

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19236

研究課題名（和文）生殖隔離における精子形成piRNAおよび転写物の分子ダイナミクス

研究課題名（英文）piRNA and spermatogenesis on reproductive isolation

研究代表者

杉山 文博（Fumihito, Sugiyama）

筑波大学・医学医療系・特命教授

研究者番号：90226481

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）：我々は標的ゲノム領域内でランダムで多様な変異を誘導するために、新規手法であるCTRL-Mutagenesisを開発した。様々な組み合わせのsgRNA発現カセットと様々なオンターゲット変異の組み合わせにより、標的ゲノム領域に多様な変異をランダムかつ同時に導入し、87のクローンから成るランダム変異ES細胞クローンライブラリーを構築した。これまでのランダムミュータジェネシス手法では成し得なかった、約70 kbの標的ゲノム領域へもIndel変異だけでなく領域欠失をランダムに導入することのできるCTRL-Mutagenesisが非コードゲノム領域の機能解析研究に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命現象を直接制御するタンパク質自体も重要であるが、その発現パターンを制御するプロモーターやエンハンサーなどのシス制御エレメントやmiRNAクラスターやpiRNA制御ドメインなどの機能エレメントも重要である。標的ゲノム領域内でのランダムミュータジェネシスは有効だが、ENUやジーントラップ法のような一般的なゲノムワイドミュータジェネシスでは、原理的にゲノム領域の欠失や一定の領域内に複数の変異を導入することはほとんどない。本研究で構築したCTRL-Mutagenesisは精子形成piRNAおよび転写物の分子ダイナミクスなどのシス制御エレメントの機能的に重要な領域の決定に貢献する。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel method, CTRL-Mutagenesis, to induce random and diverse mutations within target genomic regions. By combining various combinations of sgRNA expression cassettes and various on-target mutations, we randomly and simultaneously introduced diverse mutations into target genomic regions and constructed a random mutant ES cell clone library consisting of 87 clones. CTRL-Mutagenesis, which can randomly introduce not only Indel mutations but also deletions into a 70 kb target genomic region, is expected to contribute to the functional analysis of non-coding genomic regions, which has not been achieved by conventional random mutagenesis methods.

研究分野：実験動物学

キーワード：ランダムミュータジェネシス

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物多様性を創出する種分化における生殖隔離機構の理解は、獣医学・畜産学・実験動物学を含め生物学において重要な課題である。哺乳類ではハツカネズミ亜種の *Mus musculus musculus* (以下、*Mmm*) と *Mus musculus domesticus* (以下、*Mmd*) の生殖隔離の遺伝学的な研究が、精力的に行われている。*Mmm* である PWD 雌マウスと *Mmd* である C57BL/6 雄マウスの交配から得られる F1 (以下、PCF1) 雄マウスは完全不稔を呈する。(図 1)。一方、親系統の雌雄を交換にした F1 雄マウスは半稔性を呈す。この生殖隔離は 2 つ遺伝座 (*Hst1* と *Hstx2*) に支配されており、*Hst1* の責任遺伝子は *Prdm9* であり、*Hstx2* は未だ同定されていない。この雑種不稔は精子形成における減数分裂障害による。親系統由来の *Prdm9* に起因した非対称の染色体 DNA double-strand break が、相同染色体からの修復に障害や、姉妹染色体を鋳型とした修復を遅れさせ、結果的にシナプシス形成不全そしてアポトーシスへと繋がることと推測されているが、その詳細な分子機構は不明であり、新たな展開が大きく求められている。

2. 研究の目的

減数分裂に関連する分子はここ数十年で数多く同定されてきた。特に最近注目を集めているのが small RNA、なかでも PIWI-interacting RNA (piRNA: 特徴的に生殖細胞で高い発現を示す) である。マウスには MIWI、MILI、MIWI の 3 種類の PIWI タンパクがあり、これらのノックアウトマウスでは精子形成不全が起きることや、piRNA の欠損が精子形成に影響を与えることが報告され始めている。従って、生殖隔離における精子形成異常の分子機構を紐解くためには、タンパク質に翻訳される転写物と同様に、全ゲノム上に散りばめられた多様性に富む piRNA のダイナミクスな理解が重要である。そこで本研究では、*Hstx2* 上に存在する可能性がある 2 つの miRNA クラスターと piRNA 発現に必要な A-Myb 転写因子の結合領域をランダムに欠損させる変異誘導系の確立をを目的とする。

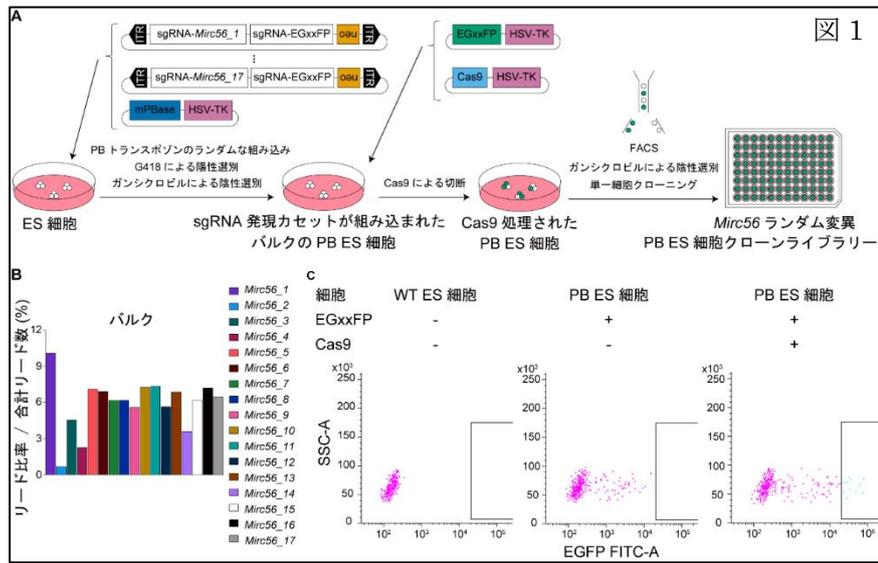
3. 研究の方法

興味のあるゲノム領域 (Region of interest: ROI) 内でランダムかつ多種多様な変異を誘導するために、新規手法である CRISPR & Transposase-based Regional Mutagenesis (CTRL-Mutagenesis) を開発する。ROI 内の各標的配列に対する sgRNA を発現する DNA ベクターライブラリーを、PiggyBac transposase (PBase) を用いて培養細胞の染色体に組み込む。PB トランスポゾンシステムにより、異なる組み合わせの sgRNA 発現カセットが組み込まれた PB ES 細胞を作製する。ROI 内でランダムな変異を誘導するために、様々な sgRNA 発現カセットの組み合わせが組み込まれたバルクの PB ES 細胞を Cas9 で処理する。この Cas9 は、PB ES 細胞内でランダムな組み合わせで組み込まれた sgRNA が指定する標的配列を切断する。同一染色体上の複数箇所が切断されることにより、各切断部位へ Indel 変異が誘導されるか、もしくは切断部位に挟まれた領域全てが欠失する領域欠失が誘導される。したがって、たとえ複数の PB ES 細胞が同一の sgRNA 発現カセットの組み合わせを持っていても、ROI 内で異なる変異が誘導される可能性がある。PB トランスポゾンシステムを介して組み込まれる sgRNA 発現カセットのランダムな組み合わせと、CRISPR-Cas9 によるランダムなオンターゲット変異は、誘導される変異の組み合わせの多様性を向上させる。この Cas9 処理 PB ES 細胞を単一細胞クローニングすることで、ROI ランダム変異 ES 細胞クローンライブラリーを構築する。

4. 研究成果

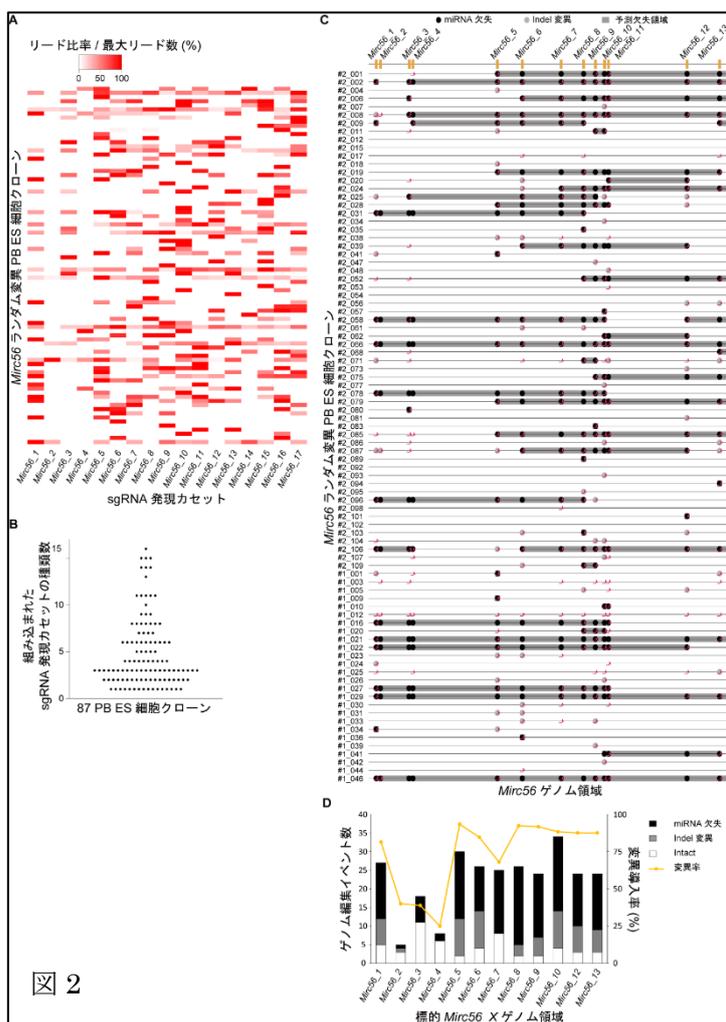
Hstx2 上の 64 kb のゲノム領域内に 17 種類の sgRNA と EGxxFP を標的とする sgRNA をそれぞれ発現するカセットに加え、neo 耐性遺伝子の 3 つの発現カセットを持つ sgRNA ドナーベクターライブラリーを構築した。EGxxFP システムとは EGxxFP を標的とする sgRNA が発現した細胞において、Cas によるベクター配列上の EGxxFP の切断により EGFP が発現することで、CRISPR-Cas システムの活性を報告する仕組みである。2000 ng の sgRNA ドナーベクターライブラリーと mPBase と HSV-TK の発現カセットを持つ 350 ng の mPBase エフェクターベクターを共トランスフェクションした。G418 による陽性選別とガンシクロビルによる陰性選別を行い、mPBase エフェクターベクターが染色体に組み込まれていないバルクの PB ES 細胞を得た (図 1A)。全種類の sgRNA ドナーが ES 細胞の染色体に組み込まれたことを確認するため、バルクの PB ES 細胞由来のゲノム DNA を使用してターゲットアンプリコンのショートリード次世代シーケンシング (short read next generation sequencing: short-read NGS) を行い、染色体に組み込まれた sgRNA 発現カセットをシーケンシングした (図 1B)。ターゲットアンプリコンの short-read NGS によって、全種類の sgRNA 発現カセットが染色体へ組み込まれたことが確認されたが、2 つの標的 (Mirc56_2 および Mirc56_4) の sgRNA 発現カセットのリードカバレッジは最もリードカバレッジが多い Mirc56_1 と比べて、1/15 および 1/5 程度であった。Mirc56 に多種多様な変異をランダムに導入するため、EGxxFP レポーターベクターと Cas9 エディターベクターを共トランスフェクションした (図 1A)。両ベクターは HSV-TK 発現カセットを持つ。Mirc56 変異 ES 細胞を効率的に得るため、CRISPR-Cas

システムの活性を報告するEG_{xx}FPシステムによる陽性選別を行った。陰性選別はガンシクロビルを用いて行った。EG_{xx}FPレポーターベクターだけをトランスフェクションしたPB ES細胞を陰性コントロールとし、EGFP陽性PB ES細胞のみを分取した(図1C)。Cas9エディターベクターおよびEG_{xx}FPレポーターベクターを共トランスフェクションしたPB ES細胞において、PB ES細胞のEGFP陽性率は4.0%であった。その後、単一細胞クローニング中にガンシクロビルを培地に添加し、エディターベクターまたはレポーターベクターが染色体に組み込まれたPB ES細胞を除外し、87の変異クローンから成るランダム変異PB ES細胞クローンライブラリーを得た。



ランダム変異PB ES細胞クローンライブラリーに多様な組み合わせのsgRNA発現カセットが組み込まれたかどうかを確認するため、87クローンで多検体ターゲットアンプリコンのshort-read NGSを実施し(図2A)、3種類以上のsgRNA発現カセットが組み込まれたPB ES細胞クローンでは、同じ組み合わせのsgRNA発現カセットを持つクローンがないことが明らかになった。PB ES細胞クローンの染色体に組み込まれたsgRNA発現カセットの最大種類数は16で、平均は4.7だった(図2B)。ランダム変異PB ES細胞クローンライブラリーに導入された変異を評価し、ほとんどのクローンが異なる変異の組み合わせを持っていることが示唆された(図2C)。同一のsgRNA発現カセットの組み合わせを持つクローン#2_041と#1_034において、異なる組み合わせのIndel変異と領域欠損変異が生じており、同一のsgRNA発現カセットの組み合わせを持っていたとしても、標的領域内で異なる変異が誘導された。なお、導入された変異は染色体に組み込まれたsgRNA発現カセットの組み合わせから期待される変異と一致していた。すなわち、単一のsgRNAはその標的にIndel変異を誘導し、複数のsgRNAは領域欠失を誘導したことが示唆された。また、導入された変異の複雑な組み合わせは、Cas9が同一染色体上で複数の変異イベントを誘導できることを示唆した。さらにCas9により導入されたランダムな変異を評価した(図2D)、各クローンにおいて発現したsgRNAによって標的となるMir56_Xに着目した(図21D)。87クローンで平均して22.6のゲノム領域が標的とされ、各標的の変異誘導頻度はMir56_2およびMir56_4を除いて類似していた。これらの結果は、ほぼ全ての種類のsgRNA発現カセットが同様の頻度で染色体に組み込まれたことを示唆している。各標的の変異率は平均80.4%で、Indel変異もしくは欠失変異を誘導した。これらの結果から、CTRL-Mutagenesisが標的領域内で多種多様な変異を誘導することが示唆された。

同一のsgRNA発現カセットの組み合わせを持っていたとしても、標的領域内で異なる変異が誘導された。なお、導入された変異は染色体に組み込まれたsgRNA発現カセットの組み合わせから期待される変異と一致していた。すなわち、単一のsgRNAはその標的にIndel変異を誘導し、複数のsgRNAは領域欠失を誘導したことが示唆された。また、導入された変異の複雑な組み合わせは、Cas9が同一染色体上で複数の変異イベントを誘導できることを示唆した。さらにCas9により導入されたランダムな変異を評価した(図2D)、各クローンにおいて発現したsgRNAによって標的となるMir56_Xに着目した(図21D)。87クローンで平均して22.6のゲノム領域が標的とされ、各標的の変異誘導頻度はMir56_2およびMir56_4を除いて類似していた。これらの結果は、ほぼ全ての種類のsgRNA発現カセットが同様の頻度で染色体に組み込まれたことを示唆している。各標的の変異率は平均80.4%で、Indel変異もしくは欠失変異を誘導した。これらの結果から、CTRL-Mutagenesisが標的領域内で多種多様な変異を誘導することが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Kento Morimoto, Hayate Suzuki, Akihiro Kuno, Yoko Daitoku, Yoko Tanimoto, Kanako Kato, Kazuya Murata, Fumihiro Sugiyama, Seiya Mizuno	4. 巻 14
2. 論文標題 Regional random mutagenesis driven by multiple sgRNAs and diverse on-target genome editing events to identify functionally important elements in non-coding regions	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Open Biology	6. 最初と最後の頁 240007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsob.240007	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森本 健斗、鈴木 颯、久野 朗広、大徳 陽子、谷本 陽子、加藤 花名子、村田 知弥、杉山 文博、水野 聖哉
2. 発表標題 Construction of random mESC mutant library revealing polygenic miRNAs that regulate spermatogenesis.
3. 学会等名 36th International Mammalian Genome Conference（国際学会）
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	村田 知弥 (Murata Kazuya) (60713485)	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
---------	---------