

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830138

研究課題名(和文) 新規な一塩基置換導入法の確立と疾患関連SNPの機能解析への応用

研究課題名(英文) Establishment of novel method for introduction of single-nucleotide substitution and application of the method to identification of mutation causing hereditary disease

研究代表者

落合 博(Ochiai, Hiorhi)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：60640753

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)：染色体早期解離(PCs)症候群は、染色体異数性と高発がん性を特徴とする希少な常染色体劣性遺伝病である。本疾患の原因の一つはBUBR1タンパク質の機能低下である。我々は日本人PCS患者家系において、本疾患発症と極めて相関の高い一塩基置換を、BUBR1遺伝子上流44kbの位置に見出した。本塩基置換が疾患の原因か否かを調べるために、TALENを利用した一塩基置換法を確立し、ヒト培養細胞に本塩基置換を導入した。一塩基置換導入細胞において、PCS症候群患者細胞に特有な形質が認められたことから、本置換が疾患の原因変異であることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Premature chromatid separation (PCS) syndrome is a rare autosomal recessive disorder characterized by constitutional aneuploidy and a high risk of childhood cancer. One of the causes of the disease is functional insufficiency of BUBR1 protein. We found a unique single nucleotide substitution in an intergenic region 44 kb upstream of a BUB1B transcription start site, which cosegregated with the disorder. To examine whether this is the causal mutation, we designed a TALEN-mediated two-step single-base pair editing strategy and biallelically introduced this substitution into cultured human cells. The cell clones showed reduced BUB1B transcripts, and increased PCS frequency, which are the hallmarks of the syndrome. These results suggested that the nucleotide substitution identified was the causal mutation of PCS syndrome.

研究分野：分子生物学

キーワード：TALEN 一塩基多型 一塩基置換 ゲノム編集 遺伝子ターゲティング PCS 遺伝性疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者らは、染色分体早期解離 (PCS) 症候群の発症機序について研究を行っていた。本疾患は BUBR1 タンパク質の発現量低下によって引き起こされることが知られていた。最近、BUBR1 タンパク質をコードする *BUB1B* 遺伝子の上流 44 kb の位置に疾患と相関する一塩基置換 (ss804270619-G/A) を見出した。このケースを含め、これまでに報告されている疾患関連多型の多くは非エクソン領域中に存在し、それ自身が疾患に直接関与しているのか否かを実験的に判定することは極めて困難だった (Maurano *et al.*, *Science*, 2012)。非エクソン領域中に存在する一塩基多型 (SNP) の疾患発症への直接的関与を証明する一つの方法は、ヒト培養細胞の当該 SNP サイトに一塩基置換を導入し、その影響を調べることだが、効率的な一塩基置換導入法が確立されていないのが現状であった。

(2) 近年、zinc-finger nuclease (ZFN) や transcription activator-like effector nuclease (TALEN) などの人工 DNA 切断酵素 (人工ヌクレアーゼ) を利用して、さまざまな生物種において標的部位に変異を導入したり、標的部位に外来遺伝子を挿入したりすることが可能となってきた。また、これら人工ヌクレアーゼと一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN) を組み合わせることで、標的とする領域へ高効率に一塩基置換を導入することが可能となった (Chen *et al.*, *Nat Methods* 2011; Soldner *et al.*, *Cell*, 2011; Wefers *et al.*, *PNAS*, 2013)。しかし、この手法では標的塩基以外にも置換を導入し、人工ヌクレアーゼによる再切断を抑制する必要があるため、厳密に言うと完全な一塩基置換導入法ではない。ヒトにおいて、多くが機能未知である非エクソン領域中に存在する疾患関連 SNP の機能解析には、標的の一塩基のみを置換する技術が求められていた。

2. 研究の目的

本研究は、人工ヌクレアーゼを利用した新規の一塩基置換導入法の確立を目的としている。また、本法を応用し、PCS 症候群の発症と関連する SNP (ss804270619-G/A) を導入したヒト培養細胞株を樹立し、その表現型を解析することによって、本多型と PCS 症候群発症の因果関係を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト結腸がん細胞 HCT116 に人工ヌクレアーゼ TALEN を利用して、PCS 症候群の発症と関連する SNP を導入した。この細胞株における BUBR1 発現量および染色体解析を行った (Ochiai *et al.*, *PNAS*, 2014)。

4. 研究成果

(1) これまでに人工ヌクレアーゼとターゲ

ティングベクター、あるいは ssODN を利用して一塩基置換をヒト培養細胞に導入する技術がいくつか報告されていた (Yusa *et al.*, *Nature*, 2011; Soldner *et al.*, *Cell*, 2011; Chen *et al.*, *Nat Methods*, 2011)。前者ではターゲティングベクターを利用してセレクションカセットと目的一塩基置換を導入し、後にセレクションマーカーを Cre/*loxP* システムあるいは *piggybac* トランスポゾンシステムを利用して除去する手法である。しかし、除去後に *loxP* 配列あるいは TTAA 塩基配列が残ってしまうため、正確な一塩基置換が難しかった。一方後者では、比較的効率的に標的一塩基置換を導入できるという利点があるが、それ以外に人工ヌクレアーゼ結合配列に変異を導入し、再切断を防ぐ必要があるため、こちらも正確な一塩基置換導入法とは言いがたかった (Chen *et al.*, *Nat Methods*, 2011)。タンパク質をコードする領域への塩基置換導入であれば、近傍に同義変異を導入したとしても細胞へ大きな影響を与えないことが容易に想像できるため、ssODN を利用した塩基置換導入法が有効である (Chen *et al.*, *Nat Methods*, 2011)。しかし、機能未知の遺伝子間領域へ一塩基置換を導入し、その影響を調べるためには、目的塩基以外の領域に塩基変化を導入することは避けるべきである。そこで我々は、下記のような手法を利用することで、目的の一塩基置換のみを導入できると考えた。

(2) まず、人工ヌクレアーゼ TALEN を利用して標的一塩基置換領域にセレクションカセットを導入する。ターゲティングベクター上にはピューロマイシン耐性遺伝子と *hsvTK* 遺伝子が含まれている。ピューロマイシン耐性遺伝子が発現することで、このセレクションカセットが導入されることで細胞がピューロマイシンに対して耐性を獲得する。一方 *hsvTK* 遺伝子は、ガンシクロビル処理によって細胞に対して毒性のある物質を産生することから、ガンシクロビル処理によってセレクションカセットを含まない細胞のみが生存可能となる。その後、別の TALEN セットとターゲティングベクターを利用してセレクションカセットの除去と一塩基置換の導入 (ss804270619-A)、または健常者型塩基 (ss804270619-G) の再導入を行う。前者は疾患モデル細胞となり、後者は表現型を調べるための重要なコントロールとなる。

(3) まず、上記の TALEN とターゲティングベクターをヒト培養細胞 HCT116 に導入し、ピューロマイシンで薬剤選抜を行った。コロニーをピックアップし、ゲノミック PCR によって両対立遺伝子にセレクションカセットが導入されたものを選定した。さらにサザンブロットティングによりランダムインテグレーションが起こっていない細胞 (TP1) を選出した。次に、セレクションカセットとゲノム領域の境界を認識する TALEN と一塩基置換 (ss804270619-A) あるいは健常者型

(ss804270619-G)の配列を持つターゲティングベクターを作製し、TP1細胞に導入した。ガンシクロビルでセレクションを行い、いくつかのコロニーをピックアップした。ゲノミックPCRおよびサザンブロットングにより、両対立遺伝子においてセレクションカセットが除去されたクローンを選び出した。これらのクローンにおいて標的一塩基置換領域の塩基配列を決定したところ、一塩基置換導入細胞(TV-A1, TV-A2)では塩基置換(A)が、野生型導入細胞(TV-G1, TV-G2)では(G)になっていることがわかった。このように、ヒト培養細胞において一塩基置換を導入することに成功した。

(4) 次に、一塩基置換導入細胞においてPCS症候群で認められる特徴的な細胞表現型の有無を調べた。BUBR1発現量をウェスタンブロットで解析したところ、大多数の健常者が持つ一塩基多型領域(ss804270619)がG塩基であるTV-G1およびTV-G2では、コントロール細胞のHCT116と大きな差が認められなかった。一方、ss804270619がA塩基に置換された細胞株、TV-A1およびTV-A2細胞では有意にBUBR1タンパク質の減少が認められた。BUB1B mRNA発現量を逆転写定量PCRによって調べたところ、タンパク質発現量と同様の傾向が認められた。次に、染色体数および染色体分体早期解離(PCS)頻度を調べた。ここで、BUBR1減少細胞のコントロールとして構成的にBUB1B shRNAを発現する細胞(BUB1B shRNA)を樹立した。HCT116における染色体数分布は以前の報告と同様であった(Kienitz *et al.*, *Oncogene*, 2005)。HCT116と比べて、TV-G1およびTV-G2では大きな差が見られなかったものの、TV-A1およびTV-A2では高い異数性が認められた。異数性はPCS症候群の患者細胞において顕著に認められる形質の一つである。次に、PCS頻度を調べた。TV-A1およびTV-A2ではコントロールと比べて高頻度のPCSが認められた。次に、コルセミド処理による紡錘体形成チェックポイント機能を調べた。BUBR1タンパク質は、分裂期中期において紡錘体が全ての動原体に結合したかどうかを監視する働きがある。そのため、通常の細胞であれば微小管脱重合剤であるコルセミド処理によって分裂期で停止するが、BUBR1発現量が低下している場合はチェックポイントをすり抜け、分裂期が進んでしまう。各細胞株でコルセミド処理後の分裂指数を調べたところ、TV-G1およびTV-G2ではコントロールHCT116細胞と同様の分裂指数を示したが、TV-A1およびTV-A2では分裂指数の低下、すなわちチェックポイントのすり抜けが認められた。これらの結果から、BUBR1上流に存在する一塩基置換がBUBR1発現量の低下に直接関わっていることが明らかとなり、またPCS症候群の発症原因となっていることが強く示唆された。

<引用文献>

Maurano *et al.*, Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA, *Science*, 337, 2012, 1190-1195
Chen *et al.*, High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nuclease, *Nat Methods*, 8, 2011, 753-755
Soldner *et al.*, Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations, *Cell*, 146, 2011, 318-331.
Wefers *et al.*, Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 2013, 3782-3787.
Ochiai *et al.*, TALEN-mediated single-base-pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 2014, 1461-1466.
Yusa *et al.*, Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells, *Nature*, 478, 2011, 391-394.
Kienitz *et al.*, Partial downregulation of MAD1 causes spindle checkpoint inactivation and aneuploidy, but does not confer resistance towards taxol, *Oncogene*, 24, 2015, 4301-4310.

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6件)

Miyamoto T, Hosoba K, Ochiai H, Royba E, Izumi H, Sakuma T, Yamamoto T, Dynlacht BD, Matsuura S, The microtubule depolymerizing activity of a mitotic kinesin protein KIF2A drives primary cilia disassembly coupled with cell proliferation, *Cell*

Rep, 10, 2015, 664-673. 査読有り
DOI:10.1016/j.celrep.2015.01.003
落合 博, 松浦 伸也, 新規一塩基置換
導入法による高発がん性遺伝病の原因
変異の同定, 医学のあゆみ, 252, 2015,
153-158.

https://www.ishiyaku.co.jp/magazine
s/ayumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=
925202&AC=14570 査読無し

Ochiai H, Sugawara T, Sakuma T,
Yamamoto T, Stochastic promoter
activation affects Nanog expression
variability in mouse embryonic stem
cells, Sci Rep, 4, 2014, 7125.

DOI:10.1038/srep07125. 査読有り

Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba
K, Sakuma T, Kudo Y, Asami K, Ogawa A,
Watanabe A, Kajii T, Yamamoto T,
Matsuura S, TALEN-mediated
single-base-pair editing
identification of an intergenic
mutation upstream of BUB1B as
causative of PCS (MVA) syndrome, Proc
Natl Acad Sci U S A, 111, 2014,
1461-1466. 査読有り

DOI:10.1073/pnas.1317008111

落合 博, 哺乳類培養細胞における
TALEN を用いた遺伝子改変～マウス ES
細胞における遺伝子ターゲティングを
例に, 実験医学別冊 最強のステップ
UP シリーズ 今すぐ始めるゲノム編集
TALEN&CRISPR/Cas9 の必須知識と実験
プロトコル, 40, 2014, 62-72. 査読
無し

Suzuki KT, Isoyama Y, Kashiwagi K,
Sakuma T, Ochiai H, Sakamoto N, Furuno
N, Kashiwagi A, Yamamoto T, High
efficiency TALENs enable F0
functional analysis by targeted gene
disruption in Xenopus laevis embryos,
Biol Open, 2, 2013, 448-452.

DOI:10.1242/bio.20133855 査読有り

[学会発表](計5件)

Hiroshi Ochiai, Takeshi Sugawara,
Takashi Yamamoto, Simultaneous
live-imaging of gene position and its
transcriptional activity in mouse
embryonic stem cells, 4D Nucleome

2014/12/17-2014/12/20, Hiroshima,
Japan

Hiroshi Ochiai, Takeshi Sugawara,
Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto,
Stochastic promoter activation
affects gene expression variability
in murine embryonic stem cell, Cold
Spring Harbor Laboratory meeting 2014
NUCLEAR ORGANIZATION & FUNCTION,
2014/8/19-2014/8/23, NY, USA

Hiroshi Ochiai, TALEN-mediated
single-base-pair editing in PCS
syndrome, 3rd International Genome
Engineering & Genome Editing-2014
Meeting on 'Synthetic Biology to Zinc
Finger Nucleases & CRISPRs
Regulation', 2014/5/5-2014/5/6,
Boston, USA

Hiroshi Ochiai, TALEN-mediated
single-base-pair editing reveals the
functional significance of an
intergenic single nucleotide variant,
International Symposium on RNAi and
Genome Editing Research,
2014/3/14-2014/3/16, Tokushima,
Japan

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計2件)

名称:細胞の作製方法および該作製方法で作
製された細胞
発明者:落合博、山本卓
権利者:同上
種類:特許
番号:特願 2015-080648
出願年月日:平成27年4月10日
国内外の別:国内

名称:DNA結合ドメインを含むポリペプチ
ド
発明者:佐久間哲史、山本卓、落合博、松浦
伸也、宮本達雄
権利者:同上
種類:特許
番号:特願 2013-166768
出願年月日:平成25年8月9日
国内外の別:国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/chem/ja/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

落合 博 (OCHIAI, Hiroshi)

広島大学 理学研究科・特任講師

研究者番号：60640753

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし