

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06602

研究課題名(和文) ゲノム編集を利用した非コードDNAによるインスレーター機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of insulator function of non-coding DNA using genome editing

研究代表者

坂本 尚昭 (Naoaki, Sakamoto)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・准教授

研究者番号：00332338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：インスレーターの物理的特性と作用機構を明らかにすることを目的とした。広範囲の欠失変異導入が可能なCRISPR-Cas3のウニへの適用を試みたが成功に至らず、さらなる改善が必要なことがわかった。さらに、ノックインを利用した機能欠失を目指したが、ノックイン産物は検出されるものの、その効率は非常に低かった。NHEJを阻害する様々な処理を施したが、顕著な効率改善は得られなかった。DNA塩基配列の物理的特性とインスレーター活性の相関を調べるために、様々な物理的特性を示すラムダDNAを用いて、それぞれがエンハンサー/プロモーター間コミュニケーションに対して異なる効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウニは、ヒトを含む新動物の祖先型の動物であり、その進化的位置付けからもゲノムの進化を考える上で重要な動物である。ゲノム編集の活用により、内在の染色体環境下で遺伝子の発現制御機構について解析できるシステムが構築できれば、より正確なゲノム機能を解析でき、膨大な非コードDNAの役割とその進化を明らかにできると考えられる。また、ウニにおけるゲノム編集技術の適用法がさらに広まるれば、有用品種の作出など産業面でも価値のあることであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the physical properties and mechanism of action of the insulator. We attempted to apply CRISPR-Cas3, which can introduce a wide range of large deletion mutations, to sea urchins, but it was not successful, indicating that further improvement is needed. Furthermore, we tried to use knock-in for functional deletion, but although knock-in products were detected, their efficiency was very low. Various treatments to inhibit NHEJ were carried out, but no significant improvement in efficiency was obtained. To correlate physical properties of DNA with their insulator activity, we used lambda DNAs exhibiting various physical properties, and we found that each of them had a different effect on enhancer/promoter communication.

研究分野：分子生物学

キーワード：インスレーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム中の個々の遺伝子は、エンハンサーやサイレンサーといった調節配列により適切な時期に適切な組織で発現するよう調節される。エンハンサーとプロモーターを適切に相互作用させるには、インスレーターの作用が重要である。一般にインスレーターの機能には結合タンパク質が重要であるが、我々は DNA 自体の物理的特性が重要と考えられる *Ars* インスレーターの作用機構について研究してきた。また、非コード DNA の反復配列の中には、ヌクレオソームを排除する性質をもち、さらにインスレーター活性を有するものが知られている。よって、ゲノムを構成する膨大な非コード DNA には、インスレーターとしてゲノム機能発現に寄与するものが他にも存在する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*Ars* インスレーターや非コード DNA に存在する反復配列の物理的特性とインスレーター活性、ゲノム機能発現との相関を解明し、ゲノム区画化の本質的特性を理解することである。そこで、近年急速に発展してきたゲノム編集技術を利用し、本研究を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) ゲノム編集による内在の *Ars* インスレーターへの変異導入

CRISPR-Cas9 による *Ars* インスレーターへの変異導入を行い、*HpArs* 遺伝子およびインスレーターを挟んで隣接する Forkhead box protein D1 遺伝子の発現パターンへの影響を、定量的 RT-PCR や in situ ハイブリダイゼーションにより解析する。

(2) ゲノム編集を用いたノックインによる *Ars* インスレーターの機能解明

CRISPR-Cas9 を用いたノックインにより、内在の *Ars* インスレーターの AT-rich コア領域を各種反復配列や非コード DNA 配列に置換し、Forkhead box protein D1 遺伝子の発現パターンへの影響を解析する。

(3) レポーターアッセイによる各配列のインスレーター活性の測定

バフウニ *HpArs* 遺伝子のプロモーターと C15 エンハンサーにより発現制御されるルシフェラーゼレポーター遺伝子がある。このエンハンサーとプロモーターの間に様々な物理的特性をもち DNA 配列を挿入し、これをウニ胚に導入してエンハンサー遮断活性を測定する。これにより、上記の DNA 物理的特性とインスレーター活性との相関を明確にする。

4. 研究成果

(1) ゲノム編集による内在の *Ars* インスレーターへの変異導入について

CRISPR-Cas9 システムにより *Ars* インスレーター内への欠失変異導入を試みたが、導入される欠失変異が小規模なものであり、*Ars* インスレーターの機能欠失を導入するのが困難であった。そこで、より広範囲の欠失変異導入が可能な CRISPR-Cas3 システムのウニへの適用を試みた。システムを構成する各因子 (Cse1, Cse2, Cas3, Cas5, Cas6, Cas7) が連結した Cascade の mRNA、もしくは別々の mRNA を作製してウニ胚に導入したが、どちらにおいても現時点では成功には至らなかった。ガイド RNA の作製法等に改善の余地があるため、今後もさらに研究を進める予定である。

(2) ゲノム編集を用いたノックインによる *Ars* インスレーターの機能解明について

ゲノム編集によるノックインを利用した *Ars* インスレーターの機能欠失を行うために、まずはウニにおける CRISPR-Cas9 を用いたノックイン法の確立を試みた。*Pks1* 遺伝子を標的としたドナーベクターの作製を行い、750 bp のホモロジーアームをもち HDR 修復用ベクターに加え、40 bp 程度の短いホモロジーアームを用いる MMEJ 修復用のベクターを作製し、Cas9 mRNA および sgRNA とともにウニ卵に共導入した。PCR によりノックインの成否を確認したところ、どちらのドナーベクターを用いた場合でもノックインが行われたことを示す PCR 産物は検出されるものの、ベクター中に含まれる GFP の蛍光は検出されなかったため、効率が非常に低いと判断された。ドナーベクターにルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合でも同様に、ノックインは検出されるものの、その活性は非常に低かった。

相同組換えによるノックイン効率を上昇させるために、ドミナントネガティブ型 DNA Ligase IV mRNA の共注入も行ったが、顕著な効果は得られなかった。Cas9 ニッカークゼ (nCas9) の適用も試みたが、顕著な効果は得られなかった。さらに、NHEJ の阻害剤である NU7026 の存在下でノックイン操作を施したウニ胚を培養したが、現在のところ顕著な効率改善は得られず、さらなる条件検討が必要であると考えられた。

(3) レポーターアッセイによる各配列のインスレーター活性の測定について

Ars インスレーター (578 bp) の物理的特性とインスレーター活性の相関を調べるために、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーター解析を行なった。*Ars* インスレーターはもともと、方向依存性があると報告されていた。しかし我々は、レポーターシステムの再構築を行い、レポーターのバックボーンを揃えれば、方向依存性は観察されないことを明らかにした。また、エンハンサー/プロモーター間に挿入した *Ars* インスレーターの両側の配列の違いにより、インスレーター活性の強さに差が出ることを見出した (図 1)。

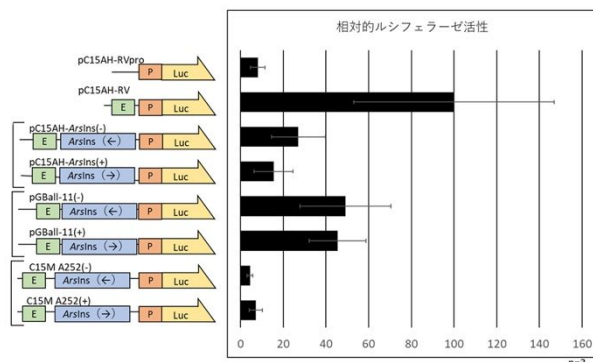


図 1: *Ars* インスレーターに方向依存性はないが、周辺の配列構成により効果が異なる

さらに、*Ars* インスレーターの比較対象となる 5 つのラムダ DNA 配列 (578 bp) を用意した。これらの配列を PCR で増幅し、同じ長さの DNA 断片をポリアクリルアミドゲルで電気泳動したところ、それぞれの配列が異なる移動度を示した (図 2)。これは、それぞれの配列が異なる物理的特性をもつことを示している。

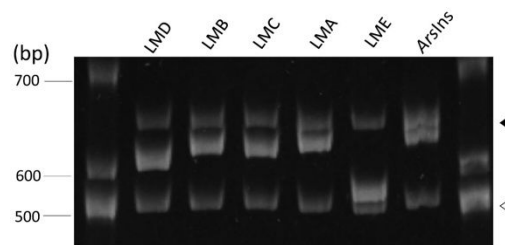


図 2: 様々なラムダ DNA 断片のポリアクリルアミドゲル電気泳動

これらの配列をエンハンサー/プロモーター間に挿入し、レポーター解析を行なったところ、各配列のエンハンサー/プロモーター間相互作用に対する効果も異なることが明らかとなった (図 3)。さらに、同領域を含む約 2000 bp のラムダ DNA 配列を調製してエンハンサー/プロモーター間相互作用に対する効果を調べたところ、どの配列を用いてもエンハンサー活性が大きく低下した。しかし内在の *HpArs* 遺伝子ではエンハンサー/プロモーター間は約 2000 bp 離れているため、*HpArs* 遺伝子の内在の配列にはエンハンサー/プロモーター間のコミュニケーションを円滑にするための配列要素が含まれると考え、現在解析を進めている。

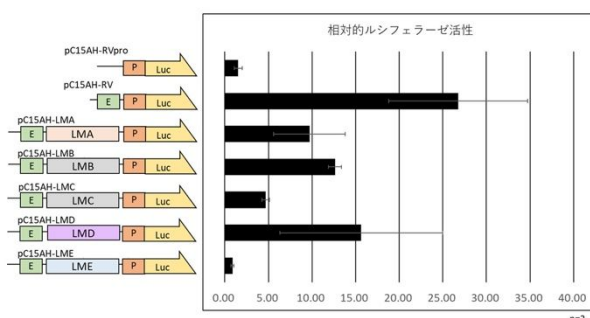


図 3: 様々なラムダ DNA 断片のエンハンサー/プロモーター間相互作用に対する影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaichi Watanabe, Yuhei Yasui, Yuta Kurose, Masashi Fujii, Takashi Yamamoto, Naoaki Sakamoto, Akinori Awazu	4. 巻 27(6)
2. 論文標題 Partial exogastrulation due to apical-basal polarity of F-actin distribution disruption in sea urchin embryo by omeprazole	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 392-408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12934	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii S, Tago T, Sakamoto N, Yamamoto T, Satoh T, Satoh AK	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Recycling endosomes associate with Golgi stacks in sea urchin embryos.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communicative & Integrative Biology	6. 最初と最後の頁 59-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19420889.2020.1761069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Pieplow A, Dastaw M, Sakuma T, Sakamoto N, Yamamoto T, Yajima M, Oulhen N, Wessel GM	4. 巻 472
2. 論文標題 CRISPR-Cas9 editing of non-coding genomic loci as a means of controlling gene expression in the sea urchin.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 85-97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2021.01.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 坂本尚昭, 渡辺開智, 粟津暁紀, 山本卓
2. 発表標題 ムラサキウニにおけるCRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集
3. 学会等名 日本ゲノム編集学第7回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中川 春風, 高木 春奈, 立本 小百合, 粟津 暁紀, 山本 卓, 坂本 尚昭
2. 発表標題 エンハンサー・プロモーター間のDNA特性による転写活性化への影響
3. 学会等名 日本動物学会 第92回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺 開智, 安井 優平, 黒瀬 友太, 坂本 尚昭, 粟津 暁紀
2. 発表標題 ウニ胚形態形成の細胞骨格観察に基づくモデル化
3. 学会等名 日本動物学会 第92回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中前 和恭, 武永 充正, 中出 翔太, 名塚 一郎, 粟津 暁紀, 坂本 尚昭, 佐久間 哲史, 山本 卓
2. 発表標題 MaChIAto: CRISPRによるゲノム編集結果と標的のゲノム特性との関連性プロファイリングツール
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 Nakamae K, Takenaga M, Nakade S, Nazuka I, Awazu A, Sakamoto N, Sakuma T, Yamamoto T
2. 発表標題 Extended analysis of amplicon sequencing data with MaChIAto for Prime Editing
3. 学会等名 CSHL meeting - Genome Engineering: CRISPR Frontiers (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	Sakura T, Nakamae K, Takenaga M, Nakade S, Mitsuhashi T, Nazuka I, Awazu A, Sakamoto N, Yamamoto T
2. 発表標題	MaChIAto: detailed profiling tool for various genomic features affecting the efficacy of gene knockout, homology-based knock-in, and Prime Editing
3. 学会等名	CRISPR and Beyond (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	安井優平, 杉山文香, 坂本尚昭, 栗津暁紀
2. 発表標題	ウニの発生初期における核内染色体構造の動的および細胞特異的变化
3. 学会等名	第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	渡辺開智, 黒瀬友太, 安井優平, 坂本尚昭, 栗津暁紀
2. 発表標題	ウニ胚形態形成の細胞骨格観察に基づくモデル化
3. 学会等名	第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	今田実子, 杉山文香, 林紗弥香, 渡辺開智, 安井優平, 坂本尚昭, 栗津暁紀
2. 発表標題	ウニ初期胚の核及び核内動態の蛍光イメージング観察・解析
3. 学会等名	第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名 小田竜平, 藤井雅史, 坂本尚昭, 粟津暁紀
2. 発表標題 ArsInsC配列及びDNA反復配列の物理的特性・機能性解析
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺開智, 黒瀬友太, 安井優平, 坂本尚昭, 粟津暁紀
2. 発表標題 ウニ胚形態形成の細胞骨格観察に基づくモデル化
3. 学会等名 日本動物学会 第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安井優平, 杉山文香, 坂本尚昭, 粟津暁紀
2. 発表標題 ウニの発生初期における核内染色体構造の動的および細胞特異的变化
3. 学会等名 日本動物学会 第91回大会
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	粟津 暁紀 (Awazu Akinori) (00448234)	広島大学・統合生命科学研究科(理)・准教授 (15401)	

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