

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26670093

研究課題名(和文) 神経系可視化ゼブラフィッシュのゲノム編集によるBAF複合体の個体レベルの機能解析

研究課題名(英文) Whole-body functional analysis of the BAF complex in the visualized zebrafish nervous system using genome editing

研究代表者

吉川 知志(KIKKAWA, Satoshi)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90244681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：受精卵から動物個体が発生する過程で、各組織・器官の特殊化(分化)が起きる際には、個々の細胞の中でその後に分化してゆく各組織・器官に応じた遺伝子群の選択と調節が行われる。神経組織への分化において遺伝子発現の調節を司ると考えられているBAF複合体の役割を調べるために、神経組織が個体の外から生きたまま可視化されている遺伝子改変ゼブラフィッシュをモデルとして用い、これにゲノム編集技術による遺伝子破壊を行った。BAF複合体の構成タンパク質であるBAF45b遺伝子を破壊したゲノム編集ゼブラフィッシュを複数系統作成する事ができた。神経系の発生障害の解析を現在も継続して行っている。

研究成果の概要(英文)：When specialization (differentiation) of each tissue or organ occurs during development of an individual animal, a set of genes are selectively used in each tissue/organ. In order to investigate the role of the BAF complex that is thought to govern the regulation of gene expression in differentiation into nerve tissue, we used a genetically modified zebrafish whose nerve tissue is visualized with fluorescent proteins. Genetic disruption of BAF complex genes by genomic editing technology was conducted on these transgenic fish lines. Several lines of genome edited zebrafish disrupted in the BAF45b gene were generated. These fish lines will be very useful for a functional analysis of the BAF complex in development of the nervous system. We continue to study developmental dysfunction of the nervous system in these fish.

研究分野：神経発生学

キーワード：クロマチン再構成複合体 ゲノム編集 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

個体の発生をナビゲートする転写因子カスケードなどの内因性メカニズムと外因性シグナルへの応答との動的バランスを解析することは発生学上の重要課題である。Brg/Brm-associated factor (BAF) 複合体は、10 個のコアサブユニットからなるクロマチン再構成複合体で、ヒストン-DNA 間の相互作用の制御を介して遺伝子発現調節に関与する。種を超えて高度に保存された BAF 複合体には、一部のサブユニットのアイソフォームの違いによる多型が存在する。例えば、esBAF、npBAF、nBAF は、それぞれ ES 細胞、神経前駆細胞、分化ニューロンに特異的なサブユニットを含み、発生の進行と共にアイソフォーム交換により順次移行し、各ステージに必要な遺伝子発現を実現すると考えられる (右図)。Dpf1 は、以前は Neud4 と呼ばれ、長らく機能未知の DNA 結合分子と考えられていたが、前述の nBAF 複合体に特異的なサブユニットとして新たに同定された BAF45b と同一分子であることが判明し、ニューロン分化や分化後の機能発現に関わる因子としてにわかに注目されている。しかし、Dpf1 が関与する神経発生イベントの詳細やその機能メカニズムについては大部分が未解明であり、さらなる研究が必要である。

一方、申請者らは、ゼブラフィッシュに tTA-EGFP 融合遺伝子を用いたエンハンサートランプ挿入を行い、中枢神経系に発現を示す系統中に *dpf1* 遺伝子座の約 1 Mb 上流に挿入をもつ系統 (*dpf1*-tTA-GFP) を得た。予備検討ではこの系統の GFP 発現パターンは *dpf1* の発現パターンとよく一致しており、Dpf1 の機能解析に大変有用であると判明した。そこで、小型で透明性が高く短時間に体外発生する胚や、*dpf1*-tTA-GFP 以外にも様々な蛍光レポーターのトランスジェニック系統が利用できる利点を生かし、Dpf1 含む BAF 複合体の神経系発生における機能解析を行うこととした。

2. 研究の目的

神経系の機能発現の礎となる発生イベントを時空間的に制御するメカニズムの個体レベルでの理解を目指し、本課題では特に BAF クロマチン再構成複合体 (esBAF、npBAF、nBAF) の機能解析に焦点を絞った研究を行う。BAF 複合体を構成する各サブユニットのミュータントゼブラフィッシュ系統を作成し、蛍光タンパク質レポーターなどを活用した主に個体レベルでの形態学的解析により、それぞれの BAF 複合体の機能を俯瞰的に解析する。また、次世代シーケンシングによる RNA 発現解析を行い、BAF 複合体の標的遺伝子を網羅的に検索する。得られた知見を基に、マウスを用いて *in vitro* および *in vivo* での遺伝子発現操作を行い、

BAF 複合体の中枢神経系発生における役割を神経細胞分化、細胞形態、回路形成などに焦点を当てて解析する。

3. 研究の方法

[1]ゲノムエディティングによる BAF 複合体ミュータント系統群の作成

(1)CRISPR/Cas システムを用い、BAF45b などの機能阻害ミュータント系統群を作成する。強力な CAG プロモーター制御下に Cas9 エンドヌクレアーゼを発現する CAG-hspCas9-H1 ベクターに各標的遺伝子に特異的な約 20 塩基の合成オリゴ DNA を挿入し、変異導入コンストラクトを作成する。標的遺伝子当たり 3 種類前後のオリゴ DNA を設計し、次の実験に進める。

(2)得られた各プラスミドをゼブラフィッシュ受精卵に顕微注入し、F0 世代ファウンダーを得る。あるいは、得られたプラスミドより *in vitro* 転写により RNA を合成し、顕微注入に用いる。この F0 世代は生殖細胞を含めてモザイクにゲノム変異を持つ。次に、この F0 を野生型魚と交配して得た F1 世代を PCR 法によりスクリーニングし、生殖細胞に高頻度に変異を有する F0 個体を選別する。選別した F0 個体由来する F1 ファミリーからライン化に適した F1 個体を選別、野生型と交配し、F2 ミュータント系統を確立する。この際、神経系細胞に蛍光タンパク質 Kaede を発現する HuC-Kaede 系統のヘテロ魚と交配することで、野生型および HuC-Kaede バックグラウンドの F2 ミュータント系統を同時に得ることができる。F2 同士を交配して得られる F3 ホモ接合変異個体を以降の解析に用いる。

[2]遺伝子ターゲティングによる BAF 複合体の機能解析

BAF 複合体の構成サブユニットに対するモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) を受精卵に注入することにより一過性の発現阻害を行い、神経系の発生に対する様々な影響を検討する。特に、BAF45b (Dpf1) と BAF53b は脊椎動物の BAF 複合体における分化後ニューロン特異的構成サブユニットの 1 つと報告されており、その発現阻害によりニューロン分化やその後のニューロン特異的な発生過程、すなわち樹状突起伸長や軸索投射、シナプス形成などが障害されると期待される。*dpf1*-tTA-GFP フィッシュを中心に蛍光タンパク質発現系統を適材適所に使用することにより個体レベルでの解析を行う。

[3]BAF 複合体ミュータント魚系統群を用いた表現型解析

上記 [2] に述べた蛍光タンパク質発現系統の遺伝的バックグラウンドに各 BAF45b ミュータントの F3 ホモ接合体を作成し、[2] と同様の機能阻害表現型を解析する。前述の MO によ

る一過性の発現阻害と異なり孵化期以降の後期発生過程や成魚でも解析できるため、小脳や末梢神経系などの比較的発生の遅い神経組織や嗅覚系のように生涯更新の続く神経組織も解析対象とできる。さらに、神経系に外傷等を加えた後の再生過程を解析できる可能性もある。蛍光タンパク質レポーターに加えて、増殖細胞、分化細胞、各種ニューロン・グリア、さらに樹状突起などの各種マーカー分子を対象に免疫組織化学法により形態学的解析を行う。

[4]BAF 複合体ミュータントにおける遺伝子発現パターンの網羅的解析 BAF 複合体はクロマチン再構成複合体であるため、機能阻害の影響は一義的にはすべて遺伝子発現の変化として現れる。そこで、BAF 複合体ミュータント個体における全遺伝子発現パターンの網羅的解析を試みる。各ミュータント系統の F3 ホモ接合個体をゲノム PCR を指標にプールし、mRNA を対象とした遺伝子マイクロアレイ法により全遺伝子の発現解析を行う。発現に変化のある遺伝子は、個別に定量的 PCR 法を用いた発現量の定量的解析や in situ ハイブリダイゼーション法による発現部位の詳細な解析を行う。

4. 研究成果

[1]ゲノム編集による BAF 複合体変異系統の作成

BAF 複合体構成サブユニットの中から BAF45b (dpf1) をピックアップし、3カ所のガイド RNA 標的配列をデザインして、それぞれを CAG-hspCas9-H1 ベクターへ組み込んだ。また、CAG-hspCas9-H1 ベクターの H1 プロモーターをゼブラフィッシュ U6 プロモーターに置換したベクターを作製し、その直下に先の3つ標的配列をそれぞれ組み込んだものも作製した。各プラスミドをゼブラフィッシュ受精卵に注入し、数日後にゲノム DNA を抽出しゲノム編集結果を、標的ゲノム領域を含む PCR 断片の T7 エンドヌクレアーゼ切断アッセイ法により評価した(図1)。この方法は注入用 RNA の合成等の必要がなく非常に簡便であるため、多数の遺伝子を編集する際に有効と思われたが、ゲノム編集の効率は期待したよりも低かった。そこで、常法通りに Cas9 RNA とガイド RNA を鋳型プラスミドより in vitro 転写により合成し注入した。RNA 注入の数日後に、同様に T7 エンドヌクレアーゼ切断アッセイによりゲノム編集を評価したところ、非常に高い効率(注入胚の60%超)で標的ゲノム領域に何らかの編集が生じていることが確認され(図2)、以後は本法を用いた。

図 1

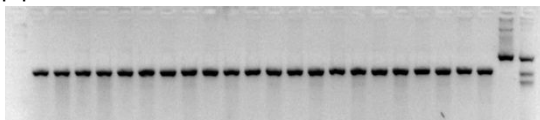
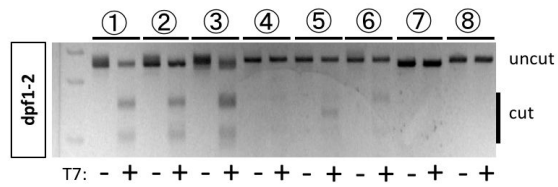


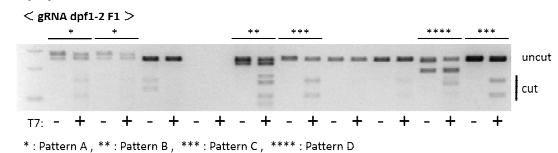
図 2



ガイド RNA 配列のデザイン検索サイトの情報をもとに標的遺伝子に対してそれぞれ複数のガイド RNA を作製し、いずれの編集効果も期待通りでない場合には新たに標的配列を複数追加し再トライした。

ゲノム編集 F0 個体と野生型個体を交配し得た F1 世代各個体に対して編集標的ゲノム領域の T7 エンドヌクレアーゼ切断アッセイおよび DNA シークエンシング解析を行い、フレームシフトを生じ null 変異が期待できる編集結果を有するものが複数系統得られた(図3)。

図 3



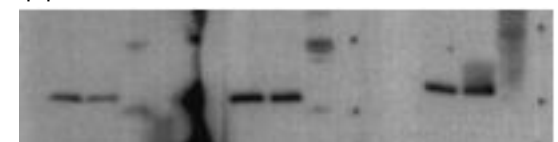
dpf1-2	Pattern (indels)	個体数 (n=10)
AACTGCTACATATGGATGGAGAAAGACTCACCGTGGCCAGGTGTG	WT	4
AACTGCTACATATGGATGGAGAAAGACTCACACA [*] CAGGTGGCCAGGTGTG	Pattern A (-1;+24)	2
AACTGCTACAT-----GGCCAGGTGTG	Pattern B (-22)	1
AACTGCTACATATGGATGGAGAAAGACTCACCGTGGCCAGGTGTG	Pattern C (-7;+21)	2
-----GTGTG	Pattern D (-58)	1

*: Pattern A, **: Pattern B, ***: Pattern C, ****: Pattern D

次に、BAF45b 遺伝子座近傍に GFP 遺伝子の挿入を有する dpf1-tTA-GFP フィッシュおよび分化ニューロン全般に緑色蛍光タンパク質 Kaede を発現する HuC-Kaede フィッシュをバックグラウンドに、相互交配によりトレーサー蛍光タンパク質を発現するゲノム編集系統を作出した。

また、ゲノム編集個体における標的タンパク質の発現を解析するために、標的タンパク質に対する抗ペプチド抗体の作成を試みた。BAF45b 遺伝子産物(Dpf1)に対する抗体では、ELISA およびウエスタンブロット法において高力価を示す抗血清が複数得られた(図4)。一方で、個体のホールマウントあるいは切片標本に対しては期待した染色成績が得られていない。染色条件の最適化、特異抗体画分の精製等の作業がさらに必要である。

図 4



[2]遺伝子ノックダウンによる BAF 複合体の機能解析

上記[1]と並行して、BAF45b (dpf1) に対する

るモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを受精卵に注入して一過性の発現阻害を行い、神経系の発生に対する影響の検討を試みた。dpf1 遺伝子座に GFP 遺伝子の挿入を有する dpf1-tTA-GFP フィッシュを中心に、中枢神経系に蛍光蛋白質を発現する複数のトランスジェニック系統を用いて実験を行ったが、十分に再現性の得られる中枢神経発生異常は残念ながら確認できなかった。発生に対する不特異的な影響を完全に排除し、安定した再現性ある解析を行うには、上記 [1] のゲノム編集によるノックアウト系統を確立する方法が適すると結論した。

[3]

BAF 複合体がクロマチン再構成複合体であることから、ホモ変異体では特定の遺伝子(群)の発現量が大きく変動する可能性が考えられる。そこで、個体レベルの形態学的解析と並行して、ホモ変異体の全発現遺伝子のマイクロアレイ解析を試みた。発現量の変化の大きい遺伝子群から、いくつかの遺伝子をピックアップし、今後、遺伝子発現量の変動を定量的 PCR 法や in situ ハイブリダイゼーション法などにより個別に確認していく予定である。

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)

[学会発表](計2件)

Satoshi Kikkawa, Takayuki Sumimoto, Takuya Sumi, Yoshiaki Sakihama, Toshio Terashima, Functional analysis of the Reelin-Dab1 signal pathway in the developing zebrafish nervous system, Society for Neuroscience Annual meeting 2014, 2014 年 11 月 18 日, Washington, DC (United States)

福田晃、崎浜吉昭、寺島俊雄、吉川知志、CRISPR-Cas9 システムを用いた Reelin ノックアウトゼブラフィッシュの作成と中枢神経系の構造解析、第 118 回日本解剖学会全国学術集会、2016 年 3 月 30 日、ビックパレットふくしま(福島県・福島市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉川 知志 (KIKKAWA, Satoshi)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：90244681

(3)連携研究者

寺島 俊雄 (TERASHIMMA, Toshio)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20101892

(4)研究協力者

崎浜 吉昭 (SAKIHAMA, Yoshiaki)
神戸大学・医学部・技術専門職員

鷲見 拓哉 (SUMI, Takuya)
神戸大学・大学院医学研究科・大学院生

福田 晃 (FUKUDA, Koh)
神戸大学・大学院医学研究科・大学院生