

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26640124

研究課題名(和文)マウスハプロイドES細胞を利用した合成救出システムの構築

研究課題名(英文)Generation of synthetic rescue system in murine haploid ES cells.

研究代表者

竹田 潤二 (Takeda, Junji)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50163407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ハプロイドES細胞をホストとして使用するため効率のよい遺伝子ターゲティング法を開発した。

最近のCRISPR/gRNAは両アレル遺伝子を同時に破壊することが可能になったので、通常のディプロイドES細胞を用いる合成救出法もトライした。1つめの遺伝子Oct4をコンディショナルアレルへ変換し、次にCRISPR/gRNAライブラリーを導入し、2つめの遺伝子をランダムに破壊した。そして、タモキシフェンによりCreを活性化し、1つめの遺伝子を破壊し、分化せずに残存したクローンの解析を行った。現在さらに詳細な解析を進めているところである。

研究成果の概要(英文)：We performed experiments to generate a novel synthetic rescue system in murine haploid ES cells. For conditional KO system in haploid ES cells, we first tried to insert tamoxifen-inducible cassette, ERT2-iCre-ERT2 into the Rosa 26 locus. Since homologous targeting in haploid ES cells was very low, we used ZFN for the targeting.

Meanwhile, production of CRISPR-gRNA library has been reported. The library is able to disrupt both alleles of a gene of interest.

We modified both alleles of Oct4 to floxed ones and we introduced CRISPR-gRNA library to disrupt endogenous genes randomly. After disruption of Oct4 by activation of Cre with tamoxifen. We isolated undifferentiated clones. We are analyzing these clones right now.

研究分野：分子生物学、発生工学

キーワード：ゲノムワイド関連解析 ハプロイドES細胞

1. 研究開始当初の背景

研究代表者である竹田は、これまでトランスポゾンシステムを利用したマウス、ラット個体あるいはマウス ES 細胞でのミュータジェネシスという領域で論文を発表して来た(Horie et al. *PNAS* 2001, Horie et al. *MCB* 2003, Yusa et al. *MCB* 2004, Keng et al. *Nat. Methods* 2005, Yae et al. *MCB* 2006, Ikeda et al. *MCB* 2007, Kitada et al. *Nat. Methods* 2007, Takeda et al. *Genome Biol.* 2007, Kokubu et al. *Nat. Genetics* 2009, Horie et al. *Nat. Methods* 2011)。これらの論文で示してきた事は、個体内あるいはマウス ES 細胞においてトランスポゾンが遺伝子破壊を起こす変異原として非常に有用なツールになり得る事である。本研究課題では、これまで培ってきた変異原としてのトランスポゾンを用いてマウスハプロイド ES 細胞に導入するシステムを構築する。通常、変異原を用いて遺伝子破壊(片アレル変異)を行っても、正常なアレルが存在するため、多くの場合表現型が出現しない。申請者は、ES 細胞で効率よく片アレル変異から両アレル変異に移行できるシステムの構築に成功している(Yusa et al. *Nature* 2004, Horie et al. *Nat. Methods* 2011, Yamanishi et al. *Genome Res.* 2013)。

本研究課題で用いる ES 細胞はハプロイド(M.Leeb, A.Wutz, *Nature* 2011)なので変異を一度導入するだけで、直ちに遺伝子機能解析ができる特徴があり、片アレル変異導入だけで遺伝子機能解析を行うことができる。

2. 研究の目的

本研究課題は、哺乳動物の複雑な生物学的経路を、遺伝学的に解析するため、**遺伝子を複数同時に変異させ、表現型解析できるシステム**を新たに構築する。酵母において、複数の遺伝子を同時に欠損させ、表現型を解析するシステムは Synthetic lethal (合成致死)あるいは Synthetic rescue(合成救出)と呼ばれ、多大な成功を収めている。しかし、酵母は分化しないので分化機構を解析するには不向きである。そこで、**この合成救出システムを最近樹立された分化誘導可能なハプロイド ES 細胞に導入し、これまで解析が困難であった細胞の分化機構解明につながる新しい遺伝子機能解析手段**を手に入れることを目的とする。

3. 研究の方法

(1.) ハプロイド ES 細胞の ROSA26 遺伝子座へ ERT2-iCre-ERT2 遺伝子の挿入(後に1つ目の遺伝子をタモキシフェン依存的に破壊するため)

- (2.) 1つ目の遺伝子をコンディショナルアレルへ変換
- (3.) PiggyBac トランスポゾンあるいは CRISPR-gRNA ライブラリーにより2つ目の遺伝子をランダムに変異
- (4.) タモキシフェンにより Cre を活性化し、1つ目の遺伝子を破壊
- (5.) 残存したクローンの PiggyBac トランスポゾン挿入部位あるいは gRNA の配列の解析
- (6.) 2つ目に破壊された遺伝子群の Validation

最近、CRISPR-gRNA も両アレルを同時に破壊することが可能になったので、ハプロイド ES 細胞だけではなく、通常のディプロイド ES 細胞も実験に供する。

効率よくコンディショナルアレルに変換する手法の開発

複数の遺伝子をトライする必要があるので、簡便にコンディショナルアレルを作製できるシステムを構築する。そのためには、ハプロイド ES 細胞において効率よく相同組み換えを起こす必要がある。

これまでに判明したことは通常のディプロイド ES 細胞に比べ、ターゲティングの効率が圧倒的に低いことであった。そこでゲノムに特異的に DNA 二重鎖切断を引き起こす ZFN とターゲティングベクター(ERT2-iCre-ERT2)を同時に ROSA26 遺伝子座に対してトランスフェクトした。すると通常では得られない相同組み換え体の獲得に成功した。つまりハプロイド ES 細胞は相同組み換えの効率が非常に低いので ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 のような特異的 DNA 二重鎖切断を起こすことのできるツールとともにトランスフェクトし、相同組み換え体を得る必要があることが判明した。

1つ目の遺伝子をコンディショナルアレルに変換

ここでは、1つ目の遺伝子として Oct4 を選択する。Oct4 は遺伝子欠損を起こすと ES 細胞は未分化性を維持できない。そこで本研究課題においては、Oct4 遺伝子のエクソンを loxP 配列で挟み込む。そのために CRISPR/Cas9 システムを利用する。CRISPR/Cas9 システムは、効率は良いのであるが、オフターゲットが多数存在すると考えられるので、最終的に同定した遺伝子の validation が重要になる(後述)。

2つ目の遺伝子を PiggyBac トランスポゾンあるいは CRISPR-gRNA ライブラリー導入によりランダムに変異を導入

2つ目の変異原である PiggyBac トランスポゾンベクターを導入する前に、ディプロイド ES 細胞を FACS により除去する。このディプロイド ES 細胞を除去する過程は非常に重要である。なぜならハプロイド ES 細胞は培養時に自然にディプロイド化してしまう傾向があるからである。FACS Aria™ は、大阪大学医学系研究科附属共同研究実習センターに設置されているので、使用した。

ディプロイド ES 細胞に Cas9 を発現させる。次に Cas9 を発現した ES 細胞と Cas9 を発現していない ES 細胞に CRISPR-gRNA ライブラリーを同じ moi で感染させ、感染が成立した ES 細胞を puromycin で選択して獲得する。この際、ES 細胞に 2 つ以上の gRNA が入らない moi を選ぶ。

1 つ目の遺伝子をタモキシフェン添加により破壊

タモキシフェンを添加することにより ERT2-iCre-ERT2 を活性化し、1 つ目のターゲット遺伝子 Oct4 を破壊する。通常であるとすべての細胞が未分化維持できなくなって分化あるいは死滅してしまうが、2 つ目の遺伝子が破壊されているので、未分化状態を保っているコロニーの出現を期待する。

出現したコロニーの PiggyBac トランスポゾン挿入部位、あるいは gRNA の配列の解析

コロニーよりゲノム DNA を調製し、通常的手法により挿入部位を決定する。(Horie et al. *Nat. Method*, 2011) ただし、多数挿入部位が検出されるはずなので、様々な制限酵素でゲノムを切断しなるべく多くの挿入部位を決定する。

PiggyBac トランスポゾンあるいは gRNA により同定された遺伝子の Validation

挿入部位解析により同定された遺伝子欠損が本当に Oct4 欠損による表現型を回復するものかどうかを確認するために、同定された遺伝子のコンディショナルアレルを LoxP ではなくて、FRT を利用して構築する。1 つ目の遺伝子を Cre; 2 つ目の遺伝子を Flp で両方破壊したときだけに ES 細胞の未分化性が維持できるか検討する。

4 . 研究成果

ハプロイド ES 細胞をホストとして 2 種類の遺伝子を同時に欠損させ、新たな合成救出法の構築を目指して実験を行った。

まず、ハプロイド ES 細胞の ROSA26 遺伝子座へ ERT2-iCre-ERT2 遺伝子を挿入(後に 1 つ目の遺伝子をタモキシフェン依存的に破

壊するため); 実際には遺伝子ターゲティングの効率がハプロイド ES 細胞は非常に低いので、ZFN を用いることによりターゲティングに成功した。

最近の CRISPR/gRNA は両アレル遺伝子を同時に破壊することが可能になったので、通常のディプロイド ES 細胞を用いる合成救出法もトライした。1 つ目の遺伝子 Oct4 をコンディショナルアレルへ変換し、次に CRISPR/gRNA ライブラリーを導入し、2 つ目の遺伝子をランダムに破壊した。

そして、タモキシフェンにより Cre を活性化し、1 つ目の遺伝子を破壊し、分化せずに残存したクローンの解析を行った。コントロール細胞(gRNA ライブラリーを導入したが、Cas9 は発言していない細胞)は、分化せずに残存したクローンは認められなかった。しかし残存したクローンは Oct4 タンパクを発現していたので、現在さらに詳細な解析を進めているところである。

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 1 件)

Tokunaga M, Kokubu C, Maeda Y, Sese J, Horie K, Sugimoto N, Kinoshita T, Yusa K, Takeda J., Simulation and estimation of gene number in a biological pathway using almost complete saturation mutagenesis screening of haploid mouse cells., *BMC Genomics*. 15(1):1016, 2014 doi: 10.1186/1471-2164-15-1016. 査読有

[学会発表](計 3 件)

竹田潤二, Generation of gene-trapped haploid ES cell bank, Systems Biology of Gene Regulation and Genome Editing, Sept.11, 2014, 蘇州(中国)

竹田潤二, 哺乳動物において順遺伝学的手法は有用か?、第 33 回分子病理学研究会、2014 年 7 月 26 日、宮城県(日本)

石田靖雅、ハプロイド ES 細胞を利用した遺伝子探索、第 66 回日本細胞生物学会大会、2014 年 6 月 11 日、奈良県(日本)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/mr-envi/www/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹田 潤二 (TAKEDA, Junji)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50163407

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：