

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19178

研究課題名（和文）CRISPRランダム切除ミュータジェネシスによる非遺伝子ゲノム領域の機能解明

研究課題名（英文）Mutagenesis of non-coding regions via excisional genome editing

研究代表者

水野 聖哉（Mizuno, Seiya）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：10633141

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：染色体にコードされた遺伝子から発現するタンパク質は各種の生命活動や生命イベントの根幹となる。これまで、実験用マウスなどのモデル動物を用いた生命科学研究および医学研究において、遺伝子自身を欠失させた際の影響はよく調べられてきたが、その遺伝子の発現時期や場所や量を制御する染色体配列の機能解析は実施されていなかった。本研究では、遺伝子の発現パターンを制御する染色体領域を決定するための方法の開発を実施し、マウス胚性幹（Embryonic Stem, ES）細胞においては、遺伝子の発現パターンを制御している広域なゲノム候補領域の特定に資する手法を開発することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的な遺伝子は各種の生命活動や生命イベントを制御するタンパク質をコードしている。遺伝子およびそれにコードされたタンパク質の機能を知るためには、その遺伝子が存在する染色体領域を欠落させたモデル動物を作成すればよい。このノックアウト動物の作出と解析により、各種遺伝子の機能が続々と明らかとなってきているが、それらの遺伝子が機能すべき時間や細胞種、そしてそれらの遺伝子およびタンパクの量を規定する染色体領域の解析はほとんど進んでいない。我々が新たに開発した大規模かつ半ランダム染色体領域を欠落させることのできる今回の手法は、遺伝子の発現パターンの理解に貢献する。

研究成果の概要（英文）：Proteins expressed from genes encoded on chromosomes are the basis of various biological activities and life events. Although the effects of gene deletion have often been studied in life science and medical research using model animals such as laboratory mice, functional analysis of the chromosomal sequences that control the timing, location, and amount of gene expression has not been conducted. In this study, we developed a method to determine the chromosomal regions that control gene expression patterns, and in mouse Embryonic Stem (ES) cells, we succeeded in developing a method that contributes to the identification of a wide range of candidate genomic regions that might control gene expression patterns.

研究分野：実験動物学

キーワード：遺伝子改変マウス ゲノム編集

### 1. 研究開始当初の背景

染色体にコードされた遺伝子から発現するタンパク質は各種の生命活動や生命イベントの根幹となる。これまで、実験用マウスなどのモデル動物を用いた生命科学研究および医学研究において、遺伝子自身を欠失させた際の影響はよく調べられてきたが、その遺伝子の発現時期や場所や量を制御する染色体配列の機能解析は実施されていなかった。ゲノム科学の発展により、遺伝子の発現パターンを制御するゲノム領域が多種多様な疾患に関連することが明らかとなってきた。そして、この発現パターン制御ゲノム領域の位置をまとめた ENCODE 等のデータベース整備が着実に進んでいる。ENCODE などのデータベースにある膨大な ChIP-Seq データ、そしてヒトやマウス等の遺伝学的研究から、重要と思われる発現パターン制御候補領域が多数同定されているが、その機能を生体で証明する研究が少ないため、それらは玉石混交のデータの羅列に留まっている側面が強い。

各生命現象を制御する主因子がタンパク質であることに疑いはないが、その産生のタイミングや量、すなわち細胞内の文脈は発現パターン制御ゲノム領域により規定されている。この極めて重要なゲノム機能エレメントの機能解析実験があまり実施されていない主な理由は、発現パターン制御領域の機能的部位が不明瞭なためである。遺伝子機能(=その遺伝子にコードされているタンパク質機能)を検証する実験の場合、標的遺伝子のエクソンの位置や翻訳フレームは明確に決定されているため、タンパク質をコードしている配列に数塩基の欠損や挿入変異を生じさせて機能的なタンパク質を発現しない *null* 変異体を容易に作出できる。一方、発現パターン制御配列に翻訳フレームはなく、機能的に重要な領域の位置や長さも不明瞭である。この不確定要素の多さから、実験規模が大きい *in vivo* 実験の実施が特に少ないが、発現パターン制御ゲノム領域の機能部位は細胞系譜や細胞状態ごとに異なるため、*in vivo* 実験で得られる非遺伝子ゲノム領域の機能に関する情報は非常に多い。

発現パターン制御ゲノム領域の機能を実験的に証明するほとんど唯一の方法は、その領域を染色体 DNA 上から切除(欠失)することである。CRISPR を用いて標的領域の両端を同時に切断することで、その領域を切除することができる。しかし、機能的に重要な“必要かつ十分な領域”を特定するためには、欠損領域が少しずつ異なる多くの変異マウス系統が必要で、その作出と解析には多大な労力を要する。

### 2. 研究の目的

細胞内の文脈を支配する発現パターン制御ゲノム領域の機能的な重要性を標的領域内で網羅的に評価できる *in vivo* 解析系を確立する。

### 3. 研究の方法

発現パターン制御ゲノム候補領域は遺伝子間に散在的に存在する。プロモーターやエンハンサー、もしくは、miRNA クラスターは互いに協調的に作用するため、各発現パターン制御ゲノム候補領域の単一切除だけでなく複数を同時に切除することでより多くの知見が得られる。

そこで『CRISPR Excision Random Mutagenesis(以下、CERM)』を開発する。CERM とは、自身が標的としたゲノム DNA 領域にランダムな切除変異を導入する方法である。

CERM の具体的なフローは、①: 解析対象とするゲノム領域を決め、その領域内に 10 個程度の CRISPR 切断サイト(=sgRNA 標的サイト)を設定する。②: 各サイトに対する sgRNA を発現する「U6 プロモーター-sgRNA Transgene」をサイト数分だけ構築する。③: マウス個体への発生能を有する胚性幹(embryonic stem; ES)細胞に上述の sgRNA 発現ベクターを導入する。この時、トランスポザゼを用いて各ベクターをその種類も組み合わせもランダムに ES 細胞のゲノム DNA に組み込ませる。④: ③で構築した sgRNA 発現ベクター発現 ES 細胞ライブラリに Cas9 発現ベクターを導入する。この Cas9 発現ベクターには薬剤誘導的自殺遺伝子と二本鎖切断レポーターカセットも搭載しておき、ゲノム編集が生じた細胞を FACS で分取後、Cas9 発現ベクターがゲノム DNA に組み込まれた ES 細胞を致死させる。⑤: 生存した細胞集団から一細胞クローニングにして、ゲノム編集済み ES 細胞クローン・ライブラリを構築する。⑥: 各 ES 細胞からゲノム DNA を抽出し、それぞれの ES 細胞が有する sgRNA 発現ベクターの種類と組み合わせをアンプリコン次世代シーケンズ解析で決定する。また、その sgRNA 保持情報を参照し、発現パターン制御ゲノム候補領域に生じた変異を PCR およびアンプリコン次世代シーケンズ解析で決定する。

#### 4. 研究成果

##### ①および②: sgRNA 発現ライブラリの構築

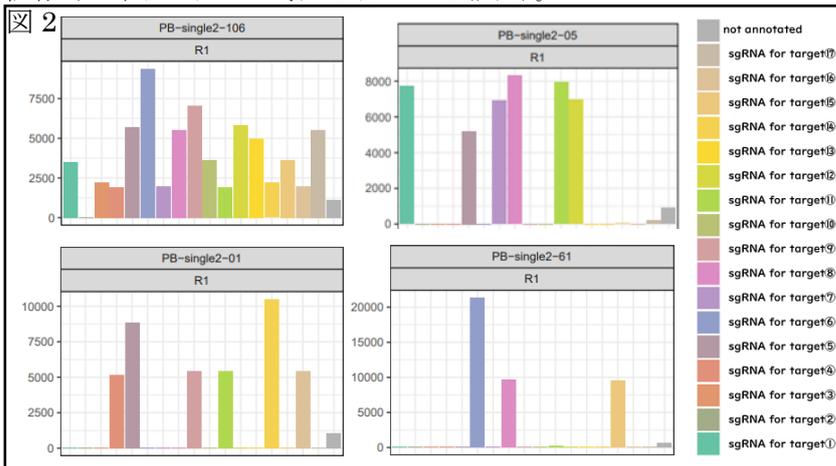
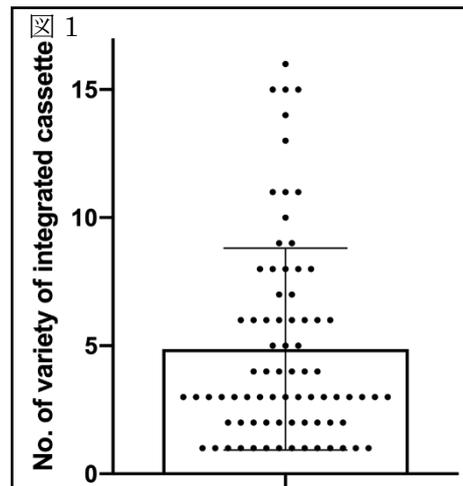
このライブラリは X 染色体上に存在する発現パターン制御ゲノム候補領域を一定の間隔で標的とする 16 種の sgRNA をそれぞれ発現するベクターとした。インサートの両端に ITR 配列を加え、その ITR 配列に挟まれた部位に U6 プロモーター-sgRNA(各種)が導入されたベクターである。sgRNA の発現とその切断活性は EGxxFP により確認した。なお、このベクターにはネオマイシン耐性遺伝子も搭載した。

##### ③: マウス ES 細胞への sgRNA 発現ベクターを導入

トランスポザーゼ発現ベクターと上述の sgRNA 発現ベクターライブラリを C57BL/6(黒毛)マウスより樹立した ES 細胞集団にトランスフェクション法で共導入した。なお、トランスポザーゼ発現ベクターには薬剤誘導的自殺遺伝子も搭載した。遺伝子導入後から数日間、自殺遺伝子を活性化させる薬剤とネオマイシンを ES 細胞の培養に添加し、sgRNA 発現ベクターが染色体に導入され、かつ、トランスポザーゼ発現ベクターが染色体に挿入していない ES 細胞のみを取得した。この ES 細胞集団のゲノム DNA を抽出し、取り込まれた sgRNA 発現ベクターの種類をアンプリコン次世代シーケンス解析で確認したところ、16 種すべての sgRNA 発現ベクターが取り込まれていることが確認された。

##### ④~⑥: ゲノム編集済み ES 細胞クローン・ライブラリの構築と評価

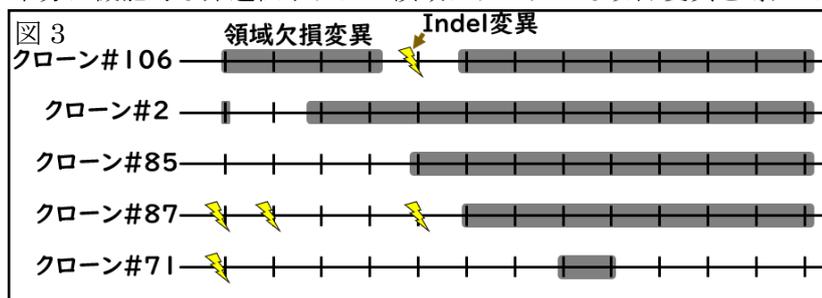
上述の sgRNA 発現ベクター導入 ES 細胞集団に Cas9 発現ベクターを導入し、標的染色体領域にランダムな変異を導入した。Cas9 発現ベクターには薬剤誘導的自殺遺伝子も搭載されているため、遺伝子導入後に自殺遺伝子活性化薬剤を添加し、Cas9 発現ベクターがゲノムに組み込まれたクローンを致死させた。その後、シングルセルクローニングを行うことで 90 個近い ES 細胞クローン・ライブラリを構築することに成功した。これらの ES 細胞クローン・ライブラリのそれぞれが有する sgRNA の種類とその数をアンプリコン次世代シーケンス解析した結果、最大で 16 種類の sgRNA を有するクローンから 1 つの sgRNA のみを有するクローンが存在していた(図 1)。なお、多くのクローンでは 5 種類以下の sgRNA 配列が確認されたが、それ以上の sgRNA の種類を有する ES 細胞も少なからず存在していた(図 1)。図 2 に示す通りに、これらの各クローンがもつ sgRNA の組み合わせはクローン間で異なっていることから、当初の予定通りに、ランダムに sgRNA 発現ベクターが導入できたと考えられる。次に、各 ES 細胞クローンにおいて、導入された sgRNA を頼りに各標的サイトにて変異が生じているのかを PCR およびアンプリコンシーケンス解析で評価した結果、当初の予定通りに indel 変異や領域欠損変異が sgRNA 依存的に半ランダムに導入されていた(図 3)。



ES 細胞だけでなく受精卵でも同様の系の構築に取り組んだ。受精卵ゲノム編集ではモザイクや想定以上の大規模欠損、そして導入できる RNA の総体的な量の制限から、ES 細胞を用いた系に比べ、ランダム変異導入効率は著しく低かった。以上の結果から、本系は、今のところはシングルセルクローニングが可能で、かつ、遺伝子導入効率が比較的高

い細胞に限られるものの、十分に機能的な非遺伝子ゲノム領域にランダムな切除変異を導入できると結論づけた。

各 ES 細胞クローンから胚盤胞補完法や 4 倍体補完法でキメラマウスを作成し、その表現型を解析することで、それぞれの発現パターン制御ゲノム領域の欠損が表現型に与える影響を検討することが可能となる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森本 健斗, 沼田 幸樹, 大徳 陽子, 濱田 優子, 加藤 花名子, 高橋 智, 村田 知弥, 水野 聖哉, 杉山 文博
2. 発表標題 生殖隔離制御遺伝子座Hstx2上のMir465クラスター欠損による精子形成への影響の再確認
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水野 聖哉, 森本 健斗, 久野 朗広, 杉山 文博
2. 発表標題 生殖隔離を制御する染色体領域の機能解析に資するセミデザイン型ランダム変異マウス胚性幹細胞ライブラリーの構築
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム令和4年度成果発表会
4. 発表年 2023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
研究分担者	綾部 信哉  (Ayabe Shinya)  (10633563)	国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・専任研究員   (82401)	
研究分担者	久野 朗広  (Kuno Akihiro)  (60830122)	筑波大学・医学医療系・助教   (12102)	

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
---------	---------