脳皮質の肥大化やしわ構造の獲得といった脳形態の変化(大脳化)により生じたと考えられている。大脳化の獲得には、自然選択によりゲノム上に保存・蓄積されてきたヒト特異的変異などの遺伝的要因が大きく影響している。これまで、脳神経疾患の原因遺伝子や神経細胞増殖関連因子などの遺伝子上に生じたヒト特異的な変異が、大脳化の候補ゲノム領域として解析されてきた。(Pulvers JN et al., Front Cell Neurosci. 2015)。また、進化関連領域として同定されたヒト特異的非コード領域の一つが、細胞増殖因子の発現量を脳特異的に上昇させて神経細胞の増殖速度を高めるといった報告がされた(Boyd JL et al., Curr Biol. 2015)。このことは、非コード領域の遺伝的变化が大脳化へ影響したことを示唆している。こうした大脳化関連ゲノム領域の生体内における機能を明らかにするためには、ヒト特異的 DNA 配列を導入したゲノムヒト化動物を用いた機能解析をする必要がある。

申請者はこれまでに CRISPR/Cas9 を用いた効率的な遺伝子改変マウス・ラットの作製基盤を構築し、宿主ゲノムの切り出しと外来遺伝子の挿入を同時に行うゲノム置換動物の作製に成功した(Yoshimi K et al., Nat Commun, 2014, Yoshimi K et al., Nat Commun, 2016、特願 2014-235898)。そこで本手法を用いることで、マウスの大脳化関連領域をヒト特異的配列へ置き換えたゲノムヒト化マウスを高効率に数か月という短期間で作製することができる、と考えた。作製されたゲノムヒト化マウスは、大脳化の候補遺伝子からヒト型タンパク質を発現する、もしくはヒト型非コード領域によりヒトと同様の遺伝子発現制御を示すことが期待され、ヒト体内での動態を正確に模倣した動物モデルになると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、複数の大脳化関連ゲノム領域を選抜してヒト型配列へ置換したマウスを作製することで、効率的なゲノムヒト化動物作製基盤を構築するとともに、学術的に重要であるヒト大脳化の遺伝的基盤の一端を解明することである。標的とする候補遺伝子は、小頭症の原因遺伝子 MCPH1 および CDK5RAP2 とした。いずれも神経前駆細胞の細胞分裂を制御しており、大脳化候補遺伝子と考えられている。これまでに、MCPH1 はヒト型配列を導入したトランスジェニックマウスが胎児期の神経成熟や有髄化の遅延による大脳化現象を示すことが報告されており(Shi L et al., CSHA conference, 2014)、MCPH1 遺伝子ヒト化マウスは確実に大脳化現象を示すと予想される。一方、進化に関連することが予想されるヒト特異的非コード領域については、比較ゲノム解析により新しい候補領域を設定し、表現型にかかわる新規標的配列を同定することを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 大脳化を導く候補非コード領域の選抜

霊長類、げっ歯類ゲノム情報などを用いて比較ゲノム解析を行い、200bp 以上の大型霊長類特異的非コード領域を選抜した。さらに神経細胞増殖関連遺伝子との関連性、ヒト脳・マウス脳の RNA-seq データを元に、脳内での発現制御に関連する非コード領域を選抜した。

(2) 大脳化候補遺伝子ヒト化マウスの作製

候補遺伝子である MCPH1 および CDK5RAP2 について KI ドナー DNA としてヒト型配列の cDNA クローンおよび一本鎖 DNA を準備した。C57BL/6 マウス受精卵に Cas9 mRNA、gRNA、ドナー DNA の混合溶液を顕微注入し、偽妊娠雌 ICR マウスに卵管移植して産子を得ることとした。産子 DNA を抽出後、シーケンシング解析によりゲノムがヒト型配列に置換しているかどうか確認した。また、(1) で選抜した新規非コード領域については、選抜した 2 カ所について同様の手法を用いてゲノム改変マウスを作製した。

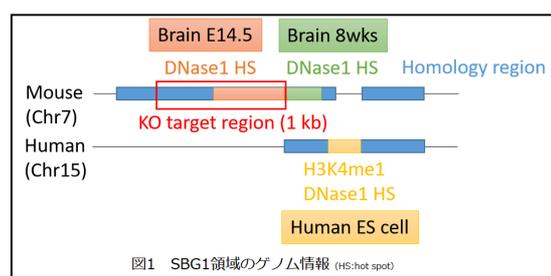
(3) 作製マウスの表現型解析

上記で作製したゲノム改変マウスについて、通常飼育下で異常が生じるかどうか経時的観察を行った。また脳の大きさ、重量、脳構造についても形態学的、組織学的解析を行い、大脳化に関連した表現型への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 大脳化を導く候補非コード領域の選抜

げっ歯類と霊長類との比較ゲノム解析により、げっ歯類のみで高度に保存されている 100 塩基以上の非コード領域を 10 カ所、霊長類のみで高度に保存されている領域を 9 カ所選抜した。ここではげっ歯類のみで保存されている領域に着目した。さらに国際ヒトエピゲノムプロジェクトにより得られたエピゲノム情報を用いて、標的領域においてピークの見られる領域を選抜した結果、7 番染色体上の 2 つの領域 Small brain



gained region 1(SBG1)、SBG2)を得た。いずれもマウス胎児脳で DNaseI のホットスポットが存在しており、大脳化にかかわる可能性が示唆された。SBG1 領域の情報を例として図1に示す。

(2) 大脳化候補遺伝子ヒト化マウスの作製

MCPH1 および CDK5RAP2 について KI マウスの作製を試みた。その結果、cDNA をマウス配列からヒトに置き換えた KI マウスは作製する過程で作出された Cdk5rap2 の 6 塩基欠損 (Cdk5rap2-6del) マウスが肥満様の表現型を示すことが分かった。さらに興味深いことに、欠損部位のセリンがヒト以外の哺乳類では極めて保存されている一方、ヒトはロイシンであることが明らかになった。そこで本領域に着目し、一本鎖オリゴ DNA をドナーとして、このセリンをロイシンに置換したヒト化マウス (Cdk5rap2-S3L) を作製した。SBG1 領域については、長鎖一本鎖 DNA を作製し KI を試みた結果、大規模欠失マウス (SBG1-LD) およびヒト配列置換マウス (SBG1-KI) を作製することに成功した。

(3) 作製マウスの表現型解析

通常飼育下ですべてのマウス系統を経時的に観察した結果、Cdk5rap2-6del ヘテロマウスが肥満様の表現型を示した。実際に解剖を行い、臓器重量を測定した結果、多くの臓器で巨大化、有意な脂肪の蓄積が観察された(図2)。摂餌量も野生型に比べて多い傾向が見られたことから、過食による肥満が示唆された。摂餌量および体重の増加がみられた KO ヘテロマウスについて、血液を用いた生化学検査を行ったが、全ての項目で有意な差は得られなかった。

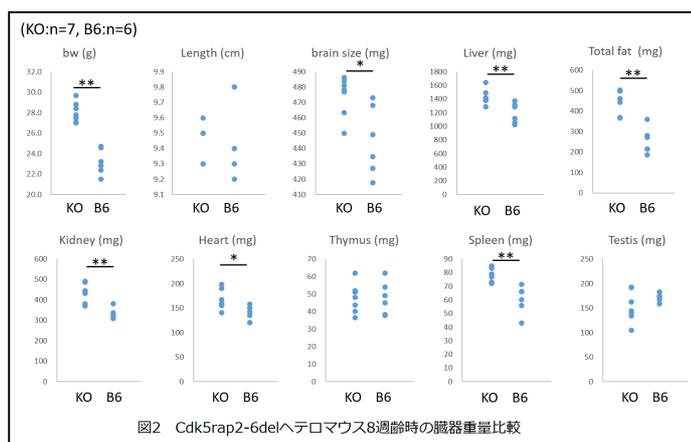


図2 Cdk5rap2-6delヘテロマウス8週齢時の臓器重量比較

また脳の組織切片を作製して観察した結果、大きな構造的異常は観察されなかった。一方、KI (Cdk5rap2-S3L) マウスについて、通常飼育下および高脂肪食時において経時的に体重測定を行った結果、ホモ KI マウスは体重の増加率が高い傾向を示した。血液を用いた生化学検査を行った結果、測定項目で有意な差は得られなかったが、空腹時血糖で高い傾向が見られた。以上から Cdk5rap2 でヒトが特異的に持つアミノ酸配列がエネルギー代謝については体のサイズに影響を示す可能性が示唆された。

大規模欠失マウス (SBG1-LD) およびヒト配列置換マウス (SBG1-KI) については、SBG1-KI 系統についてホモ型個体の産子率が低いことが明らかになったが、生まれてきた産子は通常飼育下において表現型の差は見られなかった。以上の結果から、進化の過程でヒト特異的に生じた遺伝子変異、非コード領域がマウスの発生や体重などの表現型に影響を与えうることが明らかになった。

本研究を通じて、複数の効率的なゲノムヒト化マウス作製基盤を構築することができた。また本技術を用いて進化の過程で保存されてきたゲノム領域の KO マウス、ゲノムヒト化マウスを複数系統作出することに成功し、一部の系統で表現型の異常を観察することができた。今後、こうした候補遺伝子、候補非コード領域がマウスに与える影響、特に脳の発生に関わる分子メカニズムを詳細に解析することで、ヒト大脳化の一端が明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

宮坂佳樹、吉見一人、真下知士、ゲノム編集概説 - 基礎技術として利用される CRISPR/Cas9 -、アンチ・エイジング医学 506-512、査読無、2018

Miyasaka Y, Uno Y, Yoshimi K, Kunihiro Y, Yoshimura T, Tanaka T, Ishikubo H, Hiraoka Y, Takemoto N, Tanaka T, Ooguchi Y, Skehel P, Aida T, Takeda J, Mashimo T, CLICK: one-step generation of conditional knockout mice, BMC genomics, 19(1)318、査読有、2018

宮坂佳樹、吉見一人、真下知士、疾患モデルマウス、ラット、医療応用をめざすゲノム編集 90-99、査読無、2018

Yoshimi K, Mashimo T, Application of genome editing technologies in rats for human disease models, Journal of human genetics, 63(2)115-123、査読有、2017

吉見一人、小出剛、さまざまなマウス系統 遺伝的多様性と表現型への影響、実験医学別冊 マウス表現型解析スタンダード (伊川正人, 高橋 智, 若菜茂晴 / 編) 29-35、査読無、2016

〔学会発表〕(計 10 件)

吉見 一人、真下知士、マウス・ラットにおけるゲノム編集技術の現状、第 41 回日本分子生物学会年会、2018

Kazuto Yoshimi, Yayoi Kunihiro, Yuji Imai, Tsuyoshi Koide, Tomoji Mashimo, Long single strand DNA (LssDNA)-mediated knock-in for large genomic regions in rodents, The 9th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, 2018

吉見 一人、真下知士、ノックインマウス・ラット作製に向けた効率的ゲノム編集法の開発研究、生命科学系学会合同年次大会、2017

吉見 一人、ゲノムヒト化モデルに向けたゲノム編集技術、第 71 回日本人類学会、2017

吉見 一人、ゲノムヒト化動物の開発に向けたゲノム編集技術の応用、第 89 回日本遺伝学会、2017

吉見 一人、ゲノムヒト化動物作製にむけた効率的ゲノム編集技術の開発、第 19 回日本進化学会、2017

Kazuto Yoshimi, CRISPR/Cas9-mediated knock-in strategies in rodents for humanized models, Kyoto Diabetes Mini-Symposium - Beta-Cell Replacement Strategies, 2017

吉見 一人、ゲノム編集技術を用いたノックイン動物作製の効率化およびゲノムヒト化モデルへの応用、大阪大学ゲノム編集センター第 2 回セミナー、2017

吉見 一人、今井悠二、真下知士、小出剛、長鎖一本鎖オリゴを用いたノックイン動物の作製、第 1 回日本ゲノム編集学会、2016

吉見 一人、今井悠二、田邊彰、真下知士、小出剛、マウス・ラットにおける長鎖一本鎖オリゴを用いた高効率なノックイン、第 63 回日本実験動物学会総会、2016

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小出 剛

ローマ字指名：Koide Tsuyoshi

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。