

染色体異常の高精度な修復を目指した新規ゲノム編集法の開発

1. 研究の目的

がんや先天性疾患の原因となる染色体再編成を正確に誘導する技術開発は、疾患モデル動物の作製だけでなく、染色体異常の治療に展開するうえでも社会的ニーズが見こまれる。しかしながら、従来のゲノム編集技術による染色体再編成マウスの誘導法では、予期せぬ構造をとるケースがあり、多くは胎生致死となることが課題であった。

本計画では、これまでの成果 (*Cell Rep* 2018, *Sci Rep* 2019) をもとに、

(1) 相同組換え効率が向上する目的でゲノム安定性制御分子を遺伝的に改変した *Recq15^{em1Cu}* を用いたゲノム編集により複雑な染色体再編成 (CCRs) の誘導と解析を進め、本手法が有効に機能することを確認する。

(2) 本手法をベースとした高精度に染色体再編成を誘導する新手法の確立に取り組み、臨床応用への展開も見据えた汎用型プロトコルを開発する。

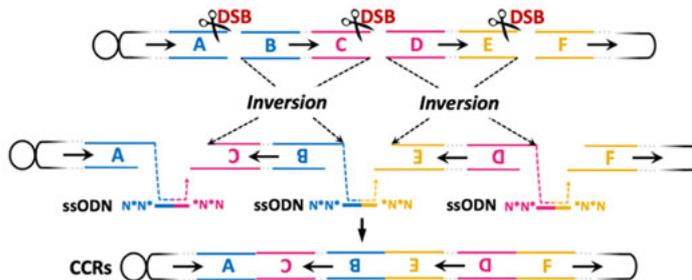
2. 研究の計画

(1) *Recq15^{em1Cu}* を用いたクロモソリプシス様の染色体再編成の誘導と解析

近年の次世代シーケンス技術の進歩により、2 つ以上の染色体、または 3 つ以上の染色体断端からなる複雑な染色体再編成 (CCRs) が、がんや先天性疾患の患者のゲノムで相次いで検出されている。しかしながら、現時点では臨床検体において CCRs が生じているというゲノム解析の結果論にとどまっており、疾患発症メカニズムは殆ど不明である。それ故、CCRs を高精度かつ効率良く誘導する事を可能にする実験系を構築することが急務である。

① CCRs を誘導する CRISPR/Cas9 系の設計

本研究では DNA 修復の過程で Rad51 (HDR 因子) を分解する *Recq15* に変異を導入した *Recq15^{em1Cu}* に対して高精度に意図した CCRs が誘導できるか試みる。それぞれ gRNA 及び染色体断端が再度連結するために必要な ssODN (一本鎖オリゴ) を 3 つ設計、受精卵に対して電気穿孔法を用いて狙った位置に CCRs を誘導する。



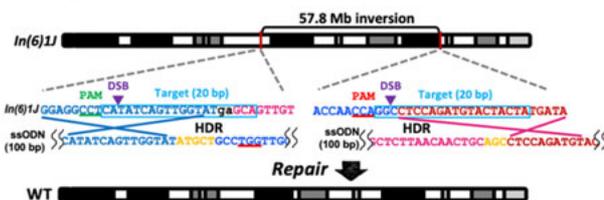
② CCRs の遺伝子型検査と解析

胚盤胞、産仔 (F0 世代) の遺伝子型検査は、① PCR 法、② サンガーシーケンスにより検証する。また、複数の DSB はゲノム不安定性を誘導し細胞死をもたらすため、胚盤胞までの発生率を観察する。

(2) *Recq15^{em1Cu}* を用いた高精度に染色体再編成を誘導する新手法の確立

① 染色体逆位 *In(6)1J* を修復する CRISPR/Cas 系の設計

正確かつ高効率に染色体再編成を誘導する新手法を確立するために、本計画では従来報告にない長さとなる 57.8 Mb の巨大な逆位 *In(6)1J* の修復を標的とする。この様な広範囲な人工逆位修復が可能になれば、染色体異常によって発症する多様な癌疾患を修復する基盤を構築できる。標的 guide RNA (gRNA) 設計のために、Double-strand break (DSB) により生じた 2 箇所のゲノム断端が HDR を介して互いに反対方向に連結するように、必要のり付け配列である ssODN を DNA 配列編集ソフト (ApE) で設計する。更に、ssODN の各末端を S 化 (硫黄化) することで細胞内に存在する核酸分解酵素への耐性を付与する実験条件も加え、染色体再編効率への影響を調べる。



立腺および子宮組織において染色体再編成の特異性が高いことを示唆しており、治療応用における安全性の観点から重要な意味を持つ。また、論文未発表であるため詳細なゲノム領域は割愛するが、大規模な逆位だけでなく、特定の転座の誘導にも成功している。

逆位修復後のゲノム配列

上流側

ssODN TTTAATATATGTGTGTTGGAGGCCTCATATCAGTTGGTATATGCTGCCTGGTTGGTGGTCCAGCGCCTGAGAGATCTTGGGGTTC
系統#L1 (子宮) TTTAATATATGTGTGTTGGAGGCCTCATA-----GCCTGGTTGGTGGTCCAGCGCCTGAGAGATCTTGGGGTTC

下流側

ssODN ACAGGTCCTCGAGAAGAAGAAGAGGCTCTTAACAACCTGACAGCCTCCAGATGTACTACTATGATAATCCAATCCTTAGTAGAG
系統#L1 (子宮) ACAGGTCCTCGAGAAGAAGAAGAGGCTCTTAACAACCTGC---CTCCAGATGTACTACTATGATAATCCAATCCTTAGTAGAG

TCATACCAACTG(insertion)

4. 研究の反省・考察

(1) *Recq15^{em1Cu}*を用いたクロモソリプシス様の染色体再編成の誘導と解析

Recq15^{em1Cu} マウスを用いた新しいゲノム編集技術を開発し、マウスの受精卵で CCR や逆位を含むさまざまな種類の染色体再編成を効率的に誘導できることを示した。この技術には大きな可能性があるが、FoSTeS/MMBIR などの予期せぬ DSB 修復メカニズムも伴った。これらの問題を克服し、より高精度なゲノム編集を実現するためには、*Recq15* の変異改良が必要である。特に、転写ストレスを調節する *Recq15* KIX 変異 (Islam et al., 2010) や、RAD51 フィラメントを破壊しない *Recq15^{Δ652-674}* および *Recq15^{F666A}* 変異 (Schwendener et al., 2010) は、DSB 修復時の精度を向上させることで、染色体再編成の正確性と効率をさらに強化する可能性がある。

(2) *Recq15^{em1Cu}*を用いた高精度に染色体再編成を誘導する新手法の確立

前立腺および子宮組織における 57.8 Mb に及ぶ染色体再編成の誘導に成功した。本技術のさらなる効率化に向けて、さまざまなゲノム領域を標的とした実験、その結果に基づく条件検討が必要である。本研究で開発された技術を使用することにより、簡便かつ迅速に特定の染色体異常を持つがん疾患モデルの作成も可能であることが示唆され、がん研究の効率と精度が飛躍的に向上することも期待される。

また、この技術のさらなる応用に向けて、開発が順調に進めば、次に染色体異常を修復する臨床応用への基盤形成へ発展させる。そのためには *Recq15* 遺伝子の機能低下の生体への影響を極力抑える必要がある。そこで染色体レベルの *Recq15* の改変を避けて、(i) 合成 siRNA を用いた *Recq15* 遺伝子の発現抑制 (ノックダウン) により Rad51 の分解を制御、または (ii) *Recq15* 遺伝子の Dominant-negative 変異型 mRNA を導入して *Recq15* の機能を一過性に抑制する事により、染色体異常の正確な修復を試みる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Iwata S, Nagahara M, Iwamoto T. A *Recq15* mutant facilitates complex CRISPR/Cas9-mediated chromosomal engineering in mouse zygotes. *Genetics*, iyae054, 2024

(2) 口頭発表

① **岩田 悟**、長原美樹、岩本隆司、ゲノム安定性制御による複雑な染色体再編成 (Complex Chromosome Rearrangements: CCRs) の効率的誘導、第70回 日本実験動物学会総会、2023年5月24日

② **岩田 悟**、長原美樹、岩本隆司、*Recq15* mutantを用いた複雑な染色体再編成 (CCRs) の効率的誘導、日本遺伝学会 第95回大会、2023年9月7日
ポスター発表

① **岩田 悟**、長原美樹、岩本隆司、*Recq15*変異体はマウス受精卵における複雑な染色体改変を可能にする、日本ゲノム編集学会 第8回大会、2023年6月7日

(3) 出版物

なし