

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：2020C-9

課題名：遺伝子重複症候群疾患モデルマウスの作製技術開発と *MECP2* 重複症候群モデルマウスを用いた MeCP2 による視床下部・下垂体ホルモン分泌制御の解明

主任研究者 (所属施設) 国立研究開発機構国立成育医療研究センター研究所  
(所属・職名 氏名) システム発生・再生医学研究部 研究員 辻 敦美

### (研究成果の要約)

*MECP2* は、神経疾患である Rett 症候群および *MECP2* 重複症候群の原因遺伝子であり、これがコードする MeCP2 の分子機能として DNA メチル化部位への結合などを介した遺伝子発現調節が知られている。また申請者らの *MECP2* 重複症候群の症例報告により、MeCP2 が内分泌制御に関与する可能性が示唆された。更なる病態解明が望まれる一方、遺伝子重複を有する疾患モデル動物作成には技術的なハードル大きい。そこで遺伝子重複を有するマウスの作製法確立および二次性徴発来におけるエピジェネティックな分子制御機構解明を目的とし、本研究を計画した。本研究では、系統間で異なる遺伝子多型を有する JF1 および C57BL/6 マウス系統のハイブリッド胚(JB 胚)を用いることにより、遺伝子重複アレル作製を目指した。*Mecp2* 遺伝子 centromere 側に JF1 特異的一塩基多型(SNV)配列を、telomere 側に C57BL/6 特異的 SNV 配列を同定し、その部位に sgRNA を設計した。さらに切断断端同士が結合するように設計した Donor Vector も作製し、Cas9 タンパクと共に JB 胚にマイクロインジェクションを行った。生存仔 110 頭が得られ、sgRNA の作用は確認された。Donor Vector 配列を有するトランスジェニックマウスは 28 頭得られたものの、目的重複を有するマウスは得られなかった。本研究結果により、受精卵への本法適応による重複作製は低効率であり、今後は JB 胚から得られた ES 細胞に対して本法でゲノム編集を行い、大量スクリーニングによるアレル獲得が必要である、という新たな課題を明らかにすることができた。

### 1. 研究目的

*MECP2* は X 染色体長腕上に位置し、Rett 症候群(機能喪失変異)および *MECP2* 重複症候群(過剰発現)の原因遺伝子である。これがコードする MeCP2 の分子機能として DNA メチル化部位への結合・Histone deacetylase(HDAC)のリクルートを介した遺伝子発現調節が知られている。その機能喪失変異や重複は精神運動発達遅滞を来し、神経分野では MeCP2 が量依存的に神経分化・機能発現に影響を及ぼすことが明らかとなっている。一方申請者は、*MECP2* 重複症候群における卵巣刺激ホルモン(FSH)上昇を伴わないゴナドトロピン依存性思春期早発症合併症例を通じ、MeCP2 が視床下部・下垂体ホルモン分泌に何らかの機能を果たす可能性について報告した。しかし一般に遺伝子重複を有する疾患モデル動物作成に

は、数 10 kb の重複を起こす必要があり、技術的なハードル大きかった。技術的なハードルから微小重複症候群のモデル動物作成は難しく、*in vivo* における解析システム開発が期待されていた。

本背景を踏まえ、以下の目的で本研究を行った。

(1) *MECP2* 重複症候群疾患モデルマウス作製を通じ、CRISPR/Cas9 システムの応用により遺伝子重複マウス作製技術を確立する。

(2) *MECP2* 重複症候群疾患モデルマウスの解析により、MeCP2 の神経内分泌への関与を明らかにし、視床下部・下垂体におけるエピジェネティックなホルモン分泌制御の分子機構解明の糸口を掴む。

## 2. 研究組織

研究者 所属施設

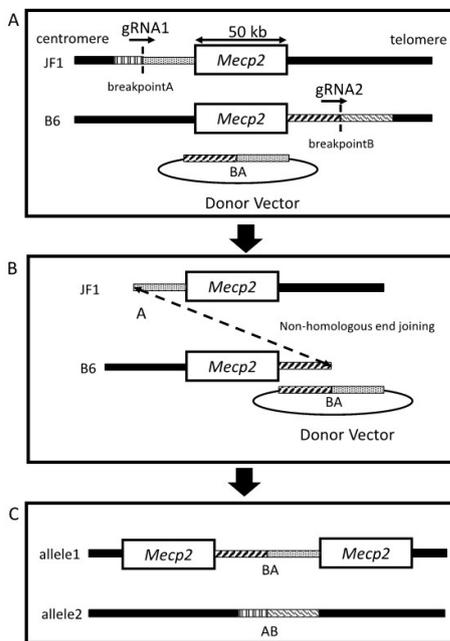
辻 敦美：国立成育医療研究センター システム発生・再生医学研究部

## 3. 研究成果

本研究では、ゲノム編集で一般に作製困難と考えられている遺伝子重複や染色体微小重複作について、系統間で異なる遺伝子多型を有する JF1 および C57BL/6 マウス系統のハイブリッド胚(受精卵)を用いた作製方法技術開発を目指した。

(1) ゲノム編集のための、sgRNA および Donor Vector の設計、作製

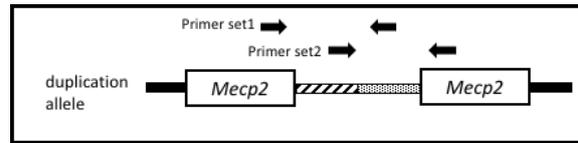
イ) *Mecp2* 遺伝子の centromere 側に JF1 系統特異的な一塩基多型を含む部位を、telomere 側に C57BL6 系統特異的な一塩基多型を含む部位を選択し、その部位に相同な sgRNA を設計、作製を行なった (Fig.1A)。ロ) 切断された相同染色体同士が non homologous end joining で修復されるよう、Donor Vector を作製した (Fig.1B)。



[Fig.1] マウス系統アレル特異的なゲノム編集を使用した重複アレルの作成

ハ) 重複が生じたアレルを検出するため、ジェノタイピング PCR の条件設定を行った。重複マウスの検出 PCR のプライマー設計を行

い、F<sub>0</sub>マウスのゲノムを用いて条件決定を行った[Fig.2]。



[Fig.2] 重複アレル遺伝子型解析

(2) 目的アレル作製のための、受精卵に対するゲノム編集

イ) B6D2F1 マウス卵子を JF1 マウス精子と受精させ、作製したハイブリッド胚の two cell stage において、sgRNA、Cas9 タンパク、Donor Vector のマイクロインジェクションを行った。その胚を卵管移植にて偽妊娠マウスに戻した。マイクロインジェクションは合計 2 回行った。なお、第 1 回目のマイクロインジェクションで得られたマウスにおいて、Cas9 により切断されたと考えられる Donor Vector 配列挿入が判明したため、第 2 回目は改変 Donor Vector を使用した。

ロ) 生存仔は第 1 回目で 32 頭、第 2 回目で 78 頭得られた。これらの個体に対する sgRNA 配列付近の遺伝子型検討から、今回使用した sgRNA による二重鎖切断が起きていたことが確認された。Donor Vector のコンストラクトを有するトランスジェニックマウスは 28 頭得られた。1) ハ) に示した方法で遺伝子型解析の結果、重複を有するマウスは得られなかった。

## (3) 考察

今回 *Mecn2* を重複作製の対象遺伝子とした。遺伝子配列付近に indel が生じた場合に胎生致死となる遺伝子であったが、sgRNA を遺伝子配列から数 kb 以上離れた箇所に設計し、また two cell stage でのマイクロインジェクションとしたことで、生存仔を 110 頭得ることができた。しかしながら、2 回のインジェクションで目的の重複を有するマウスは得られず、本法を用いた受精卵に対するゲノム編集では、低効率であることが明らかとなった。その要因として、以下の 2 点が挙げられる。まず、今回の標的遺伝子は X 染色体上に存在しており、核型 XY 胚の場合、相同染色体間での重複形成反応が生じないという点である。さらに、重複が起きた細胞においては、*Mecn2* が重複する X 染色体と *Mecn2* が欠失する X 染色体が存在するはず

である。つまり X 不活化の過程で、*Mecp2* 重複を有する X 染色体が不活化を受けた場合、胚の生存が難しい可能性が考えられた。

これら致死性や低効率の問題を補完するため、今後は ES 細胞など大量スクリーニングが可能である系を用いて目的アリルを作製する必要があると考えられる。今後は JF1 系統および C57BL/6 系統のハイブリッド胚より ES 細胞を作製し、本法での遺伝子重複作製に加え、選択培地などを用いた大量スクリーニングを行うことで、アリル作製を行う必要があると考えられた。

#### (4) 結論

系統特異的な一塩基多型を用いた遺伝子領域の重複作製について検討を行い、その効率や課題を明らかにした。

なお、本研究で検討した技術を応用した研究について、以下の通り学会発表を行った。

辻敦美、小川湧也、寺尾美穂、菊池咲希、土屋育、高田修治. In vivo functional analysis of a candidate for human regulatory element related to SOX9

expression using a genetically humanized mouse model. 第 43 回日本分子生物学会. 2020 年 12 月 2 日 (web 開催)

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

【遺伝子組換え DNA 実験】 Donor Vector 作製および遺伝子改変マウス作製を行うにあたり、カルタヘナ法(遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律)を遵守し、当センター遺伝子組換え実験安全委員会の許可の下施行した(承認番号 18-1)。

【動物実験】 遺伝子改変マウスの作製およびその維持管理は、「国立成育医療研究センターにおける動物実験に関する指針」に準拠し、3R「Reduce, Reuse, Refinement」の原則で実験を履行した。本研究計画は当センター実験動物委員会の承認の下に施行した(承認番号 2018-002)。