

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640052

研究課題名(和文)染色体特異的にクラスターを形成しているトラップジーン(CSCT)の解析

研究課題名(英文)Functional analysis of chromosome specific clustered trap region (CSCT).

研究代表者

荒木 正健 (ARAKI, MASATAKE)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授

研究者番号：80271609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は染色体特異的にクラスターを形成しているトラップ領域(CSCT)を発見した。ゲノム編集技術を用いてCSCT13領域全体(1.6 Mbp)を欠損したクローン(CSCT13)を得ることができ、このES細胞からマウスラインを樹立することができた。ホモ接合体同士の交配で得られる産仔は極端に少なく、また、減数分裂時の染色体相同組換えへの影響評価を行ったところ、1Mbpあたりの組換え率は、CSCT13を欠損すると、CSCT13を含む領域では減少し、その周辺の領域では上昇した。
本研究より、CSCT13は初期発生及び減数分裂時の染色体相同組換えに関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found new genome element, CSCT (Chromosome Specific Clustered Trap region). Using CRISPR/Cas9 system, CSCT13 region (1.6 Mbp) was deleted in the mouse ES cells (CSCT13 KO). We could establish CSCT13 KO mouse line. Mating between homozygotes gave relatively small number of pups. Moreover, CSCT13 KO mice showed comparatively low rate of homologous recombination during meiosis for the region corresponding to CSCT13. On the other hand, outside of this region showed up-regulation of homologous recombination during meiosis. This study suggest that CSCT13 might be related with the early embryogenesis and homologous recombination during meiosis.

研究分野：実験動物学

キーワード：遺伝子トラップ CSCT EGTC ゲノム編集 染色体相同組換え 減数分裂

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、『可変型遺伝子トラップ法』を開発し、データベース『EGTC』を全世界に公開している。トラップした遺伝子を同定するために5'-RACEを行い、UCSC Genome Browser等を利用してアノテーションを行っている。2012年9月末の時点で1,067クローンを登録しているが、そのうち952クローン(89.2%)は既知遺伝子をトラップしており、ESTの情報しかない物(EST)が52クローン(4.9%)、ESTも報告されていない新規遺伝子(New)が63クローン(5.9%)である。このESTとNewの中に、染色体特異的にクラスターを形成している新規遺伝子(Chromosome Specific Clustered Trap region: CSCT)が含まれていた。プロモータートラップシステムなので、これらのクラスター遺伝子は少なくともES細胞で発現していることになる。EGTCに登録しているCSCTをトラップしているクローンは27クローンあり、染色体順にCSCT2, CSCT4, CSCT12, CSCT13が存在する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、染色体特異的にクラスターを形成しているトラップ遺伝子に関して、クラスター全体を欠損したES細胞を作製してinvitroの解析を行うと同時に、キメラマウスを作製してノックアウトマウスラインを樹立し、個体レベルの表現型解析を行い、これらの新しい遺伝子群の生理機能を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 本予算申請時には、CSCT13領域の上流にloxP配列をノックインするためのベクター(loxpA)と、下流にloxP配列をノックインするためのベクター(loxpB)を、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子を用いて作製し、2回のジーンターゲティングでCSCT13領域をfloxedし、その後Creを作用させてCSCT13領域のノックアウトを行う予定であった。しかしながら、急激に進化したゲノム編集技術を用いることで、大幅にスピードアップすることができた。

(2) EGTCクローンであるAyu21-B145(CSCT13)に焦点を絞って解析することにした。CSCT13はマウス13番染色体上の約1.6Mbpの範囲にすべて収まっているので、その上流(1107bp)と下流(1402bp)にアームを設定し、neoカセットを含むノックインベクターを構築した。

(3) ゲノム編集を行うために、nickaseとして機能する変異型Cas9D10Aを発現するpX335を使用した。Cas9D10Aは1本鎖のみを切断しニックを入れるため、DSBにより引き起こされる非相対末端連結(NHEJ)が起こりにくく、望ましくない領域での遺伝子欠損・挿入やオフターゲット効果を抑制することができる。sgRNAの設計は、主に

sgRNAの特異性を予測するCRISPR directと、主にsgRNAの効率を予測するDesign sgRNAを用いて行った。CSCT13領域の上流側と下流側のアームの中に、それぞれsgRNAを設定した。

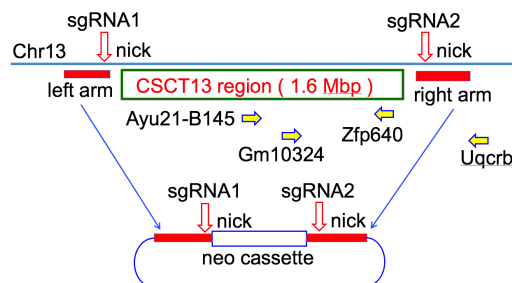


Fig.1 Schema of knock-in vector.

4. 研究成果

(1) C57BL/6由来の6NK-7 ES細胞に、sgRNAを含むpX335とノックインベクターを導入し、G418耐性コロニー48個をピックアップした。PCR、シーケンス及びサザンで、その中の1個においてCSCT13領域全体の欠損に成功していることを確認した。このES細胞株からキメラマウスを作成し、CSCT13マウスラインを樹立した。

(2) CSCT13領域内外に存在する遺伝子のC57BL/6アダルトマウスにおける発現をRT-PCRで解析した。Ayu21-B145がトラップしたEST(CNB836387)は精巣と胎盤のみに発現していた。CSCT13内の遺伝子であるZfp640も精巣と胎盤で発現しており、Gm10324は胸腺、脾臓、精巣、卵巣・胎盤で発現していた。CSCT13領域の外側に位置するUqcrbは全身で発現していた。

(3) CSCT13ヘテロ接合体同士の交配で得られた産仔の遺伝型を解析したところ、ほぼメンデル則に従ってホモ接合体が生まれ、一見して分かる異常は観察されなかった。しかしながら、ホモ接合体同士の交配で得られる産仔は極端に少なかった。

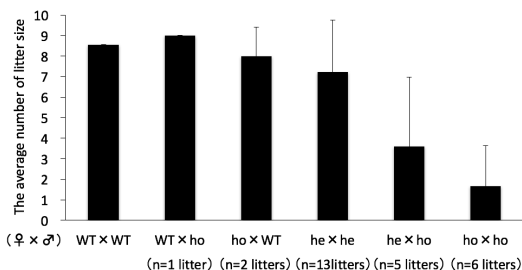


Fig.2 The average litter size. Result of WT x WT is that of reproduction study about C57BL/6NJcl in CLEA Japan.

(4) 生後11週齢の雄マウスのmRNAを抽出し、RT-PCRを行った。CSCT13領域内に存在するCNB836387, Zfp640及びGm10324の発現量は、CSCT13ヘテロ接合体では野生型マウスの約半分に減少し、CSCT13ホモ接合体では発現が消失していることを確認し

た。また、CSCT13領域に隣接しているUqcrb遺伝子の発現量は、CSCT13領域を欠損しても全く影響を受けなかった。

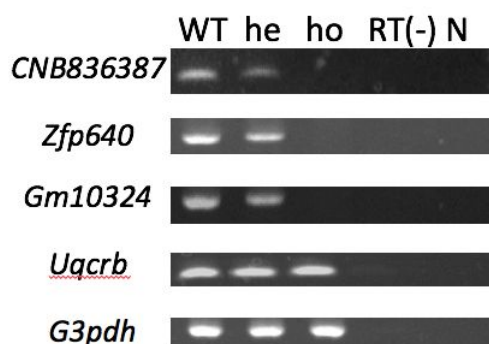


Fig.3 Confirmation of null allele.

(5) 減数分裂時の染色体相同組換えへの影響評価を行ったところ、1Mbpあたりの組換え率は、CSCT13を欠損すると、CSCT13を含む領域では減少し、その周辺の領域では上昇した。

(6) 本研究より、CSCT13は初期発生及び減数分裂時の染色体相同組換えに関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計19件)

- (1) Vanhoutteghem, A., Delhomme, B., Herve, F., Nondier, I., Petit, J. M., Araki, M., Araki, K. and Djian, P., The importance of basonuclin 2 in adult mice and its relation to basonuclin 1. *Mech. Dev.*, Feb 29, 1-21 (2016). 査読有り
- (2) Nakakura, S., Matsui, M., Sato, A., Ishii, M., Endo, K., Muragishi, S., Murase, M., Kito, H., Niguma, H., Kurokawa, N., Fujii, M., Araki, M., Araki, K. and Ohya, S., Pathophysiological significance of the two-pore domain K⁺ channel K2P5.1 in splenic CD4⁺CD25⁻ T cell subset from a chemically-induced murine inflammatory bowel disease model. *Front. Physiol.*, 6, 299(2015). 査読有り
- (3) Camarena, V., Cao, L., Abad, C., Abrams, A., Toledo, Y., Araki, K., Araki, M., Walz, K. and Young, J. I., Disruption of Mbd5 in mice causes neuronal functional deficits and neurobehavioral abnormalities consistent with 2q23.1 microdeletion syndrome. *EMBO Molecular Medicine*, 6, 1003-1015 (2014). 査読有り
- (4) Lu, J., He, L., Behrends, C., Araki, M., Araki, K., Jun Wang, Q., Catanzaro, J. M., Friedman, S. L., Zong, W. X., Fiel, M. I., Li, M. and Yue, Z., NRBF2 regulates

autophagy and prevents liver injury by modulating Atg14L-linked phosphatidylinositol-3 kinase III activity. *Nat. Commun.*, 5, 3920 (2014). 査読有り

(5) Mishima, E., Araki, M., Araki, K. (33人省略, 10, 11番目), Conformational Change in Transfer RNA Is an Early Indicator of Acute Cellular Damage. *J. Am. Soc. Nephrology*, 25 (10), 2316-2326 (2014). 査読有り

(6) Schneppenheim, J., Huttli, S., Mentrup, T., Lullmann-Rauch, R., Rothaug, M., Engelke, M., Dittmann, K., Dressel, R., Araki, M., Araki, K., Wienands, L., Fluhrer, R., Saftig, P. and Schroder, B., The intramembrane proteases Signal-peptide-peptidase-like 2a and b (SPPL2a/b) have distinct functions in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, 34 (8), 1398-1411 (2014). 査読有り

(7) Araki, M., Nakahara, M., Muta, M., Itou, M., Yanai, C., Yamazoe, F., Miyake, M., Morita, A., Araki, M., Okamoto, Y., Nakagata, N., Yoshinobu, K., Yamamura, K. and Araki, K., Database for exchangeable gene trap clones: Pathway and gene ontology analysis of exchangeable gene trap clone mouse lines. *Dev. Growth Differ.*, 56 (2), 161-174 (2014). 査読有り

(8) Nam, G., Lee, Y. K., Lee, H. Y., Ma, M. J., Araki, M., Araki, K., Lee, S., Lee, I. S. and Choi, E. Y., Interaction of CD99 with its paralog CD99L2 positively regulates CD99L2 trafficking to cell surfaces. *J. Immunology*, 191 (11), 5730-5742 (2013). 査読有り

(9) Cid, L. P., Roa-Rojas, H. A., Niemeyer, M. I., Gonzalez, W., Araki, M., Araki, K. and Sepulveda, F. Z., TASK-2: a K^{2P} K(+) channel with complex regulation and diverse physiological functions. *Frontiers in Physiology*, 4, 198 (2013). 査読有り

(10) Kappei, D., Butter, F., Benda, C., Scheibe, M., Draskovic, I., Stevense, M., Novo, C. L., Basquin, C., Araki, M., Araki, K., Krastev, D. B., Kittler, R., Jessberger, R., Londono-Vallejo, J. A., Mann, M. and Buchholz, F., HOTA1 is a mammalian direct telomere repeat-binding protein contributing to telomerase recruitment. *EMBO J.*, 32 (12), 1681-1701 (2013). 査読有り

(11) Nakahara, M., Tateyama, H., Araki, M., Nakagata, N., Yamamura, K. and Araki, K., Gene-trap mutagenesis using Mol/MSM-1 embryonic stem cells from

MSM/Ms mice. Mamm. Genome, 24 (5-6), 228-239 (2013). 査読有り

〔学会発表〕(計40件)

- (1) 武田伊世、他：「染色体特異的にクラスターを形成しているトラップ領域(CSCT13)の解析」第29回モロシヌス研究会、2015年7月3日～4日、かんぼの宿 有馬(兵庫県神戸市)。
- (2) 荒木美幸、他：「Cre driver マウスラインの樹立と解析」第29回モロシヌス研究会、2015年7月3日～4日、かんぼの宿 有馬(兵庫県神戸市)。
- (3) 中原舞、他：「日本の野生マウス系統MSM/Ms由来のES細胞を用いた遺伝子トラップによるミュタジェネシス」第29回モロシヌス研究会、2015年7月3日～4日、かんぼの宿 有馬(兵庫県神戸市)。
- (4) 伊東春香、他：「内在性遺伝子座でLincRNA-p21を過剰発現させたマウスは糖尿病を呈する」第29回モロシヌス研究会、2015年7月3日～4日、かんぼの宿 有馬(兵庫県神戸市)。
- (5) 古畑理樹、他：「p53により誘導されるLincRNA-p21の炎症における機能」第29回モロシヌス研究会、2015年7月3日～4日、かんぼの宿 有馬(兵庫県神戸市)。
- (6) Nakahara, M., et al.: Gene-trap mutagenesis is useful for analysis of long intergenic non-coding RNA genes. The 29th Annual Conference of the International Mammalian Genome Society. 2015年11月8日～11日、横浜市開港記念会館(神奈川県横浜市)。
- (7) Furuhashi, R., et al.: Correlation of LincRNA-p21 and p53 expression in the LincRNA-p21 gene trap mouse. The 29th Annual Conference of the International Mammalian Genome Society. 2015年11月8日～11日、横浜市開港記念会館(神奈川県横浜市)。
- (8) Nakamura, S., et al.: Construction of a novel gene library related to osteogenic disorder using exchangeable gene trap mutagenesis. Australian New Zealand Bone & Mineral Society Annual Scientific Meeting 2015. 2015年11月1日～4日、Hotel Grand Chancellor Hobart (Tasmania, Australia)。
- (9) 吉信公美子、他：「LincRNAの生体内機能解析～遺伝子トラップマウスからのアプローチ～」第38回日本分子生物学会年会、2015年12月1日～4日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)。
- (10) 荒木喜美、他：「Danforth's short tail (Sd) 変異はトランスポゾン挿入によって引き起こされたPtf1a遺伝子の異所性発現が原因である」日本遺伝学会第87回大会、2015年9月24日～26日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)。

- (11) 荒木正健、他：「遺伝子トラップマウスを用いたlincRNAの生体内機能解析」第62回日本実験動物学会総会、2015年5月28日～30日、京都テルサ(京都府京都市)。
- (12) 荒木正健、他：「可変型遺伝子トラップクローンデータベース[EGTC]の開発と解析」第61回日本実験動物学会総会、2014年5月15日～17日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)。
- (13) 宮家幹子、他：「遺伝子トラップマウスを用いたlincRNAの生体内機能解析」第28回モロシヌス研究会、2014年6月27日～28日、修善寺総合会館(静岡県伊豆市)。
- (14) 森田彩香、他：「Establishment and analysis of Cre-driver mouse line.」第28回モロシヌス研究会、2014年6月27日～28日、修善寺総合会館(静岡県伊豆市)。
- (15) 荒木正健、他：「可変型遺伝子トラップマウスラインのパスウェイ解析及びジーンオントロジー解析」日本遺伝学会第86回大会、2014年9月17日～19日、長浜バイオ大学(滋賀県長浜市)。
- (16) 荒木喜美、他：「CRISPR/Cas9による2本鎖切断・1本鎖切断を利用した場合のマウスES細胞における相同組換え効率の比較」第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日～27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)。
- (17) 荒木喜美、他：「可変型遺伝子トラップクローンを利用したCre-driverマウスの作製」第60回日本実験動物学会総会、2013年5月15日～17日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)。
- (18) 柳井千佳、他：「Analysis of gene-trap mouse lines trapping long non-coding RNA genes. (Part 1)」第27回モロシヌス研究会、2013年6月28日～29日、筑波山 江戸家(茨城県つくば市)。
- (19) 山添史雅、他：「Analysis of gene-trap mouse lines trapping long non-coding RNA genes. (Part 2)」第27回モロシヌス研究会、2013年6月28日～29日、筑波山 江戸家(茨城県つくば市)。
- (20) 中原舞、他：「遺伝子トラップマウスを用いたlincRNAの機能解析」第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日～6日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)。
- (21) 吉信公美子、他：「可変型遺伝子トラップクローンの進展」第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日～6日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)。

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称：マウス系統を樹立する方法
発明者：荒木正健、荒木喜美
権利者：熊本大学
種類：特許
番号：特願2012-531892

出願年月日：平成 23 年 8 月 30 日
特許査定日：平成 28 年 4 月 11 日
国内外の別： 国内

取得状況（計 1 件）

名称：マウス系統を樹立する方法
発明者：荒木正健、荒木喜美
権利者：熊本大学
種類：米国特許
番号：US 9,167,805
取得年月日：2015 年 10 月 27 日
国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等
EGTC; Database for the Exchangeable Gene
Trap Clones
<http://egtc.jp>

GTC; Gene Technology Center
<http://gtc.egtc.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 正健 (ARAKI, Masatake)
熊本大学・生命資源研究・支援センター・
准教授
研究者番号：8 0 2 7 1 6 0 9

(2) 研究分担者

荒木 喜美 (ARAKI, Kimi)
熊本大学・生命資源研究・支援センター・
教授
研究者番号：9 0 2 1 1 7 0 5

(3) 研究協力者

吉信 公美子 (YOSHINOBU, Kumiko)
熊本大学・生命資源研究・支援センター・
助教
研究者番号：2 0 2 7 4 7 3 0