

アレル特異的なエピゲノム操作方法の開発

理化学研究所バイオリソース研究センター

遺伝工学基盤技術室

井上 貴美子

【目的】

本研究は、ゲノム刷り込み遺伝子発現補正へ向けた片側遺伝子座（アレル）エピゲノム操作方法の開発を目指すものである。

ゲノム刷り込みは、雌雄のアレルに異なるエピゲノム修飾が入ることで、雌雄ゲノムに発現の違いをもたらす哺乳動物特有の遺伝子発現システムであり、雌雄ゲノムに差異が生じることで哺乳動物の性の安定化を担保している。ゲノム刷り込み遺伝子の多くは胎児の発生に重大な影響をもたらす機能を有しているため、ゲノム刷り込み制御の破綻により、本来発現するはずのアレルからの発現喪失（または非発現アレルからの異所性発現）が生じ、胎児の生死に関わるような重大な疾患をもたらす。現在幅広く応用されている体外受精などの生殖補助医療は、ゲノム刷り込みに影響を与えやすいことが知られており、生殖補助医療による刷り込み遺伝子の発現変動は社会的にも重要な課題となっている。本研究では、ゲノム刷り込み疾患の遺伝子治療への応用を最終目標として、エピゲノム情報を意図するアレルでのみ人為的に操作する方法を確立することを目指し、その基盤となる片側アレルのみのゲノム編集技術の構築を試みた。

【導入】

ゲノム刷り込み遺伝子の雌雄アレル間の発現差は、Imprinting Control Region (ICR) におけるエピゲノム修飾の差異によってもたらされる。通常は発現が抑制されるアレルに対し抑制的エピゲノム修飾が入ることによって、対立アレルからの制限的な発現が生じる。エピゲノム修飾の多くは DNA メチル化であり、一般的には胎児における始原生殖細胞で消去され、生殖細胞分化に伴い修飾が入り、受精後も維持されることによって体細胞に受け継がれる。

エピゲノム修飾の人為的制御方法として、近年では CRISPR/Cas9 に代表されるゲノム編集を使用する技術開発が急速に進んでいる。一例として、主な遺伝子の活性化（不活性化）手法として、CRISPRa (i) が利用されている。これは、DNA の切断活性を欠損させた Cas9 である dCas9 にアクチベーター（リプレッサー）因子の複合体を形成させ、ガイド (g) RNA により標的配列へと dCas9 を誘導することによって、目的遺伝子を活性化（不活性化）する方法である。

もう一つの方法として、エピゲノム修飾酵素を dCas9 により、目的の遺伝子調節領域に誘導する方法がある。これは、dCas9 と DNA 脱メチル化酵素などのエピゲノム修飾酵素との複合体を作成し、gRNA の導入によって、標的領域にエピゲノム修飾酵素を誘導し、標的遺伝子内にエピゲノム修飾変化をもたらす手法である。上記 2 つの方法は、遺伝子機能探索、ゲノム初期化研究、がん研究など多くの分野で利用され、汎用的技術となっている。

上記の dCas9 による遺伝子発現制御技術は非常に強力な研究ツールとして利用されている一方で、dCas9 自身は雌雄アレルを識別することができないため、片側アレルのみからの発現が重要である刷り込み遺伝子の制御を目的とした場合には使用することができない。そこで、申請者は、新たなゲノム刷り込み遺伝子の解析と制御手法の確立を目指し、片側アレルのエピゲノム操作を可能にする技術の開発を最終目的として本研究を行った。その基盤技術として本課題期間中は片側アレルのみを編集するゲノム編集技術の開発を試みた。

【方法】

・具体的には、以下の 2 つの方法で片側アレルのみを操作するゲノム編集の開発を試みた。

(1) 正確性の高い変異型 Cas9 を用いた片側アレルゲノム編集 (図 1)

DNA 認識ドメインを改変し正確性の高い Cas9 として発表された HypaCas9 (Chen et al. Nature 2017)、evoCas9 (Casini, Nature Biotech. 2018)、LZ3Cas9 (Schmid-Burgk et al. Molecular Cell 2020) を利用して、チロシナーゼ遺伝子の gRNA を使用し、産仔の毛色を観察することで、各変異型 Cas9 の活性測定を行った。ゲノム編集活性が高い変異型 Cas9 を選択して、アレル間の Single nucleotide polymorphism (SNP) 部位に gRNA を設計することで、アレルの差異を認識して片アレルのゲノム編集が可能かどうかを検討した。

(2) Cas9 インヒビター AcrII 遺伝子 (Dong, Nature 2017) を利用した片側アレルゲノム編集 (図 2)

Cas9 のインヒビターであるファージベクター由来の AcrII 遺伝子を利用して、Cas9 の活性を阻害した上で、

片側アレルゲノム編集が可能かどうか検討した。

具体的には、AcrII mRNA を導入した受精卵と Cas9 を導入した受精卵を準備し、雌性・雄性前核を置換することで、片側アレルのみが編集された受精卵を作製し、検討を行った。

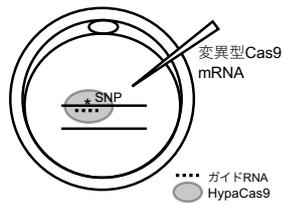


図1：SNPを利用した片側アレルゲノム編集

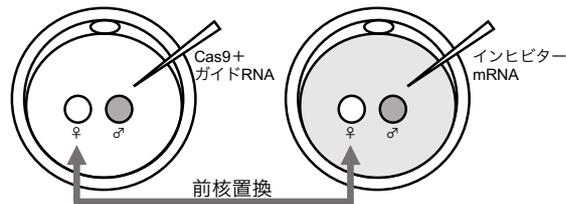


図2：インヒビターを利用した片側アレルゲノム編集

・受精卵への Cas9 と gRNA の導入について

受精卵は (C57BL6/N x DBA/2) F1 x C57BL6/N 由来の前核期胚を用いた。SNP を有する受精卵として野生由来マウスである JF1 由来の精子を用いて、交雑系の受精卵を作製した。

指標となる刷り込み遺伝子の gRNA として、胎仔の生存に必須の父性発現ゲノム刷り込み遺伝子である Peg10 を利用した。妊娠 11~13 日齢で開腹し、産仔の生存を指標としてゲノム編集効率を算出した。

【結果】

(1) 変異型 Cas9 の活性測定を行うために、チロシナーゼ遺伝子 gRNA と各 Cas9 の mRNA を受精卵に導入し、産仔の毛色により活性測定を行った。3 種の変異型の中では、LZ3Cas9 のゲノム編集活性が最も高かった。

(図 3)

そこで、次に LZ3Cas9 と JF1 との SNP 上に設計した Peg10 gRNA を (C57BL6/N x DBA/2) F1 x JF1 の受精卵に導入し、胎仔の生存性を確認したところ、胎仔は発生停止を引き起こし致死となっていることが明らかとなった。したがって、LZ3Cas9 は、SNP を認識するほどの正確性はなく、片側アレルのゲノム編集を達成するには不十分であることが明らかとなった。



図3 変異型 Cas9 の活性測定。黒い毛色のマウス受精卵にチロシナーゼ遺伝子 gRNA を導入し、毛色を観察したところ、LZ3Cas9 の活性が最も高かった。

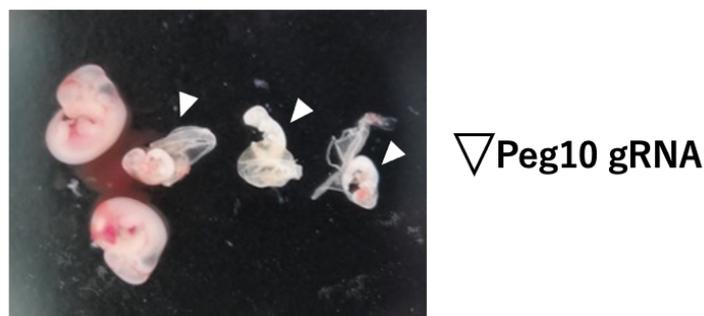


図4 SNP 上に設計した Peg10 gRNA と LZ3Cas9 mRNA を導入した JF1 交雑系胎仔。(矢頭) 胎仔は発生遅延により致死となっていた。

(2) AcrIIA インヒビターを利用した片側アレルゲノム編集が可能かどうかを検討するため、以下の実験を行った。まず初めにインヒビターが Cas9 活性を抑制するかどうかを調べるために、インヒビターを導入した受精卵にチロシナーゼ遺伝子 gRNA と Cas9 を導入し、産仔の毛色を観察したところ、インヒビターを導入した胚からはアルビノ産仔は誕生しなかったため、完全に Cas9 活性が阻害されていることが明らかとなった (図 5)。次に、前核期胚に Peg10 gRNA を導入し培養した後、AcrIIA を導入した胚と前核置換を行った上で、胎仔の生存性を確認した。雄の前核を移植した胚では、生存率は 1.6% だったのに対し、雌の前核を置換した胚では生存率が 16% であり、雌前核置換胚では、インヒビターにより雄アレルのゲノム編集が阻害されたことが示唆された (図 6)。この結果より、インヒビターを利用することで片側アレルに限定したゲノム編集胚を作製可能である事が示された。

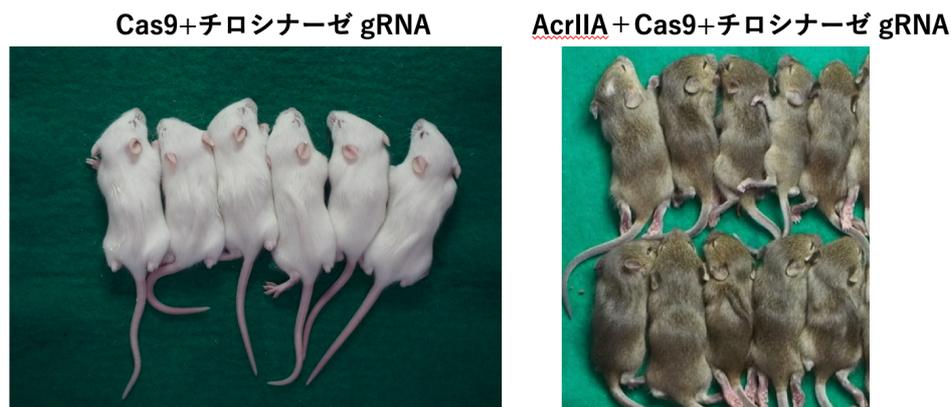


図 5 AcrIIA による Cas9 活性の阻害効果。
インヒビターにより完全に Cas9 活性が阻害された結果、
アルビノ産仔は誕生しなかった。

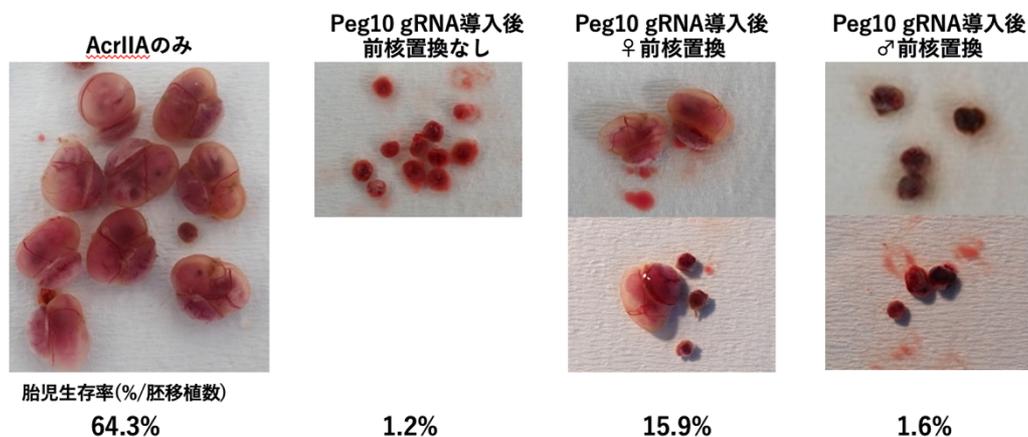


図 6 AcrIIA 導入胚との雌雄前核置換による胎仔の生存性。
雄前核を置換した場合の胎仔生存率は 1.6% であった一方で、
雌前核を置換した場合は 15.9% であった。

【考察】

以上の結果より、変異型 Cas9 による片側アレル特異的なゲノム編集はその正確性の不十分さから困難であったものの、インヒビターを利用した前核置換胚を作製することで、可能であることが示唆された。今後は、同手法を用いて CRISPRa (i)、またはエピゲノム修飾酵素との複合体を利用する事で、片側アレルに特異的なエピゲノム編集が可能かどうかを検討する予定である。