

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770005

研究課題名(和文)細胞工学的アプローチによる脆弱エックス症候群のリピート不安定化モデル系の構築

研究課題名(英文) Construction of cell-culture based assay system to understand CGG repeat instability in Fragile X syndrome

研究代表者

中山 祐二 (NAKAYAMA, Yuji)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・助教

研究者番号：40432603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：脆弱X症候群の原因遺伝子FMR1の非翻訳領域内に存在するCGGリピートは、保因者からの母性伝搬に際して不安定化し、多くの場合伸長して、やがて発症する。このCGGリピート不安定化のメカニズムは未知のままであり、リピートの不安定化こそがFXSの根本的病因である。本研究では、CGGリピートを含むヒト染色体およびヒト人工染色体を保持する培養細胞を樹立し、CGGリピートの不安定化に働く分子メカニズムを解析するためのシステムの構築を行った。

研究成果の概要(英文)：The human Fragile X mental retardation 1 (FMR1) gene, which contains CGG-trinucleotide repeat in its 5'UTR region, is responsible gene for Fragile X syndrome (FXS). The number of CGG-repeat is about 50 to 200 in carriers (so-called 'premutation allele') and more in patients. CGG-repeat becomes unstable and in most cases expands upon maternal inheritance of premutation allele to children. However, the mechanism underlying CGG-repeat instability is unknown to date. In the present study, toward elucidation the molecular and cellular mechanism in CGG-repeat instability, we tried to establish a cell culture-based system that enables to reproduce CGG-repeat instability in vitro. We applied chromosomal engineering so that we could clone and handle CGG-repeat tract as a chromosomal domain stably. We successfully cloned natural and artificial chromosomes that contain varying size of CGG-repeats in rodent cell lines.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 遺伝・ゲノム動態

キーワード：脆弱X症候群 トリプレットリピート 染色体工学 細胞融合

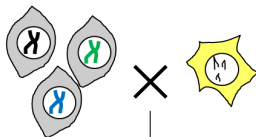
## 1. 研究開始当初の背景

FXS は、最も高頻度に認められる家族性の精神遅滞疾患であり、その原因は X 染色体長腕 Xq27 領域に存在する FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1) 遺伝子の発現抑制である。FMR1 遺伝子の 5' UTR (非翻訳領域) に存在する CGG リピートが 200 コピー以上へ伸長すると、それに伴って CGG リピートおよび FMR1 遺伝子プロモーター領域内のシトシンのメチル化が高度に起こり、FMR1 遺伝子が不活性化する。CGG リピート不安定性のメカニズムを解析することは、FXS の根本的病因解明につながることであり、診断や治療にとって重要である。しかし、どのようなメカニズムでリピートの伸長が起き、遺伝子の不活性化が起きるのかは明らかにされていない。

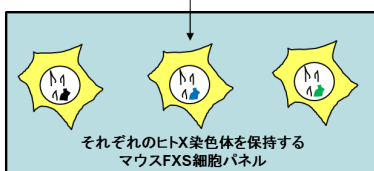
FXS の CGG リピートの不安定化メカニズムの研究が進まない要因として、通常の遺伝子クローニングの技術では CGG リピートを安定にクローニングして解析する系が構築できないためである。そこで我々は CGG リピートを単なる DNA 配列として取り扱うのではなく、ある特定の制御下にある染色体領域として捉えることが鍵であると考え、染色体工学技術を適用し、CGG リピートを含むヒト X 染色体をそのまま取り扱うようにした。その結果、ヒトの正常、保因者、患者由来の X 染色体を独立して、安定に保持するマウス細胞株のセットを樹立に成功した(以下、マウス FXS 細胞パネル、未発表)。マウス FXS 細胞パネルの中では、リピートの長さ、メチル化の状態、それに伴ったヒト様の FMR1 の発現パターンが確認された。

### マウスFXS細胞パネルの作成

ヒト線維芽細胞株(米国CCRより購入)と  
マウス細胞(黄色)との細胞融合  
(X染色体を、正常:黒、保因者:青、患者:緑、で示す)



得られた融合細胞をドナーとした染色体移入



## 2. 研究の目的

本研究は、マウス FXS 細胞パネルを活用した発展研究であり、CGG リピートの不安定化

を再現できる培養系の構築を目的とした。また、CGG リピートに結合し、CGG リピートの動態を制御している因子を同定することを目的として、ヒト人工染色体 (HAC: Human Artificial Chromosome) ベクターに種々の長さの CGG リピートを組み込んだものを構築した。さらに、マウス FXS 細胞パネルに含まれている完全長のヒト X 染色体を出発資材として、近年、目覚ましい進歩がなされているゲノム編集技術を適用して、CGG リピートを含む染色体脆弱部位だけを人工染色体にクローニングする試みも、新たな取り組みとして進めた。

## 3. 研究の方法

FXS では主として母性伝搬時に CGG リピートが不安定化することから、リピート不安定化の時期は、生殖系列細胞期あるいは胚性期である。この環境を培養系で模倣し、CGG リピートの不安定化を再現するために、自然のヒト X 染色体そのものを利用する系(方法 ) と、CGG リピートに関わるとされる FMR1 遺伝子座領域を最小限に含む人工染色体を利用する系の構築(方法 - 1)を目指した。また、本研究では、伸長した CGG リピートが患者であっても体細胞では比較的安定に保たれていることに着目して、CGG リピートに結合して、CGG リピートの安定化を担うような因子、CGG リピート動態の制御に関わる鍵分子があると考え、CGG 結合因子の探索への応用を目指すための CGG-HAC の構築を試みた(方法 - 2)。これは、我々が現在までに開発してきた、特定の配列を持つヒト人工染色体を、そこに結合する因子と共に巨大なクロマチン複合体として免疫沈降して回収し、質量分析によって網羅的に解析するプロテオミクスの技術 ChIP (Chromosome Immunoprecipitation) 法を適用するためである。さらに、近年開発が爆発的に進んでいるゲノム編集技術を応用して、自然染色体の脆弱部位の人工染色体へのクローニングに取り組んでいる(方法 - 3)

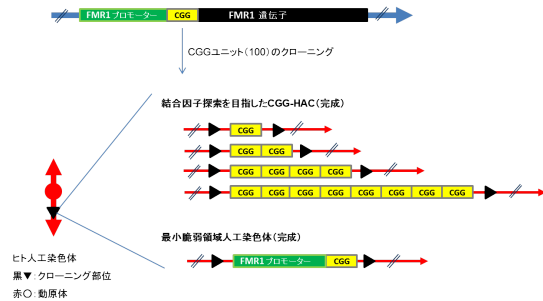
## 4. 研究成果

(1) (研究の方法欄の方法 に対応)培養系における CGG リピートの不安定化の惹起には、CGG リピートを染色体領域ごとに取り扱い、初期発生期に近い状態に置くことが理想的である。当初、本研究においては、マウス ES 細胞あるいはマウスの EG 細胞をヒト保因者由来の体細胞または樹立したマウス FXS 細胞パネル株と細胞融合することで初期発生期の環境を再現しようとした。しかし、細胞融合の効率が 1% 以下程度と

悪く（フローサイトメトリーにより解析）解析に使用できる融合細胞をクローニングすることが難しかったため、ヒト X 染色体の導入という方法論を試みた。保因者由来のヒト X 染色体をマウス ES 細胞に染色体導入した結果、選択培養で生存するクローンが得られたものの、FMR1 遺伝子領域を含めて、ヒト X 染色体の大部分が脱落していた。脆弱部位が染色体の安定性そのものに関わり、FXS 患者細胞の中では染色体異常があるという臨床症例報告もあるが、原因を特定することはできなかった。加えて、ヒト X 染色体の導入効率も常染色体のケースに比べて著しく低かったため、ヒト X 染色体全体を利用して解析系を構築する方法は中止した。自然染色体に近い状態であるほど、自然の「脆弱部位」の性質・制御下に近いはずであるため、ゲノム編集技術の台頭とともに方法 3（後述）の着想に至った。

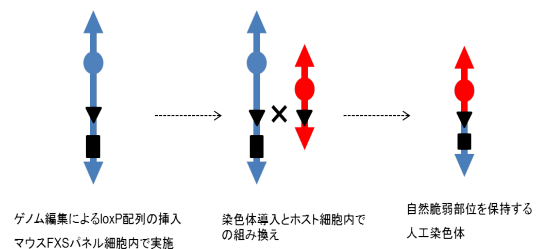
(2) (研究の方法欄の方法 - 2、- 1 に対応) ヒト人工染色体はヒト 21 番染色体の余分な遺伝子をすべて削除して作成された染色体ベクターであり、本研究では 2 種類の人工染色体の作成に成功した。一つ目として、ChrIP 法を用いて CGG リピートに結合する因子を同定するために、保因者由来 (CGG) 100 リピートを 1 単位として、1, 2, 4, 8 個タンDEM (直列化) したものを含む人工染色体 (CGG-HAC) を構築した。保因者由来の CGG リピート 1 単位 (約 100 リピート) は臨床診断にも使用される確立した PCR 法によって増幅し、それぞれの 1 単位リピートの間にリンカー配列を入れることで、タンDEM化したリピート全体の安定性が向上し、クローニングができたと考えられる。さらに、2 つ目として、保因者由来の CGG リピートと FMR1 プロモーター領域を含む最小脆弱領域人工染色体の構築を完了した。FXS では CGG リピートの不安定化に伴い、シトシンのメチル化、遺伝子発現の抑制と種々のエピジェネティックなイベントが連続的、あるいは同時的に起こるとされている。これらが起きる領域は、必ずしもヒト X 染色体全体ではなく、FMR1 プロモーターとリピートを含む数 10kb であるという報告があり、本人工染色体はその最小ユニットをクローニングして人工染色体上に組み込んだものである。これら CGG-HAC は CHQ (Chinese Hamster Ovary cell line) 細胞内で構築されており、染色体導入法により種々の細胞に導入可能である。

保因者由来の脆弱部位の模式図と作成した人工染色体  
FMR1 プロモーター (約 5kb; 緑色) と CGG (約 100 リピート; 黄色) と FMR1 遺伝子 (黒)



(研究の方法欄の方法 - 3 に対応) 3 つ目は、自然のままの脆弱部位をそのまま人工染色体に搭載する試みであり、ゲノム編集技術を利用する。上述のマウス FXS 細胞パネルを出発材料とし、CGG リピート上流 50kb 領域に転座組み換え型クローニングに利用する loxP 配列を挿入した。loxP を挿入したヒト X 染色体を空の人工染色体を保持する細胞に移入 (または細胞融合し) Cre 酵素を働かせることにより、人工染色体にクローニングされる (未実施)。本人工染色体は方法 と のそれぞれの問題点を克服できる。すなわち、自然の染色体脆弱部位 (断片) であるため、細胞内での CGG リピートの制御および動態が生理的条件に近い形で行われることが期待できる。さらに、人工染色体の活用により、ヒト X 染色体全体よりもサイズが小さいため、染色体導入時の染色体異常等のリスクが低減する上、導入効率は自然染色体の場合よりも高いことが期待できる。本資材は、将来的に染色体導入マウスの作成を通して、ヒト脆弱部位の CGG リピート動態の in vivo (生体内) 解析系につながることを期待できる。その際、FXS では染色体の子孫伝搬が重要である (上述) ため、子孫伝搬の効率を考えると、サイズの小さい人工染色体は有利と考えられる。

自然脆弱部位の人工染色体への搭載の試み



本研究では、脆弱部位または CGG リピートの制御に関わっていると思われる領域全体を染色体工学を用いて取り扱うことにより、CGG リピート不安定化の解析システムを構築するための統合的な資材を作成するに至っ

た。FSX での CGG リピート研究はヒトでのリピート動態を反映する適切なマウスモデルがなく、ヒト染色体領域としての「脆弱部位全体」を取扱い、解析することの重要性は指摘されてきた。本研究はその点に関して、技術的突破口を確証するものである。しかし、現在までに確立してきた染色体工学操作を適用するにあたり、常染色体の取扱いに比べて、自然のヒト X 染色体では操作過程での染色体全体の不安定性が低いことが研究進展の支障になった。脆弱部位が直接影響している可能性も否定できないが、今後、染色体導入法においても、改善のための基礎的な研究が必要である。また、人工染色体を用いて、人工的な最小脆弱部位を構築できたのは本研究での大きな成果である。しかし、この人工染色体を用いたリピート動態が、生理的条件下でのリピートの動態制御をどこまで反映しているかという問題は、自然のままの脆弱部位をクローニングして、しかるべき宿主細胞内、あるいは上述のようにマウス個体での実験をして比較するしか答えは出ない。本研究は、完成にはいたらなかったものの、今後、ゲノム編集などの有用技術をうまく組み合わせれば、どのような部位でもクローニングし、人工染色体を用いた機能解析に展開できる可能性を示した。これを実証するためにも本研究をもとにして、CGG リピートの制御機構の解明に向けた発展研究を進めていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

該当なし

〔学会発表〕(計 2 件)

1 :

砂村直洋、中山祐二、荻野由香加利、難波栄二、押村光雄、久郷裕之  
染色体免疫沈降法 (ChIP) を用いた疾患関連リピート配列に結合する因子の探索

第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月  
11 日 ~ 14 日 於 福岡国際会議場

2 :

荻野由香加利、中山祐二、松森はるか、田中伸幸、押村光雄、難波栄二、井上敏昭  
複数の遺伝子搭載が可能な人工染色体ベクターの構築

第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月  
11 日 ~ 14 日 於 福岡国際会議場

〔その他〕

ホームページ等  
生命機能研究支援センター  
<http://grc1.med.tottori-u.ac.jp/seimei/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 祐二 (NAKAYAMA Yuji)  
鳥取大学・生命機能研究支援センター・  
助教  
研究者番号 : 40432603