

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14617

研究課題名(和文) 擬似常染色体領域を用いた新規人工染色体導入マウスの作出と、その繁殖効率の解析

研究課題名(英文) The generation of a novel mouse artificial chromosome carrying pseudo-autosomal region, and analysis of its stability in germline.

研究代表者

吉村 祐貴 (Yoshimura, Yuki)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：50771242

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)：マウス人工染色体(MAC)とは、マウス染色体の遺伝子領域を取り除いて外来遺伝子の導入を可能にしたベクターである。MACを保持するトランスクロモソミック(Tc)マウスが多く作製されているが、雄のTcマウスに由来するMACの子孫伝達率には低いことが報告されており、その詳細は不明なままであった。擬似常染色体領域(PAR)は性染色体の末端に存在し、X-Y染色体間で高い相同性を持っている。異なる性染色体はこのPAR領域を介して対合することができる。雄のTcマウスの子孫伝達率の改善の糸口を見つけるべく、PAR領域が搭載されたマウス人工染色体を新たに構築し、減数分裂におけるその動向の解析を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工染色体ベクターは100kbからMb単位に及ぶ遺伝子でさえ搭載することが可能であり、他にはないユニークな特徴を持つ。人工染色体ベクターを用いて、完全ヒト抗体産生マウスなど従来法では作製不可能であったモデル動物が数多く作製されており、疾患の原因解明や創薬開発に貢献している。一方で、Tcマウスの繁殖性には課題があり、より汎用的に利用されるためにはこの課題を克服する必要がある。本研究で得られた成果は、この課題克服に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Mouse artificial chromosomes (MACs) are unique vectors in which the gene region of a mouse chromosome is removed to allow the insertion of transgenes. Although many transchromosomal (Tc) mice that retain MAC have been generated, the low rates of germline transmission of MAC derived from male Tc mice have been reported, and this cause remains unknown. Pseudoautosomal regions (PARs) are located at the ends of sex chromosomes and have high homology between X and Y chromosomes. The X and Y chromosomes can be paired between each PAR region. In order to find clues to improve the germline transmission rate of MAC, I attempted to construct a novel mouse artificial chromosome carrying the PAR region, and trace it in meiosis.

研究分野：実験動物学

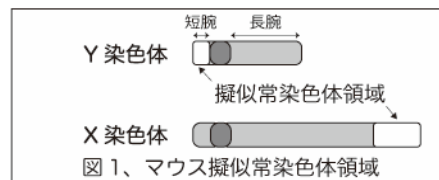
キーワード：遺伝子改変動物 擬似常染色体領域 人工染色体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

人工染色体ベクターとは、バクテリアやマウス、ヒトの染色体などを基礎として、その遺伝子領域を限りなく取り除いて最小化し、loxP 配列などの組換え配列を搭載することで、外来遺伝子の導入を可能にしたベクターである。マウス人工染色体ベクター (Mouse artificial chromosome, 以下 MAC) はセントロメア、人工テロメアを持つため、細胞内で宿主染色体とは、独立して維持されており、細胞分裂時においても宿主染色体同様に複製、分配されて娘細胞へ引き継がれる。MAC ベクターは通常 CHO 細胞などの培養細胞に保持されていることから、その細胞へ目的の遺伝子をトランスフェクションし、Cre/loxP などの組換えシステムを利用して目的遺伝子を MAC ベクターへ挿入する。また、MAC ベクターは微小核細胞融合法によって CHO 細胞からマウス ES 細胞へ移入することができる。従って、そのマウス ES 細胞からキメラマウスを経て、MAC ベクターを保持するトランスクロモソミック (Trans-chromosomal, 以下 Tc) マウスを作製することが可能である。Tc マウスは数 Mb にも及びゲノム領域を搭載することが可能であり、他の遺伝子改変動物にはない特徴を持っているが、その繁殖には課題が残っていた。それは、Tc マウスの生殖細胞における MAC ベクターの安定性であった。MAC ベクターを保持する雌の Tc マウスを野生型の雄マウスを交配させた場合、生まれた F1 マウスの約 50% が MAC ベクターを保持しており、MAC ベクターはメンデルの法則に従って子孫伝達する。一方で、雄の Tc マウスを野生型の雌マウスと交配させた場合、MAC ベクターの子孫伝達率には個体差が生じる上、その伝達率は 20-30% と、低いことが報告されている (Kazuki K, *et al.*, BBRC, 2013)。その原因として、MAC ベクターは染色体としては小さいために、生殖細胞が分化・成熟する過程で対合できないなど、染色体不分離が生じている可能性が考えられるが、実際 MAC ベクターが減数分裂の過程でどのような挙動を示すのか、その詳細は不明である。

Y 染色体は他の染色体よりも小さい染色体であるが、減数分裂時は X 染色体と対合し、生殖細胞へ分配される。擬似常染色体領域 (Pseudo-autosomal region, 以下 PAR) は性染色体の末端に存在し、X-Y 染色体間で高い相同性を持っている領域である。そのため、PAR 領域を介して、大きさが異なる性染色体同時でも対合することができる (図 1)。マウスでは X 染色体の長腕末端、Y 染色体の短腕末端に存在するとされており、その大きさは約 700kb ほどであると考えられている (Raudsepp T, *et al.*, Sex Dev. 2012)。MAC ベクターは、本来染色体に存在していた内因性の遺伝子がほとんど取り除かれて極小化した染色体であると考えられると、この PAR 領域を MAC ベクターに搭載することで、PAR 領域が生殖細胞における人工染色体ベクターの安定性に効果的に働くのではないかと考えた。



### 2. 研究の目的

本研究はマウス人工染色体の子孫伝達効率改善を試みるため、PAR 領域を搭載した新しいマウス人工染色体を樹立し、その新規マウス人工染色体の減数分裂過程における動向を解析することであった。

### 3. 研究の方法

方法は以下の通りで行った。

(1) PAR 領域の上流に loxP 配列をノックイン (Knock-in, 以下 KI) した遺伝子改変マウス loxP-PAR マウスの作製

(2) マウス 11 番染色体のセントロメア近傍にホスホグリセレートキナーゼ遺伝子 (PGK) プロモーターと loxP 配列をノックインした 11-loxP マウスの作製

(3) 作製した 2 系統のマウスを交配させて得たダブル KI マウスを用いた新規マウス人工染色体の構築

(4) 作製した新規マウス人工染色体を保持する Tc マウスの作製

(5) 作製した Tc マウスの生殖細胞における人工染色体の安定性解析

### 4. 研究成果

(1) PAR 領域の上流に loxP 配列を KI した遺伝子改変マウス loxP-PAR マウスの作製

ヒトでは X 染色体の短腕長腕の末端にそれぞれ PAR1、PAR2 が存在している。一方で、マウスの染色体はセントロメアが端部近傍にあるアクロセントリックな染色体であり、X 染色体短腕領域が非常に短い。従って、マウスの PAR は X 染色体の長腕末端に存在するとされている。そこで、マウス X 染色体の長腕にある PAR 領域を実験に使用することとした。PAR 領域を持つマウス人工染色体を構築するにあたり、X 染色体にある PAR 領域を、別の常染色体のセントロメア付近に転座させ、MAC ベクターのように小型化した染色体を構築することを考えた。まず、PAR 領域を別の染色体に転座させることができるように PAR 境界に loxP 配列を KI したマウスを作製することにした。マウスの PAR 領域の境界は、Mid1 遺伝子の exon3 と exon4 の間にあるとされており、そこに loxP 配列とネオマイシン (Neomycin, 以下 Neo) 耐性遺伝子を KI した。将来、PAR 領域を転座させる際に、転座に成功した細胞を薬剤選択できるように、プロモーターを持たない Neo 耐性遺伝子を loxP 配列の後ろに挿入した。KI には、ゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 システムを用いた。Mid1 の exon3 と exon4 の間にガイド RNA (gRNA) を 2 つ設計し、長鎖の 1 本鎖 DNA (long single strand, 以下 lss) を KI のドナー DNA とした (図 2)。

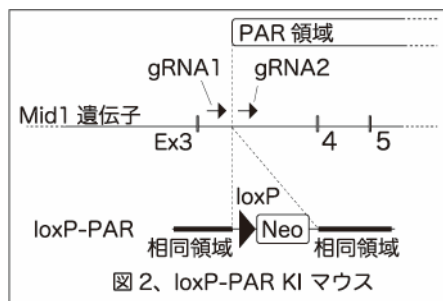


図 2、loxP-PAR KI マウス

2 つの gRNA と tracrRNA、Cas9 タンパク質、ドナー DNA をエレクトロポレーション法によりマウス受精卵に遺伝子導入し、得られた受精卵を偽妊娠マウスの卵管に移植し、出生させた。得られたマウスの遺伝子解析を行い、目的の領域にドナー DNA (lss) が挿入されている個体を得た。このマウスを繁殖させ、loxP-PAR マウスとした。

(2) マウス 11 番染色体のセントロメア近傍に PGK プロモーターと loxP 配列をノックインした 11-loxP マウスの作製

PAR 領域をセントロメア近傍に転座させた染色体を構築するにあたり、「トップダウン」式の人工染色体作製方法を参考にした (M Takiguchi, *et al.*, ACS Synth Biol. 2014)。この方法により、マウスの 11 番染色体を基にして、いくつかの MAC ベクターが過去に構築されており、本研究においてもマウス 11 番染色体を基にして、そのセントロメア近傍に PAR 領域を搭載することとした。マウス 11 番染色体に PAR 領域を転座させるために、マウス 11 番染色体セントロメア近傍にある Pisd-ps1 遺伝子の exon7 に PGK プロモーターと loxP 配列をノックインした (図 3)。

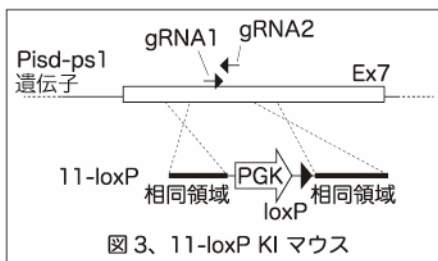


図 3、11-loxP KI マウス

(3) 作製した 2 系統のマウスを交配させて得たダブル KI マウスを用いた新規マウス人工染色体の構築

PAR 領域を持つ小型化したマウス人工染色体を作製するために、作製した 2 系統の KI マウスを交配させ、ダブル KI マウスの作製に着手した。そのダブル KI マウスから細胞株を樹立し、Cre 発現ベクターをトランスフェクションすることで、Cre/loxP システムを用いて、PAR 領域をマウス 11 番染色体のセントロメア近傍に転座する方法を計画していた (図 4)。しかしながら、繁殖させた loxP-PAR マウスの遺伝子を再解析した結果、KI に必要な相同領域に本来含まれていない配列、Exon3 を含む 706bp の配列が loxP 配列近くに挿入されていることがわかった (図 5)。この時点では、この変異が生じた原因を特定できなかったため、より実績のある方法にて loxP-PAR マウスを作製し直すこととした。

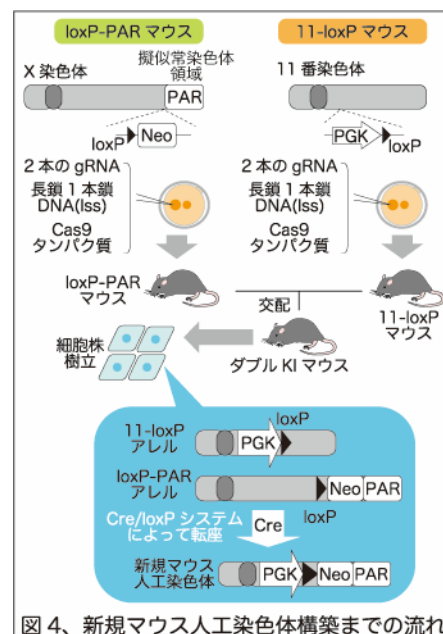


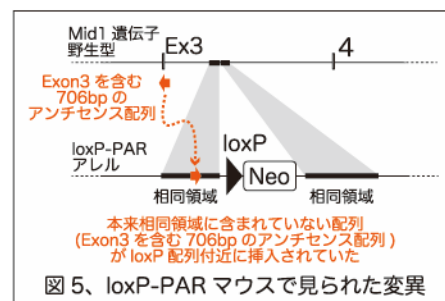
図 4、新規マウス人工染色体構築までの流れ

(1)-2 改良型 loxP-PAR マウスの再作製

改良型 loxP-PAR マウスの作製については、先のマウスと同様に CRISPR/Cas9 システムを使用した。KI ベクターは 2 本鎖の状態で使用し、かつ、マウス受精卵前核へのインジェクションによって作製した。2 つの gRNA

や tracrRNA、Cas9 タンパク質は同じものを使用し、2 本鎖 KI ベクターとともにマウス受精卵前核へインジェクションした。生まれたマウスの遺伝子検査の結果、目的の遺伝子領域に導入遺伝子が KI されたマウスが得られた。しかしながら、このマウスを繁殖させていくと、マウスの世代数が増えるにつれて PCR による遺伝子検査が不安定になる現象が見られた。先に作製した loxP-PAR マウスに変異が見つかったことも含めて、loxP-PAR マウスの作製方法ではなく、PAR 境界付近に KI すること自体に問題がある可能性が考えられた。実際、PAR 境界付近にはタンデムな繰り返し配列が存在していることが報告されており、このような配列部分では進化的に遺伝子の変異が頻繁に生じていると推察されている (Perry J, et al., Genome Res. 2001)。また、マウスの PAR 領域は他の哺乳類よりも進化的に新しく獲得された領域であると考えられており、依然として不明な点が多い。従って、新たに作製した改良型 loxP-PAR マウスの遺伝子配列を網羅的かつ詳細に解析すべく、次世代シーケンスを用いて全ゲノム解析を行うこととした。改良型 loxP-PAR マウスからゲノムを抽出し、そのゲノムを TruSeq DNA PCR Free を用いてライブラリーを構築し、Whole genome sequence を行った。得られたシーケンスは現在解析中である。

事業期間中に当初の研究目的を達成することはできなかったが、loxP-PAR マウスの作製を通して、PAR 領域の境界付近へ遺伝子改変を行ったマウスは、その作成に成功したとしても、そのマウスを繁殖・維持する過程で目的の遺伝子改変に変異が生じやすい可能性が示唆された。現在、改良型の loxP-PAR マウスのゲノム解析が進行中であるが、その結果から更なる知見が得られることを期待している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------