

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06458

研究課題名(和文) マウスゲノム上に見つけた新しい領域CSCTの役割

研究課題名(英文) Role of CSCTs, new regions found in the mouse genome

研究代表者

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：20274730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ES細胞を用いた遺伝子トラップ法の過程で、特定の範囲に配列が繰り返す領域を異なる染色体上で4箇所発見した。本研究において、CSCT2(3.1Mbp)とCSCT4(2.1Mbp)の欠損マウスを作製し、それらの機能解析を行った。CSCT2内の遺伝子は成体の脳で発現が強く、また、CSCT4内の遺伝子はユビキタスだが精巣と胎盤に比較的強い発現を示し、発現部位に関連した解析を行った。メガベースに渡る大きな領域を欠損したのにも関わらず、CSCT2欠損マウスおよびCSCT4欠損マウスは、形態・成長・行動・生殖において顕著な表現型を示さなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトやマウスゲノムは、遺伝子領域はほんの2%ほどしかなく、その半分近くはLINEやトランスポゾンなどの繰り返し配列が占める。近年、ジャンクDNAと言われてる領域にも機能があることが徐々にわかってきた。我々は、新しい反復領域としてCSCTを4箇所発見し、それらの機能解析をマウスで行っている。CSCT2とCSCT4は、機能解析からは生体において明らかな機能を見出せなかったが、レトロトランスポソンの発現抑制に関わることや、マウスゲノムの中でも複雑な構造を持つ特異な領域であることがわかった。ゲノムの配列だけでなく、このような領域についての情報は、ゲノムの全体像の理解に役立てることができる。

研究成果の概要(英文)：In the process of gene trap method using ES cells, we found four regions on different chromosomes where the sequence repeats in a specific range. In this study, we generated mice deficient in CSCT2 (3.1 Mbp) and CSCT4 (2.1 Mbp) and analyzed their functions. Genes in CSCT2 are strongly expressed in the adult brain, and genes in CSCT4 are ubiquitous but relatively strongly expressed in the testis and placenta. We performed analyses related to the expression pattern. Despite the loss of large regions spanning mega-bases, CSCT2- and CSCT4-deficient mice did not show any significant phenotypes in morphology, growth, behavior, or reproduction.

研究分野：分子生物学

キーワード：マウスゲノム 反復配列 遺伝子トラップ ゲノム編集 発現解析 表現型解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトやマウスゲノムが解読され、その半分近くはLINE やトランスポゾン等の繰り返し配列であることが明らかとなった。これらの繰り返し配列はゲノム全体に広がっており、染色体特異性はない。我々は、マウス ES 細胞を用いて遺伝子トラップ (プロモータートラップ) を行い、EGTC データベース [<http://egtc.jp>] を構築した。トラップした遺伝子のアノテーションを行う過程において、配列が染色体の特定の領域に繰り返しクラスタを形成しているトラップ領域 (Chromosome Specific Clustered Trap region ; CSCT) を 4 箇所発見し、発見した染色体の番号に対応して CSCT2, CSCT4, CSCT12 及び CSCT13 とした。CSCT が機能的なゲノム領域であるかを明らかにするため、これまでに CSCT13 (1.6Mbp) をゲノム編集により欠損させたマウスを樹立し、表現型解析を行った。ホモ接合体は顕著な表現型を示さなかったもののホモ接合体同士の交配で得られる産仔は有意に少なかった。解析を進めたところ、CSCT13 は、初期発生および減数分裂時の染色体相同組換えに関与し配偶子形成に影響していることがわかってきた。それぞれの CSCT 内に存在する既知遺伝子について調べると、CSCT2 と CSCT4 に存在する遺伝子の多くは、転写抑制に働く KRAB-ZFP 遺伝子であることがわかった。これらの特徴を持つことから、CSCT は其々に何らかの機能を持つのではと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、CSCT の生理機能を明らかにするのが目的である。ゲノム上には何の役割もないジャンク DNA だと思われる配列が多くを占めており、遺伝子トラップ法で発見した CSCT の特徴や機能を示すことでマウスゲノムの全体像の理解に貢献できる。

3. 研究の方法

CSCT の特徴を抽出するため、公共データベース (UCSC Genome Browser, MGI, NCBI) を利用し CSCT 内の遺伝子の種類と発現部位を調査した。CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集により、CSCT2 欠損マウスおよび CSCT4 欠損マウスを作製し、発現解析と表現型解析を行った。トラップ配列は ES 細胞で発現している配列であることから、胚盤胞から ES 細胞を樹立し、ES 細胞での発現を RNA-seq により網羅的に解析した。CSCT2 と CSCT4 には、KRAB-ZFP 遺伝子群が存在する。KRAB-ZFP 遺伝子はマウス ES 細胞でレトロトランスポゾンの発現を抑制するとの報告 (Wolf G. *et al.*, eLife, 2020Jun) があることから、レトロトランスポゾンの発現を調べた。

4. 研究成果

(1) CSCT2 の解析

CSCT2 は、2 番染色体上の 3.1Mbp の範囲で、Ayu21-B6T47 トラップ配列 (167nt) を調べると、CSCT2 内に類似配列が 32 カ所あった。既知遺伝子は 89 存在し、その約 92% は KRAB-ZFP 遺伝子であった。トラップ配列と既知遺伝子との対応を調べたところ、既知遺伝子の一部と一致する配列があるが、遺伝子が存在しない部位と一致する配列もあり、必ずしも既知遺伝子の一部というわけではなかった。公共データベースを利用して CSCT 内の遺伝子の発現を調べると、多くの遺伝子は脳での発現が高かった。マウス成体の全身の臓器において CSCT2 内遺伝子の発現を RT-PCR で検出し、脳に強い発現があることを確認した。CSCT2 欠損マウスのヘテロ接合体同士の交配により、ホモ接合体はメンデルの法則に従って生まれ、形態や成長に異常を認めなかった。脳機能を調べるため、行動解析 (オープンフィールド試験、プレパルス・インヒビション、社会性 3 チャンバーテスト、ガラス玉覆い隠しテスト、高架式十字迷路、Y 字迷路) を行った。社会性 3 チャンバーテストで、ホモ接合体は社会行動が増加する傾向と活動量が低下する傾向が見られた。ホモ接合体における発現変動を調べるため、RNA-seq により ES 細胞で網羅的発現解析を行った。その結果、偽遺伝子や反復配列であるサテライト DNA の発現上昇が見られた。また、定量 RT-PCR によりホモ接合体 ES 細胞では、レトロトランスポゾン (L1, LTR レトロトランスポゾン) の発現が上昇しており、CSCT2 の KRAB-ZFP 遺伝子群の除去により発現抑制を解かれた結果であることが示唆された。

(2) CSCT4 の解析

CSCT4 は、4 番染色体上の 2.1Mbp の範囲で、Ayu21-T324 トラップ配列 (167nt) を調べると、29 カ所あった。既知遺伝子は 21 存在し、その約 92% は KRAB-ZFP 遺伝子であった。CSCT2 同様、既知遺伝子配列とは必ずしも一致しなかった。公共データベースを利用して CSCT4 内の既知遺伝子の発現を調べたところ、多くの遺伝子はユビキタスであるが精巣および胎盤で比較的高い発現を示していた。全身の臓器において CSCT4 内遺伝子の発現を RT-PCR で検出し、精巣および胎盤で高い発現を示すことを確認した。ヘテロ接合体同士の交配により、ホモ接合体はメンデルの法則に従って生まれ、形態や成長に顕著な異常を認めなかった。CSCT4 内の遺伝子が精巣で高い発現を示す傾向があることから、精巣重量を調べたが、野生型と有意

差はなかった。また、生殖能や胎児の成長への影響を解析するため、ホモ接合体同士の交配を行い産仔数と産仔の形態を観察したが、野生型同士の交配による結果と有意差はなかった。

本研究において、(1) トラップ配列は、既知遺伝子の一部とは限らず既知遺伝子とは独立した発現が見られること、(2) それらの領域の遺伝子は、ES細胞だけでなく成体においても発現し発現パターンが似ていること、(3) CSCT2欠損によりES細胞において偽遺伝子やサテライトDNA、また、一部のレトロトランスポゾンの発現が増加すること、がわかった。ただし、CSCT2とCSCT4は、これらの欠損マウスには顕著な表現型が見られなかったため、マウス個体の生存や成長には必須ではないと考えられた。今後は、トラップ配列と既知遺伝子の関係性や、CSCTはマウス亜種間や生物間で共通するのかといった疑問もあるため、引き続き解析を続ける。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeda Iyo, Araki Masatake, Ishiguro Kei ichiro, Ohga Toshinori, Takada Kouki, Yamaguchi Yusuke, Hashimoto Koichi, Kai Takuma, Nakagata Naomi, Imasaka Mai, Yoshinobu Kumiko, Araki Kimi	4. 巻 26
2. 論文標題 Gene trapping reveals a new transcriptionally active genome element: The chromosome specific clustered trap region	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 874 ~ 890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉信 公美子, 川下 真奈, 荒木 喜美, 荒木 正健
2. 発表標題 マウスゲノム領域 "CSCT" の特徴
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木喜美, 吉信公美子, 荒木正健
2. 発表標題 ゲノム編集を用いた2-3MbにもわたるKRAB-ZNFクラスター領域の欠損アレルの作製
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第6回大会 (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉信公美子, 橋本紘一, 甲斐拓篤, 荒木喜美, 荒木正健
2. 発表標題 Potential for a functional region of the mouse genome
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本紘一, 武田伊世, 甲斐拓篤, 吉信公美子, 荒木喜美, 荒木正健
2. 発表標題 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(CSCT4)の解析
3. 学会等名 日本遺伝学会 第92回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 甲斐拓篤, 武田伊世, 橋本紘一, 吉信公美子, 荒木喜美, 荒木正健
2. 発表標題 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(CSCT4)の解析
3. 学会等名 日本遺伝学会 第92回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>生命資源研究・支援センターゲノム機能分野 研究内容 http://irda.kuma-u.jp/divisions/bioinformatics/ 可変型遺伝子トラップクローンデータベース (EGTC) http://egtc.jp/action/main/index 熊本大学生命資源研究・支援センター ゲノム機能分野 http://irda.kuma-u.jp/divisions/bioinformatics/</p>

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
研究分担者	荒木 正健 (Araki Masatake) (80271609)	熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授 (17401)	

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
---------	---------