JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	CRISPR干渉法を用いたY染色体多コピー遺伝子ノックダウンマウスの開発
Author(s)	盛，真友
Citation	科学研究費助成事業研究成果報告書：1-4
Issue Date	2018-06-06
Type	Research Paper
Text version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/10119/15403
Rights	
Description	挑戦的萌芽研究，研究期間：2016～2017，課題番号：16K14596，研究者番号：90466772，研究分野：分子生物学

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　６　月　　６　日現在

機関番号：　１３３０２
研究種目：　挑戦的萌芽研究
研究期間：　2016～2017
課題番号：　１６Ｋ１４５９６

研究課題名（和文）CRISPR干渉法を用いたY染色体多コピー遺伝子ノックダウンマウスの開発

研究課題名（英文）Development of Y chromosome multicopy gene knockdown mice using CRISPR interference

研究代表者

盛　真友（SAKARI, MATOMO）

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・研究員

研究者番号：９０４６６７７２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はCRISPR干渉法を用いたY染色体多コピー遺伝子改変マウスの開発に向けて、人工miRNAおよびCRISPR干渉法を用いた遺伝子改変マウスの開発を行い、生殖細胞特異的なスプライシング機構の解明を目指す。
期間の成果として遺伝子改変マウスの継続した作出とともに生殖細胞株を用いた次世代シーケンサー解析によって、スプライシング標的遺伝子群の同定に成功した。さらに標的遺伝子群の転写解析によってRNAポリメラーゼのポージング機構を負に制御する新たな転写制御機構を解明した。これらの成果は精子形成過程においてRNAポリメラーゼのポージング制御が重要な機構であることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop Y chromosome multicopy gene knockdown mice using CRISPR interference, development of knockdown mice using artificial miRNA, development of knockdown mice using CRISPR interference, reproduction We aim to elucidate the cell-specific splicing mechanism.
We succeeded in identifying the splicing target genes by continuous generation of knockdown mice as the result of the whole period and by next generation sequencer analysis using germ cell line. Furthermore, transcriptional analysis of the target genes revealed a novel transcriptional regulatory mechanism that negatively regulates the RNA polymerase's pausing mechanism. These results suggest that pausing control of RNA polymerase is an important mechanism in spermatogenesis process.

研究分野：　分子生物学

キーワード：　Y染色体　精子形成

１．研究開始当初の背景

雄性化特異的な遺伝子領域が存在する。Y 染色体ではゲノム上の離れた領域に同一遺伝子が複数個存在する多コピー遺伝子群が多く存在する。ヒトとマウスで共通に保存されているRbmy 遺伝子は約30コピーの同一遺伝子群を形成し、ヒトでは男性不妊症患者のY 染色体微小欠失により同定された精子形成不全責任領域AZFb に位置する。これまでの我々の解析により、生殖細胞特異的に発現するRbmy 遺伝子は、精子形成・成熟に必須な遺伝子群のスプライシングを制御することを見い出し、精子形成において重要な機能を担うことが推察された。そこでRbmy 遺伝子ノックダウンマウスの作出を行うとともに精子形成不全のメカニズムの一端の解明を目指す。

２．研究の目的

多コピー遺伝子群に対する遺伝子改変マウスの作出には従来のノックアウトマウスの作出手法では困難であり例がない。現在の主な遺伝子ノックダウン法はRNAi 技術を利用しており、内在性のsiRNA やmiRNA の経路を利用し標的mRNA の分解や翻訳阻害を引き起こす。これら従来の手法は個別のアイソフォームに対応可能であるという大きな利点がある。さらに近年報告された新しい技術である CRISPR interference (CRISPRi)法(Gilbert L.,et al, Cell 2014)では標的プロモーター上にdCas9 が結合することによってRNA ポリメラーゼを阻害する。この手法では内在性経路を利用せずオフターゲット効果が非常に低い特徴がある。そこで我々はCRISPRi法と人工miRNA (artificial micro RNA, amiRNA)法の2 つのノックダウン法を用いてY 染色体多コピー遺伝子群のノックダウンマウスの作出と機能解析を試みる。

３．研究の方法

我々は動物実験センター運営の基盤を活かし、これまでに多くの遺伝子改変動物の作出を行ってきた。その技術基盤を基に（1）Cre 誘導性 dCas9 ノックインマウスを作出する。（2）Cre 誘導性 dCas9 マウスと生殖細胞特異的 Cre 発現マウスである Stra8-Cre マウスを掛け合わせ、生殖細胞特異的 dCas9 発現マウスを得る。また（3）Rbmy 遺伝子を標的とした sgRNA 発現トランスジェニックマウス（sgRbmy-tg マウス）を作出する。（4）生殖細胞特異的 dCas9 マウスと sgRbmy-tg マウスを掛け合わせることで目的の Rbmy 遺伝子群ノックダウンマウスを作出する。（5）同時に従来法を改良した amiRNA 発現トランスジェニックマウスを作出し、表現型の比較解析を行う。

（1） Rosa26 locus への dCas9-KRAB ノックインマウスの作出

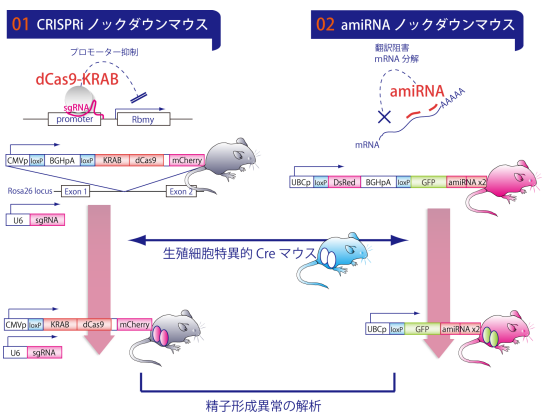
マウスゲノム内で安定に導入遺伝子を発現する部位として、近傍の位置効果を受けず、内在遺伝子群への影響のない Rosa26 locus が適切であると考える。そこで Rosa26 locus への Cre 誘導性 dCas9-KRAB 発現コンストラクトのノックインマウス作出を行う。pHR-SFFV-KRAB-dCas9-P2A-mCherry vector に loxP-GFP-loxP カセット、及び Rosa26 locus 相同配列を導入したターゲティングベクターを構築する。構築されたベクターは C57/BL6 マウス由来 ES 細胞に導入し、相同組換え ES 細胞を取得する。

（2） 生殖細胞特異的 dCas9-KRAB 発現マウスの作出

減数分裂期の分化段階の全ての生殖細胞において dCas9-KRAB の発現を確立するために、精原細胞特異的に発現し機能することが知られる Stra8 遺伝子のプロモーターを持つ Cre マウスを用いる。作出された Cre 誘導性 dCas9-KRAB ノックインマウスと生殖細胞特異的 Cre 発現マウスである Stra8-Cre マウスを交配させ、生殖細胞特異的 dCas9-KRAB 発現マウスを獲得する。

（3） Rbmy プロモーターを標的とした sgRNA 発現マウスの作出

sgRNA の標的遺伝子プロモーター配列は多コピー遺伝子間で共通配列である必要がある。細胞レベルで遺伝子抑制効果の高い領域は転写開始点を起点として-50 bp から+100 bp の領域であり、Rbmy 遺伝子群において約 60 bp の共通配列を見出した。この 60 bp の共通配列内に抑制効果の見られる sgRNA 配列を検討する。Rbmy 遺伝子抑制効果の検討には Rbmy 遺伝子発現を確認した細胞株である精巣腫瘍由来のマウス F9 細胞を用いて行う。ベクター構成は U6 プロモーター下流に sgRNA を発現し、2×インシュレーター配列を 3’側に配置する。ベクターを構築後、受精卵に前核インジェクションを行いトランジェニック系統として確立する。



（4）amiRNA 発現型ノックダウンマウスの作出

Rbmy を機能的に抑制する amiRNA を 5 種類

検討し、約 70%のノックダウン効率を示す 3 種類の RNA 配列を取得している。これらの配列をマウス F9 細胞へ導入し、内在性の siRNA または miRNA の発現変動を検討することによってオフターゲット効果を検証する。次にこれらの amiRNA 配列をタンデムに結合させた Cre 誘導型 amiRNA 発現ベクターを構築し、トランスジェニック系統を作成する。作成された系統は Stra8-Cre マウスと掛け合わせることによって生殖細胞特異的な遺伝子抑制を実現する。

（5）Rbmy の標的エキソンの同定と基質認識特異性の検索

ヒト AZF 領域欠失による精子形成不全症の多くは精母細胞のパキテン期に精子形成の休止が見られることから、パキテン期における精子形成マーカー遺伝子の発現およびそのスプライシングアイソフォームの検討を mRNA レベルで解析・定量する。また減数分裂期の XY 染色体対合異常は AZFb 欠損と似た表現型を呈しパキテン休止を伴うことから、FISH 解析により XY body を染色し対合異常を解析する予定である。また生殖細胞特異的 Rbmy ノックダウンマウスにおける精子形成異常を組織形態学的に調べる。さらに、精巣より取得した RNA を用いて次世代シーケンサー解析を試行し、標的エキソンを検索する。アイソフォーム解析には通常の発現解析に比べて多くのリード数を必要とするため、3 億リードを確保する。次世代シーケンサーにより得られた Rbmy によって変動するエキソン配列を、バイオインフォマティクス解析により有意な配列として抽出する。同定されたエキソンはアイソフォーム生成に寄与すると考えられることから、スキッピングが起こっているか否かを検証するために、mini gene を用いたスプライシングアッセイを行う。さらに Rbmy の結合した配列群よりバイオインフォマティクス解析を用いて、共通なコンセンサス配列を同定する。

（6）ヒトAZF領域欠損サンプルにおけるRBMYの標的RNAの解析

RBMYはAZFb領域にそれぞれ座位しているが、これらAZF領域には複数の遺伝子が存在するため責任遺伝子は未だ同定されていない。本研究により同定されたRBMYの標的mRNAスプライシングアイソフォームの発現をAZFb領域欠損患者の精巣生検サンプルから調製したcDNA（金沢大学泌尿器科より供与）を用いて real-time PCR法にてアイソフォームの生成比を解析するとともに定量的解析を行ない、精子形成不全症の発症機構の一端の解明を目指す。

４．研究成果

本研究は CRISPR 干渉法を用いた Y 染色体多コピー遺伝子ノックダウンマウスの開発に向けて、人工 miRNA を用いたノックダウンマウスの開発、および CRISPR 干渉法を用いたノックダウンマウスの開発を行い、生殖細胞特異的なスプライシング機構の解明を目指す。

（1）改良した高発現型ベクターを用いてインジェクション法によりトランスジェニック系統の樹立を行った。

（2）また新たに受精卵へエレクトロポレーション法によって核酸導入する簡便な手法を立ち上げ技術基盤の拡充を図った。

（3）Rbmy 遺伝子の生殖細胞株における次世代シーケンサー解析を通して、新たなスプライシング標的遺伝子群を同定した。

（4）標的遺伝子の RNA ポリメラーゼのポージング機構を負に制御する新たな転写制御機構を見出した。

期間全体の成果としてノックダウンマウスの系統樹立は継続中であり、継続した作出は必須であると考える。また生殖細胞株を用いた次世代シーケンサー解析によって、スプライシング標的遺伝子群の同定に成功した。これらの遺伝子群は精子形成において新たなメカニズムを担うと考えられる。さらに標的遺伝子群の転写解析によって RNA ポリメラーゼのポージング機構を負に制御する新たな転写制御機構を解明した。これらの成果は精子形成過程において RNA ポリメラーゼのポージング制御が重要な機構であることを示唆した。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 3 件）

1、 盛真友、松本高広、塚原俊文
雄性特異的スプライシングにおける性ホルモンと Y 染色体による共制御
HOKURIKU RNA CLUB
2017 年 12 月 18 日
金沢大学医学部記念館（石川県・金沢市）

2、 盛真友、松本高広、塚原俊文
組織特異的スプライシングにおける性ホルモンと Y 染色体による共制御
第 19 回日本 RNA 学会年会
2017 年 7 月 19 日
富山国際会議場（富山県・富山市）

3、 盛真友、厚見健吾、岡村永一、松本高広
X 染色体 RBMX によるエストロゲン受容体転写抑制化機構の解析
第 90 回日本内分泌学会学術総会
2017 年 4 月 20 日
ロームシアター京都（京都府・左京区）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織

(1)研究代表者
盛　真友（SAKARI MATOMO）
北陸先端科学技術大学院大学・生命機能工学領域・研究員
研究者番号：90466772

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
松本　高広（MATSUMOTO TAKAHIRO）
徳島大学大学院・動物資源研究部門・准教授
研究者番号：70447374

(4)研究協力者
厚美憲吾（ATSUMI KENGO）
徳島大学医学部・4 年

大野仁詩（OHNO HITOSHI）
徳島大学医学部・研究協力員

赤澤恵実子（AKAZAWA EMIKO）
徳島大学医学部・研究協力員