

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06349

研究課題名(和文) ニューロエピジェネティカルな制御による高次脳機能の発現機構

研究課題名(英文) Neuroepigenetic regulation of gene expression by DNA topoisomerase IIbeta

研究代表者

宮地 まり (Miyaji, Mary)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50349255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、モデル脊椎動物であるメダカを用いて遺伝学と行動学的解析を組合せることにより、トポIIが神経機能に重要な遺伝子の発現を制御する機構と、その破綻が高次脳機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的として行った。ゲノム編集法によりトポII遺伝子に変異の導入された3系統を樹立した。トポIIホモ接合変異体は孵化後1週間以内に致死となることを明らかにした。孵化直後のホモ、ヘテロ、野生体頭部を用いてmRNA-seqを行った結果、多数の神経特異的遺伝子の発現が減少することが明らかとなった。現在社会性行動に着目し、行動評価実験を行なっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では日本オリジナルのモデル脊椎動物であるメダカを用いて遺伝学と行動学的解析を組合せることにより、トポIIが新規のエピジェネティック制御で神経機能に重要な遺伝子の発現を制御する機構と、その破綻が高次脳機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的として行われた。実際、トポIIが発現誘導する遺伝子が多数同定され、それらに多くの神経・精神疾患の関連遺伝子が含まれていた。今後の行動評価実験によりASDをはじめとする精神神経疾患の病態理解に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We established three lines in which mutations were introduced into the topoisomerase II gene by genome editing. The topoisomerase II homozygous mutants were found to be lethal within a week after hatching. We performed mRNA-seq analyses using heads of homozygous, heterozygous, and wild-type individuals immediately after hatching, and revealed that the expression of many neuron-specific long genes was decreased in the homozygous mutants. Similar decreases were observed in the heterozygotes, though the decrease was lower in the heterozygotes than in the homozygotes. We are trying to discover behavioral abnormalities of heterozygous mutants with a focus on social behaviors.

研究分野：分子生物学, ゲノム科学

キーワード：Neurobiology Epigenetics Social behavior Nuclear structure

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

DNAトポイソメラーゼ (トポ) II  $\beta$  は DNA の切断と再結合により DNA の高次構造を変換する酵素で、最終分裂後の2度と分裂しない神経細胞で発現が増加する。私たちは、トポ II  $\beta$  が神経細胞の核内構造変換という新たなエピジェネティック制御によって、一群の神経機能に重要な遺伝子の発現を誘導することを明らかにした (Ref.[1])。トポ II  $\beta$  が発現誘導する遺伝子には、複数の ASD (Autism spectrum disorder) 関連遺伝子があり、実際 ASD 患者のゲノムにトポ II  $\beta$  点変異が同定されている (Ref. [2],[3])。我々は、その点変異によりトポ II  $\beta$  酵素活性は著しく低下することを見出した。本研究では日本オリジナルのモデル脊椎動物であるメダカを用いて遺伝学と行動学的解析を組み合わせることにより、トポ II  $\beta$  が新規のエピジェネティック制御で神経機能に重要な遺伝子の発現を制御する機構と、その破綻が高次脳機能に及ぼす影響を明らかにする。ASD をはじめとする精神神経疾患の病態理解に繋がることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、ゲノム編集による遺伝学的手法と高次脳機能を検証できる行動実験系が確立しているメダカを用いて、トポ II  $\beta$  に変異を導入して、脳での遺伝子発現変化と行動異常を観察する。トポ II  $\beta$  によるニューロエピジェネティカルな遺伝子発現の制御機構とトポ II  $\beta$  の神経系における働きを個体レベルで明らかにすることが目的である。

## 3. 研究の方法

### (1). ゲノム編集によってトポ II $\beta$ 遺伝子に変異を導入したメダカの系統を作成する.

#### ① ゲノム編集による切断点の選択

メダカトポ II  $\beta$  遺伝子は、36 個の exon からなる 1,602 アミノ酸をコードする。ゲノム編集で切断を生じさせてトポ II  $\beta$  遺伝子に変異を導入する領域として、アミノ末端に近い exon 2 とトポ II  $\beta$  タンパク質の酵素活性中心をコードする exon 20 を標的としてガイド RNA を設計した。

#### ② G0 個体の作成と選択

受精卵にガイド RNA, Cas9 mRNA をマイクロインジェクションし、2ヶ月齢まで生育させた後、尾ビレから抽出したゲノム DNA を鋳型に PCR / T7 endonuclease I assay を行うことにより変異が導入されたと予想される G0 個体を選択。

#### ③ 選択 G0 個体と野生型を掛け合わせるにより F1 を作出。

得られた G0 個体 (雄) と野生体 (メス) とを掛け合わせるによりヘテロ接合体 F1 を作出。受精後 3 日の卵を用いて PCR を行うことにより、生殖系列に変異が伝播することを確認後、2ヶ月齢まで生育させる。

#### ④ 変異の種類と同定

2ヶ月齢 F1 の尾ビレから抽出したゲノム DNA を鋳型に PCR を行うことにより変異を有する個体を選択。変異アリル由来の PCR 産物をシーケンシングすることにより変異の種類を同定、分類し系統維持する変異系統を選択する。

#### ⑤ 変異体の系統維持

得られた F1 と野生体を交配することにより F3 まで継代し、ゲノム編集により生じうる Off-target の効果を軽減した。各世代で PCR により変異を有する個体を選抜し、次世代の育成に使用した。

### (2). トポ II $\beta$ 変異によって生じる異常を評価する.

#### ① F3 まで継代したヘテロ接合体同士を交配し、得られた受精卵を育成、PCR により

genotyping を行うことにより、ホモ接合体、ヘテロ接合体、野生体が生じる割合を調べ、ホモ接合体が生育可能かを評価する。

② ホモ接合体が生存可能なステージを決定する。

### (3). トポIIβ変異によって生じる遺伝子発現への影響を調べる.

① ヘテロ接合体同士を交配により得られた受精卵をホモ変異体が生存可能なステージまで育成し、genotyping によりホモ、ヘテロ、野生体に分類する。

② ホモ、ヘテロ、野生体の神経系から total RNA を調製し、mRNA-seq により発現遺伝子解析を行う。

### (4). トポIIβ変異によって生じる行動への影響を調べる.

トポIIβ変異体メダカの行動を観察し、異常が観察された行動の定量的および定性的評価を行う。

## 4. 研究成果

### (1). ゲノム編集によってトポIIβ遺伝子に変異を導入したメダカの系統を作成する.

Exon 2 と Exon 20 に切断を導入した G0 個体は PCR の結果から、細胞ごとに異なる複数種類の変異を有する細胞からなるモザイク状の個体であることが予想された。野生型を掛け合わせるにより F1 を作成した結果、Exon 2 では、種間で高度に保存された 2 アミノ酸残基が欠失した変異体、同じ 2 アミノ酸残基が欠失し、それに置換する形で新規に 3 アミノ酸残基が挿入された変異体、frame-shift が起きて短いポリペプチドをコードしたのち終止する変異体の 3 種類が同定された。Exon 20 では、活性中心であるチロシン残基の直前で frame-shift が起きた変異体が 2 種類同定された。Exon 2 では in-frame の 2 系統 (2-1-1, 2-1-3)、Exon 20 では frame-shift が起きた 1 系統 (20-1) を選択し、計 3 系統を維持することとした。

### (2). トポIIβ変異によって生じる異常を評価する.

ヘテロ接合体同士を交配により得られた受精卵を孵化直前まで育成し、全卵を用いて genotyping を行うと、ホモ接合体、ヘテロ接合体、野生体がおおよそ 1:2:1 の割合で含まれていたが、生後 2 ヶ月の genotyping では、いずれの系統でもホモ変異体の個体は得られなかった。20-1 系統で孵化後の個体を調べた結果、ホモ変異体は孵化後 1 週間以内に致死に至ることが分かった。孵化直後のホモ変異体と野生体を固定し、パラフィン包埋後、体軸に対して垂直な連続な切片を作成し、HE 染色を行なったが組織学的な大きな違いは観察されなかった。

2-1-1, 2-1-3 系統が有する変異は、種間で高度に保存された領域に存在する。そこで、組換え体タンパク質の発現、精製と酵素活性の評価系が確率しているラット Flag-Topo II β に 2-1-1, 2-1-3 系統が有する変異を導入し、酵素活性を調べた。その結果、2-1-1 系統の変異を導入した Flag-Topo II β は非常に低発現であること、2-1-3 系統の変異を導入した Flag-Topo II β には活性がないことが分かった。

### (3). トポIIβ変異によって生じる遺伝子発現への影響を調べる.

20-1 系統の孵化直後の個体はホモ接合体、ヘテロ接合体、野生体に目立った差異が認められなかった。そこで孵化直後のメダカ頭部を用いてそれぞれの mRNA-seq 解析を行った。その結果、ホモ変異体では多数の神経特異的遺伝子の発現低下が認められた。そしてその多くが ASD をはじめとする精神神経疾患に関連する長い遺伝子であった。ヘテロ変異体でもその多くに発現低下が認められたが、低下の程度は低かった。

### (4). トポIIβ変異によって生じる行動への影響を調べる.

20-1 系統のトポIIβのホモ変異体では、孵化直後から運動能力が低く卵黄嚢が消失してしばらくすると致死となった。ヘテロ変異体では、遺伝子発現への影響は大きくなかったがいく

つかの遺伝子では有意に発現が低下していたため、ヘテロ変異体と野生体の間で行動（特に社会性行動）に着目して実験系を構築中である。今後、再現性の確認を行う予定である。

## References

- [1] Miyaji-Yamaguchi M, Sano K, Tsutsui KM, Tsutsui K. Topoisomerase IIbeta activates a subset of neuronal genes that are repressed in AT-rich genomic environment. *PloS One* 2008;3:e4103.
- [2] Lam C wan, Yeung W lan, Law C yiu. Global developmental delay and intellectual disability associated with a de novo TOP2B mutation. *Clinica Chimica Acta* 2017;469:63-8.
- [3] Hiraide T, Watanabe S, Matsubayashi T, Yanagi K, Nakashima M, Ogata T, et al. A de novo TOP2B variant associated with global developmental delay and autism spectrum disorder. *Molecular Genetics and Genomic Medicine* 2020;8:1-5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyaji Mary, Furuta Ryohei, Hosoya Osamu, Sano Kuniaki, Hara Norikazu, Kuwano Ryozo, Kang Jiyoung, Tateno Masaru, Tsutsui Kimiko M., Tsutsui Ken	4. 巻 10
2. 論文標題 Topoisomerase II targets DNA crossovers formed between distant homologous sites to induce chromatin opening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-75004-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyaji Mary, Furuta Ryohei, Hosoya Osamu, Sano Kuniaki, Hara Norikazu, Kuwano Ryozo, Kang Jiyoung, Tateno Masaru, Tsutsui Kimiko M., Tsutsui Ken	4. 巻 -
2. 論文標題 Topoisomerase II targets DNA crossovers formed between distant homologous sites to modulate chromatin structure and gene expression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/484956	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮地まり, 古田良平, 細谷 修, 佐野訓明, 筒井公子, 筒井 研
2. 発表標題 トポイソメラーゼII は遠隔ゲノム部位の相同配列間に働いてクロマチンを脱凝縮し神経関連遺伝子の発現に関与する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古田良平, 宮地まり, 細谷 修, 佐野訓明, 筒井公子, 筒井 研
2. 発表標題 トポイソメラーゼII の遠隔ゲノム部位間での働きを解析するeTIP-seq法の検証
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮地 まり
2. 発表標題 hnRNP/ SAF-A/ SP120はRNA存在下でMARに選択的に結合する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮地 まり
2. 発表標題 トポイソメラーゼII は神経細胞終末分化において遠隔ゲノム部位の相同配列間に働きクロマチン脱凝縮を誘導する
3. 学会等名 第 36 回 染色体ワークショップ 第 17 回 核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	細谷 修  (Hosoya Osamu)		
連携研究者	竹内 秀明  (Takeuchi Hideaki)  (00376534)	東北大学・大学院生命科学研究科・教授   (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------