

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：38005

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650087

研究課題名(和文) CRISPRiシステムを用いたシス制御領域の新規機能解析法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a new method for functional analysis of cis-regulatory modules using CRISPRi

研究代表者

安岡 有理 (Yasuoka, Yuuri)

沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミクスユニット・研究員

研究者番号：70724954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：シス制御領域の胚発生におけるin vivoでの機能を、短期間で効率よく解析する有効な実験手法はいまだ確立されていない。そこで、ヌクレアーゼ活性欠失型Cas9(dCas9)を用いたCRISPRiによって、シス制御領域の機能解析が可能かどうかを、ツメガエル胚を用いて検討した。ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、dCas9をmRNAの顕微注入によって発現させても、タンパク質をそのまま顕微注入しても、レポーターの発現にCRISPRiはほとんど影響を与えなかった。この結果は、ツメガエル胚に内在する転写制御装置が、DNAに結合しているdCas9を容易に押し出してしまうことを意味している。

研究成果の概要(英文)：It is important to analyze in vivo functions of cis-regulatory modules during embryogenesis. However, quick and effective methods for such analysis have never been established. Therefore, I examined whether CRISPRi by a dead Cas9 protein (dCas9) can regulate activities of cis-regulatory modules using *Xenopus* embryos. Luciferase reporter assays were performed using both dCas9 mRNA and protein. The data showed that CRISPRi could not affect the reporter gene expression. This result suggests that endogenous transcriptional machineries can bump CRISPRi/dCas9 from DNA.

研究分野：発生生物学・進化生物学

キーワード：ゲノム編集 転写制御 ツメガエル

1. 研究開始当初の背景

動物の胚発生において、ゲノム上のシス制御領域 (CRM) は、発生制御遺伝子の発現量、時期、領域を精密に制御する極めて重要な配列である。近年、多くの動物のゲノムが解読され、進化的に保存された CRM が数多く解析されてきた。さらに、クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) 解析によって、転写因子の結合領域すなわち CRM がゲノムワイドに同定できるようになった。我々もこれまでの研究成果において、脊椎動物初期発生における転写因子のゲノム結合領域を、ネットアイツメガエル胚を用いた ChIP-seq 解析によって明らかにしてきた (Yasuoka et al., 2014, Nature Communications)。しかし、これらの解析によって発見された CRM の胚発生における *in vivo* での機能を、短期間で効率よく解析する有効な実験手法はいまだ確立されていない。

そこで、近年盛んに研究されているゲノム編集技術の中から、CRISPR-Cas9 システムに着目した。これは、細菌由来の Cas9 ヌクレアーゼタンパク質が、guide RNA (gRNA) と呼ばれる短い RNA と複合体を作り、gRNA に含まれる 20 塩基の標的配列と相補的な DNA 配列に結合して、二本鎖 DNA を切断するものである。さらにこれから派生した手法として、ヌクレアーゼ活性欠失型 Cas9 (dCas9) を gRNA によって転写開始部位近傍に恒常的に結合させて転写阻害を行う CRISPR interference (CRISPRi) も報告された (Qi et al., 2013, Cell, Gilbert et al., 2013, Cell)。これを発生学実験に発展させることで、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

比較ゲノム解析や ChIP-seq 解析で発見された CRM の胚発生における活性は、レポーター解析を用いて調べるのが現在の主流である。しかし、レポーター解析は外来 DNA を用いて個々の CRM の活性を検討するものであり、本来の複雑なゲノム環境における実際の標的遺伝子の発現変動は捉えられない。また、ゲノム編集技術による CRM 破壊は不可逆的であり、遺伝子破壊のようにコドン異常で簡単に評価できない上、次世代交配が必要になると手間がかかり汎用性も低い。こういった CRM 機能解析における多くの問題点を、胚発生において特定のゲノム領域に可逆的に外来タンパク質を結合させる CRISPRi によって解決を図る (図 1)。

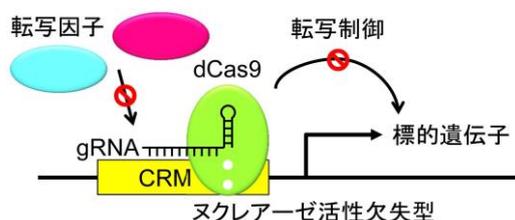


図 1 : CRISPRi による CRM 機能阻害

発生制御遺伝子の周辺には多数 (5-20) の CRM が存在しており、それらの複合的な相互作用によって、胚の特定の領域における遺伝子発現は制御されている (Yasuoka et al., 2014; Schwaiger et al., 2014)。このような複雑な制御機構を調べるためには、同時に多重的なゲノム領域機能阻害を行う方法が必須である。ゲノム編集技術の中で、CRISPRi では発現させるタンパク質が dCas9 一つだけであり、複数の gRNA を加えることで複数サイトに作用させられるため、多重的な機能阻害が迅速かつ容易である。この利点を活かし、CRISPRi による多重的 CRM 機能解析法を確立する。

CRISPRi 実験を複数の動物種を用いて行うことで、手法の一般性を検討する。さらに、F0 世代を主に解析に用いることで、遺伝学的解析の難しい動物種においても、胚発生における CRM の役割を *in vivo* で効率よく解析できる手法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 外来 DNA を用いた解析

dCas9 をコードした mRNA (もしくは dCas9 タンパク質) と gRNA を、レポーター DNA とともにツメガエル胚に顕微注入し、CRISPRi による CRM 機能阻害を試みる。まずは、既知の CRM を組み込んだ外来レポーターカセットを用いて、CRM 配列に CRISPRi を作用させたときのレポーター遺伝子 (ルンフェラーゼ) の発現変動を検討する。dCas9 に転写活性化ドメイン (VP16) や転写抑制ドメインを融合させたコンストラクトも作成し、dCas9 が人工転写因子として遺伝子の活性化および抑制に作用できるのかも検討する。

(2) 内在 CRM に対する解析

ツメガエル胚の内在の CRM に対しても CRISPRi を試み、標的遺伝子の発現に変化があるかどうかを検討する。脊椎動物における発生時期・組織特異的なエンハンサーの同定が精力的になされている *otx2* 遺伝子をモデルに、CRISPRi による発現変動と表現型を解析する。単一の gRNA で効果が得にくいときは、複数の gRNA を顕微注入して複数モチーフ、あるいは複数エンハンサーの阻害を行い、その複合的な効果を検討する。CRISPRi の標的配列の特異性に関しては、タグ付き dCas9 に対する ChIP-seq 解析によって検討する。

(3) 発生時期特異的な解析

dCas9 にグルココルチコイドレセプター (GR) を融合し、デキサメタゾン (DEX) 処理によって核移行を制御して、CRM の時期特異的な解析を行う。

(4) 動物種横断的な解析

内在の CRM および遺伝子転写に対する CRISPRi を、ホヤおよびイソギンチャクの胚

を用いて行い、ツメガエルで確立した手法の一般性を検討する。遺伝子発現制御がよく解析されている遺伝子として、ホヤは *brachyury*、イソギンチャクは *chordin* をモデルに発現解析を行う。

4. 研究成果

(1) 各種発現コンストラクトの完成

dCas9 を動物胚で発現させるための各種発現コンストラクトを作成した。最も基本となるものとして、免疫沈降実験用に FLAG タグ、蛍光観察用に mVenus、核局在させるために核局在シグナル (NLS) を dCas9 に融合させたコンストラクトを作成した。このコンストラクトの mRNA をツメガエル胚動物極側に顕微注入して発現させたところ、期待通り dCas9 タンパク質の核局在が共焦点顕微鏡によって観察された (図 2)。

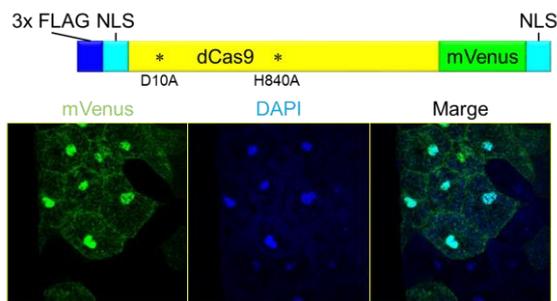


図 2: 核局在型 dCas9 のツメガエル胚における核への局在

さらに、任意の時期に dCas9 を核局在させられるよう、GR 融合型のコンストラクトも作成し、mRNA をツメガエル胚動物極側に顕微注入した。DEX 処理条件下での dCas9 の細胞内局在を検討した結果、DEX 処理によって GR 融合型 dCas9 の核局在が制御できることが示された (図 3)。

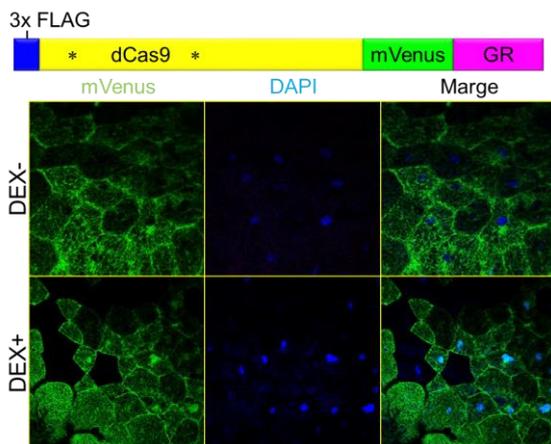


図 3: GR-DEX 系による dCas9 の核移行制御 (ツメガエル胚)

VP16 や enR ドメインを付加したコンストラクトも同時に作成し、当初計画していたコンストラクトはすべて完成した。

(2) ツメガエル胚において、CRISPRi は内在転写装置に駆逐される

CRISPRi がツメガエル胚において有効かどうかを調べるため、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った (図 4)。レポーターには SV40 late promoter をルシフェラーゼの上流にもつ pGL4p を使用した。ルシフェラーゼ遺伝子配列に対して数種類の gRNA を設計し (図 4 上)、dCas9 mRNA とともにレポーター DNA と共注入したところ、原腸胚まで発生させた段階でほとんどレポーター遺伝子の発現に変動はなかった (図 4 グラフ左)。VP16 や enR を融合させたコンストラクトでも、レポーターの発現にはほとんど影響しなかった (図 4 グラフ右)。また、複数の gRNA を導入して多重的に CRISPRi を作用させても、大きな発現抑制は見られなかった。

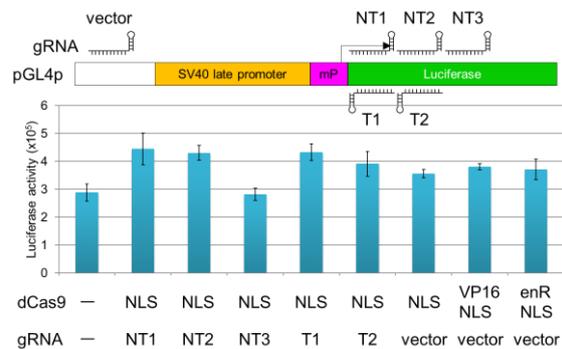


図 4: ツメガエル胚を用いたレポーターアッセイにおける CRISPRi の転写阻害効果 (dCas9 mRNA を顕微注入)

gRNA の活性 (DNA 結合能) が低い可能性も考えられたが、Cas9 タンパク質、gRNA、レポーター DNA を混ぜてインキュベートしたところ、どの gRNA でもレポーター DNA がほぼ完全に切断されていたので、少なくとも *in vitro* では Cas9 タンパク質が gRNA を介してレポーター DNA に結合できることが示された。

次に、mRNA による dCas9 の発現が不十分である可能性を考えて、dCas9 タンパク質を用いた CRISPRi を検討した (図 5)。dCas9 タンパク質をあらかじめ gRNA と混ぜておき、RNP を形成させてから顕微注入することで、効率よく標的配列に結合することが期待されたが、mRNA の場合と同様にレポーター遺伝子の発現量は CRISPRi によってほとんど変動しなかった。dCas9 タンパク質単独でなぜかレポーターの発現が減少したが、gRNA を加えても大きな変動がなかったため、dCas9 タンパク質による二次的な作用であると考えられる。Cas9 タンパク質を顕微注入した場合は、レポーター DNA が切断されたことによる大幅な発現減少が見られたので、*in vivo* でも Cas9 タンパク質は gRNA を介してレポーター DNA に結合できることが

示された。

CRMに対してCRISPRiを作用させる目的で、古典的 Wnt シグナルに応答するTOP-FLASH レポーターを用いた実験も行った。TOP-FLASH レポーターは、ルシフェラーゼレポーターの上流に Tcf 結合モチーフを複数もつので、この Tcf 結合モチーフに結合する gRNA を設計し、dCas9 の結合によって Tcf の作用が阻害されるかどうかを検討した。しかし、mRNA、タンパク質、どちらでも dCas9 を導入しても、レポーターの発現に対する CRISPRi の効果を検出することはできなかった (図 5)。Cas9 タンパク質を導入した場合は、上流配列の切断によって大きくレポーターの発現が減少したので、gRNA の DNA 結合能は十分であると考えられる。

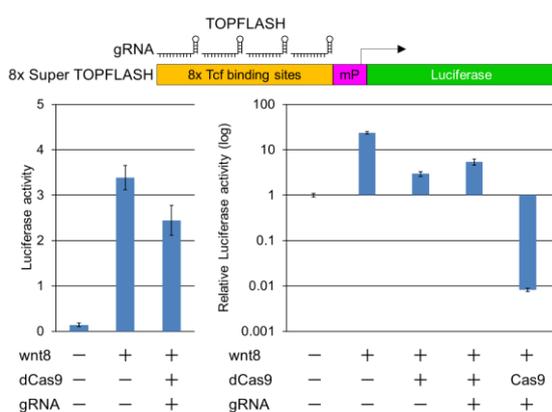


図 5 : ツメガエル胚を用いたレポーターアッセイにおける CRISPRi の CRM 機能阻害効果 (左のグラフは dCas9 mRNA、右のグラフは dCas9 または Cas9 タンパク質を顕微注入したときの結果)

これらの結果から、残念ながら CRISPRi を用いた新規 CRM 解析法の開発は失敗に終わった。外来 DNA で成果を得られなかったため、内在 CRM への作用や、ツメガエル以外の動物胚を用いた解析へとつなげることができなかったことも大変残念である。しかしながら今回の結果は、ツメガエル胚に内在する転写装置が、DNA に結合している dCas9 を容易に押し出し駆逐しうる、とも解釈できる。今後の発生学研究において同様の失敗を繰り返さないためにも、このことを報告し、コミュニティとして情報共有することで、より有効な手法の開発につなげていきたい。

<引用文献>

- ① Yasuoka Y, Suzuki Y, Takahashi S, Someya H, Sudou N, Haramoto Y, Cho KW, Asashima M, Sugano S, Taira M. (2014). "Occupancy of tissue-specific cis-regulatory modules by Otx2 and TLE/Groucho for embryonic head specification." *Nature Communications* 5: 4322.
- ② Qi, L. S.; Larson, M. H.; Gilbert, L. A.;

Doudna, J. A.; Weissman, J. S.; Arkin, A. P.; Lim, W. A. (2013). "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression". *Cell* 152 (5): 1173-83.

③ Gilbert, L. A.; Larson, M. H.; Morsut, L.; Liu, Z.; Brar, G. A.; Torres, S. E.; Stern-Ginossar, N.; Brandman, O.; Whitehead, E. H.; Doudna, J. A.; Lim, W. A.; Weissman, J. S.; Qi, L. S. (2013). "CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes". *Cell* 154 (2): 442-51.

④ Schwaiger M, Schonauer A, Rendeiro AF, Pribitzer C, Schauer A, Gilles AF, Schinko JB, Renfer E, Fredman D, Technau U (2014) Evolutionary conservation of the eumetazoan gene regulatory landscape. *Genome Res* 24 (4):639-650.

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 7 件)

① Tatsuo Michiue*, Takayoshi Yamamoto*, Yuuri Yasuoka*, Toshiyasu Goto, Takafumi Ikeda, Kei Nagura, Takuya Nakayama, Masanori Taira, and Tsutomu Kinoshita (*, co-first authors) "High variability of expression profiles of homeologous genes for Wnt, Hh, Notch, and Hippo signaling pathways in *Xenopus laevis*" *Developmental Biology* (2017) 426:270-290.

② Minoru Watanabe*, Yuuri Yasuoka*, Shuuji Mawaribuchi, Aya Kuretani, Michihiko Ito, Mariko Kondo, Haruki Ochi, Hajime Ogino, Akimasa Fukui, Masanori Taira, and Tsutomu Kinoshita (*, co-first authors) "Conservatism and variability of gene expression profiles among homeologous transcription factors in *Xenopus laevis*" *Developmental Biology* (2017) 426:301-324.

③ Jun Inoue, Yuuri Yasuoka, Hiroki Takahashi, and Noriyuki Satoh "The chordate ancestor possessed a single copy of the Brachyury gene for notochord acquisition." *Zoological Letters* (2017) 3:4

④ Rebekah M. Charney, Elmira Forouzmand, Jin Sun Cho, Jessica Cheung, Kitt D. Paraiso, Yuuri Yasuoka, Shuji Takahashi, Masanori Taira, Ira L. Blitz, Xiaohui Xie, and Ken W.Y. Cho. "Foxh1 Occupies cis-Regulatory Modules Prior to Dynamic Transcription Factor Interactions Controlling the Mesendoderm Gene

Program.” *Developmental Cell* (2017) 40:595-607

⑤ Yuuri Yasuoka, Chuya Shinzato, and Noriyuki Satoh “The mesoderm-forming gene brachyury regulates ectoderm-endoderm demarcation in a diploblast the coral *Acropora digitifera*” *Current Biology* (2016) 26: 2885-2892

⑥ Adam M. Session, Yoshinobu Uno, Taejoon Kwon,, Yuuri Yasuoka,, Richard M. Harland, Masanori Taira, Daniel S. Rokhsar (全 74 名中 55 番目) “Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*” *Nature* (2016) 538:336–343

⑦ Yuuri Yasuoka, Yutaka Suzuki, Shuji Takahashi, Haruka Someya, Norihiro Sudou, Yoshikazu Haramoto, Ken W. Cho, Makoto Asashima, Sumio Sugano and Masanori Taira “Occupancy of tissue-specific cis-regulatory modules by Otx2 and TLE/Groucho for embryonic head specification.” *Nature Communications* (2014) 5: 4322.

[学会発表] (計 14 件)

① 安岡有理、脊椎動物における Brachyury の遺伝子重複がもつ進化的意義、第 10 回日本ツメガエル研究集会、OIST シーサイドハウス (沖縄県国頭郡恩納村)、2016 年 11 月 19 日

② Yuuri Yasuoka, Chuya Shinzato, and Noriyuki Satoh, The mesoderm-forming gene brachyury regulates ectoderm-endoderm demarcation in a diploblast the coral *Acropora digitifera*、第 22 回国際動物学会議・第 87 回日本動物学会合同大会、宜野湾コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)、2016 年 11 月 17、18 日

③ 呉谷文、安岡有理、平良真規、bHLH-WRPW 型転写因子 Hes 遺伝子ファミリーの hes5 クラスターに注目した起源と進化、日本発生生物学会秋季シンポジウム 2016、三島市民文化会館 (ゆうゆうホール)、2016 年 10 月 19~21 日

④ 呉谷文、安岡有理、平良真規、bHLH-WRPW 型転写因子 Hes の遺伝子ファミリーの多様性と進化、第 18 回日本進化学会大会、東京工業大学大岡山キャンパス、2016 年 8 月 25 日

⑤ 呉谷文、安岡有理、平良真規、hes 遺伝子の多様性と進化、第 10 回 XCIJ-MA 研究集会、東京大学理学部 2 号館、2016 年 7 月 3

日

⑥ 呉谷文、安岡有理、平良真規、Evolutionary diversification of hes genes in vertebrates、第 9 回 Evo-Devo 青年の会、岡崎コンファレンスセンター、2016 年 6 月 25、26 日

⑦ Yuuri Yasuoka, Ryo Koyanagi, Yuki Yasuoka, Chuya Shinzato, Nori Satoh, The "mesodermal" gene brachyury regulates ectoderm-endoderm demarcation in a diploblastic animal, the scleractinian coral *Acropora digitifera*、Academia Sinica - OIST Joint Meeting、台湾中央研究院 (台湾・台北)、2015 年 12 月 15 日

⑧ 渡部稔、回渕修治、安岡有理、伊藤道彦、近藤真理子、越智陽樹、荻野肇、福井彰雅、平良真規、木下勉、*Xenopus laevis* 全ゲノム解析：転写因子をコードする遺伝子群の初期発生および成体器官における発現パターンの解析、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2015 年 12 月 1 日

⑨ 安岡有理、*Xenopus* における二つの brachyury 遺伝子の機能分化、第 1 回次世代両生類研究会、岡崎コンファレンスセンター、2015 年 8 月 24 日

⑩ 安岡有理、小柳亮、安岡由貴、新里宙也、佐藤矩行、脊椎動物胚における中胚葉遺伝子 Brachyury は二胚葉動物ミドリイシサンゴの胚発生において外胚葉と内胚葉の分離に働く、日本進化学会第 17 回大会、中央大学後楽園キャンパス、2015 年 8 月 21 日

⑪ Yuuri Yasuoka, Ryo Koyanagi, Nori Satoh, *Xenopus* における二つの brachyury 遺伝子の機能分化から脊索における Brachyury の役割を解明する、日本発生生物学会第 48 回大会、つくば国際会議場、2015 年 6 月 3 日

⑫ Yasuoka, Y., Suzuki, Y., Takahashi, S., Someya, H., Sudou, N., Haramoto, Y., Asashima, M., Sugano, S. and Taira, M., Transcriptional basis of the head organizer in the amphibian gastrula: ChIP seq analysis of the head organizer transcription factors, Otx2, Lim1 and Gsc、第 85 回日本動物学会年会、東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市)、2014 年 9 月 12 日

⑬ Yasuoka, Y., Transcriptional basis of the head organizer in the amphibian gastrula: ChIP seq analysis of the head organizer transcription factors, Otx2, Lim1 and Gsc、15th International *Xenopus* Conference、Pacific Grove, CA, USA、2014 年 8 月 26 日

⑭Yasuoka, Y., Koyanagi, R., Shinzato, C. and Satoh, N. “Functional analysis of the T-box transcription factor Brachyury in coral gastrula embryos” 第47回日本発生生物学会年会、ウインクあいち（愛知県名古屋市）2014年5月28日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安岡 有理 (YASUOKA, Yuuri)

沖縄科学技術大学院大学マリンゲノミクスユニット・ポストドクトラルスカラー
研究者番号：70724954

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

平良 眞規 (TAIRA, Masanori)

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻・准教授
研究者番号：60150083