

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660246

研究課題名(和文) CRISPR/Casシステムを用いた母性因子の探索とその機能解析

研究課題名(英文) Identification and analysis for the function of maternal factors using CRISPR/Cas system

研究代表者

青木 不学 (AOKI, Fugaku)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20175160

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)：受精後の初期発生の調節に関わる母性因子の網羅的探索とその機能解析を行うことを目的として、RNAシーケンスとCRISPR/Cas9システムを用いた実験系の開発を試みた。まずRNAシーケンスのデータから卵特異的に発現し、受精後に速やかに分解されるmRNAをコードする遺伝子を抽出した。次いで、これらの中から4つの遺伝子を選び、これらをCRISPR/Cas9システムによりノックアウトした。その結果、2つの遺伝子で表現型を得ることができ、そのうちの1つはクロマチン構造に関わるものであった。以上より、目的とした実験系の開発に成功を収めることができたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop the experimental system using RNA sequence and CRISPR/Cas9 to identify the maternal factors involved in the regulation of preimplantation development. First, we selected the genes which are specifically expressed in oocytes and whose encoding mRNAs are rapidly degraded after fertilization. Second, we chose 4 genes from those genes and made a deletion in them by CRISPR/Cas9. In one of these 4 genes, a deletion caused unusually tight chromatin structure in the oocytes and 1-cell stage embryos. Thus, we have developed the useful system to identify the maternal factors.

研究分野：動物育種繁殖学

キーワード：母性因子 初期発生 初期胚 CRISPR/Cas9 RNAシーケンス

1. 研究開始当初の背景

受精前の卵母細胞は分化した細胞であるが、受精直後の初期胚は全能性を有しており、発生に伴い細胞分化が進行していく。このように受精後は細胞の性質を著しく変化させながら初期発生を進行させていくが、その調節機構については未だ十分に解明されていない。一方で、この時期の発生を調節する因子の1つとして、母性因子が重要な役割を果たしていると考えられている。母性因子とは、卵成長中に蓄積された mRNA (母性 mRNA) から翻訳され、受精後の初期発生過程で働くタンパク質である。しかし、これまでに初期発生に必須として知られている母性因子は数少なく (文献 1、2)、さらにその中の多くが実際にどのような機能により発生に関与しているのかは明らかとなっていない。

一方、近年の次世代シーケンサーの発達により、RNA シーケンス (RNAseq) が発現遺伝子の網羅的解析に有効な方法であることが明らかとなってきた。さらに最近開発された CRISPR/Cas9 システムにより特定の遺伝子をノックアウトした動物を極めて容易に作成できるようになった (文献 3)。また変異を加えた Cas9 によってゲノムの 2 か所を切断するというシステムにより、それまで懸念されていたターゲット以外の遺伝子破壊がほとんど起こらない、特異性の高いノックアウトができることが分かった (文献 4)。

(文献)

(1) Minami et al., J Reprod Dev, 53: 707-715, 2007.

(2) Jiao et al., Fertil Steril, 99: 2055-2061, 2013.

(3) Yang et al., Cell, 154: 1370-1379, 2013.

(4) Ann Ran et al., Cell, 154: 1380-1389, 2013.

2. 研究の目的

本研究においては、上述した RNA シーケンスおよび CRISPR/Cas9 システムなどの最新のシステムを用いて母性因子の網羅的探索とその機能解析を行う実験系の構築とその検証を行う。すなわち、まず RNA シーケンスによって、受精後に翻訳が開始する母性 mRNA を網羅的に探索し、その遺伝子を CRISPR/Cas9 システムによってノックアウトすることでその機能を明らかにするという実験系の構築を行う。

3. 研究の方法

本研究計画は、以下の 3 つのステップから成っている。

(1) RNA シーケンスによって母性因子の候補を探索する

(2) 母性因子の候補を CRISPR/Cas システムでノックアウトすることにより、それが実際に受精後の初期発生で必要とされているかどうかを確認する。

(3) 母性因子の機能を調べる。

尚、(1) では母性因子の候補を網羅的に探索するが、そこで得られた候補のすべてについ

て(2)の検証を行うのは本研究計画の規模では不可能であるため、候補のうちの 5 つ程度について(2)の検証を行い、その中で母性因子としてその働きが確認されたものについて(3)の解析を行う。このプロセスにおいて母性因子の網羅的探索及びその機能解析に成功すれば、他の候補因子についても同様の方法で解析することが可能であると考えられ、このシステムの確立ができたものと考えられる。

具体的な実験は、マウスを実験動物として、以下の様に実施する予定である。

(1) RNA シーケンスによる母性因子の候補探索

母性因子とは、「母性 mRNA から翻訳されて受精後の初期発生過程で働くタンパク質」と定義されている。したがって、これを広義に解釈すると受精前の卵成長、卵成熟期で働いており、さらに受精後にも必要とされるようなタンパク質も母性因子に含まれる。この場合、細胞に常に必要とされるハウスキーピング遺伝子の産物もすべて母性因子ということになり、受精後に特定の機能を持つ母性 mRNA 由来のタンパク質という元来の意図とは乖離する。そこで、本研究では母性因子を狭義に解釈して、「受精前には必要とされないが受精後の初期発生には必須となる母性 mRNA 由来のタンパク質」として、その探索を行うことにした。

ところで、成長卵の細胞質に安定な状態で維持されていた母性 mRNA は減数分裂の再開後に分解を受け始めるが、その多くが受精後も残存して初期発生を支える。すなわち、受精後の一定期間、初期胚は転写が停止した状態であるため、この期間は母性 mRNA から合成されたタンパク質によって発生が調節されているのである。また、母性 mRNA の中で、成長卵においては poly-A 鎖が短くて翻訳されていないが、受精を機に poly-A 鎖が伸長してポリゾームに動員されることによりタンパク質の合成がスタートするものが存在することが報告されている (文献 1~3)。したがって、母性因子はこのような翻訳制御を受ける母性 mRNA にコードされている可能性が高いものと考えられる。そこで、このような翻訳調節を受ける母性 mRNA を網羅的に探し出すことで母性因子の候補を探索することにした。その具体的な実験手順を以下に記す。

まず poly-A 鎖伸長については、全 RNA とオリゴ dT カラムで抽出した RNA を用いてそれぞれ RNA シーケンスを行い、それらの結果を比較することにより評価する。これまでに、受精後に poly-A 鎖が伸長する Cdk4 を RT-PCR で検出した際に、ランダムプライマーで cDNA を合成したものでは受精前後で変化はなかったが、オリゴ dT プライマーを用いたものでは、受精後に顕著な増加が見られたという報告がある (文献 4)。すなわち、poly-A の

長さによってオリゴ dT への結合能に違いが生じるということである。実際に、申請者の予備的実験において、減数分裂再開後あるいは受精後に poly-A 鎖が伸長することが報告されている数種類の母性 mRNA について解析したところ、poly-A が伸長した際にはオリゴ dT カラムでの回収率が増加していた。

次に、ポリゾームへの動員については、超遠心でポリゾーム分画を回収し、そこで得られた RNA と全 RNA で行った RNA シーケンスの結果を比較することによって評価を行う。

以上、と の実験結果で受精前後において変化の見られたものを母性因子の候補とする。

(2) ノックアウトによる母性因子の同定

上記(1)で得られた母性因子の候補からいくつかの遺伝子について、CRISPR/Cas システムによるノックアウトマウスを作成する。受精後の初期胚特異的に機能する母性因子であれば、それをノックアウトしても順調に発生するはずである。

誕生して成長したマウスのゲノムを調べ、目的とした遺伝子が壊されていることを確認する。遺伝子がホモに破壊されているマウスから成長卵を回収し、これを体外受精してその後の発生を調べる。発生に異常が見られたものを母性因子として同定する。

尚、当初の予定としては、数個の候補遺伝子について調べる予定であるが、研究が順調に進行して可能であれば、さらに多くの遺伝子についても調べることにする。

(3) 母性因子の機能解析

母性因子と同定されたタンパク質の構造を調べることにより、その機能を推測する。ノックアウトマウスから得られた卵を受精させた胚において、推測された機能についての解析を行う。例えば、遺伝子発現あるいは細胞分裂の調節の異常については、以下の解析を行う。発生に異常が生じる原因には様々なものがあるが、細胞分裂の調節あるいは遺伝子発現の異常がその主なものと考えられる。

RNA シーケンスを行い、遺伝子発現の異常を調べる。

発生が停止している細胞周期を DNA 染色(M 期かどうか)および BrdU の取り込み実験(DNA 複製が起こっているかどうか)により調べる。発生停止時期によって M 期および S 期の調節因子である CDK1 および CDK2 の活性化調節機構の異常を調べる。

(文献)

- (1)Oh et al, Development 127: 3795-3803, 2000.
- (2)Fuchimoto et al, Biol Reprod, 65: 986-993, 2001.
- (3)Sakurai et al., Biochem Biophys Res Commun 327: 688-699, 2005.
- (4)Moore et al, Mol Reprod Dev 45: 264-75, 1996.

4. 研究成果

(平成 26 年度)

まず、未受精卵ではほとんど翻訳されていないが、受精後に、poly-A 鎖が伸長して翻訳が増加する母性 mRNA を網羅的に探索するため、全 RNA とオリゴ dT カラムで抽出した RNA サンプルで RNA シーケンスを行った結果を比較して、受精後にオリゴ dT カラムで抽出してももの割合が増加する遺伝子をふるい分けた。さらに、データベースを用いて卵特異的に発現しているものを選び出すことで、数十の母性因子の候補を得ることができた。

一方、当研究室でそれまで CRISPR/Cas システムを用いた経験がなかったため、候補遺伝子の解析に入る前に、まず機能が既知の遺伝子 (*c-Mos*) についてノックアウトを試みた。その結果、モザイクに変異が入るものの効率良くノックアウトできることが確認できた。したがって、一旦、第 1 世代のノックアウトマウスを wild タイプと交配させることにより、モザイクでないヘテロを作成し、その後このヘテロ同士を交配させるシステムで完全な (モザイクではない) ホモを作成することとした。

(平成 27 年度)

前年度に機能が既知の遺伝子 (*c-Mos*) についてノックアウトを試みたところ、効率よくノックアウトができたことから、本年度は母性因子の候補遺伝子を CRISPR/Cas システムでノックアウトして、その機能を解析することにした。すなわち、RNA シーケンスのデータを用いて、受精前に高発現しており、受精後に速やかに消失する mRNA をコードする遺伝子を母性因子の候補として抽出した。その中から、特にクロマチン構造の調節に關与する機能ドメインが予測される遺伝子である、*Zkscan6*、*Chd9*、*Wdr76*、*AU022751* (hypothetical protein LOC102991) の 4 つを選びだして、CRISPR/Cas システムによるノックアウトを試みた。その結果、4 つの遺伝子ともノックアウトの個体を得ることができた。これらの個体をワイルドタイプのもので交配してモザイクのないヘテロの個体を作成し、さらにこれらを交配することでノックアウトのホモ個体を得た。これらのホモ個体は 4 つの遺伝子のいずれにおいても成体まで異常なく育ち、更に繁殖能力にも異常がなかった。しかしながら、*Zkscan6* のホモ欠失個体においては、ジグザグに尾がまがる kinked tail の表現型が見られた。また、*Chd9* のホモ個体の雌から得られた卵、およびそれを受精させた 1 細胞期胚においてクロマチンが wild タイプのものと比較して締まった構造となっていた。この結果については公表予定であり、現在そのための論文を執筆中である。

以上より、本研究によって RNA シーケンスを用いた大規模データから母性因子の候補を抽出し、CRISPR/Cas9 システムによってその機能を明らかにするための実験系を構築し、それが機能することを示すことができ

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

Ooga M, Fujii W, Naito K & Aoki E:
Involvement of Chd9 in highly loosened
chromatin structure in growing oocytes.
International Symposium on Epigenome
Dynamics and Regulation on Germ Cells.
Kyoto University (Kyoto), February 17-19,
2016.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

青木 不学 (AOKI, Fugaku)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・

教授

研究者番号: 20175160

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: