

## 研究題目

ssODN-mediated end-joining を用いたヒト化 NgR1 エンハンサー マウスの作成

## 研究組織

研究代表者：谷垣健二 (滋賀県立総合病院 研究所 (旧 滋賀県立成人病センター 研究所))

共同研究者：竹本龍也 (徳島大学 先端酵素学研究所)

### 【1】研究の概要

#### [1-1]本研究の目的・概要

我々は、ヒトで統合失調症に関連する NgR1 の一塩基多型 (SNP) rs701428 が NgR1 の神経活動依存性エンハンサー領域に存在し、この変異によってその活性が修飾を受けることを明らかにしてきた (Transl Psychiatry. 2012 Aug 7;2:e146)。この変異により、新たに Myb12 結合領域が生じエンハンサー機能に異常が生じる。この SNP を含むゲノム領域はヒトとマウスで相同性は高く、H3K4me1 や H3K9ac 等のエピゲノムの状態もよく似ているが、この SNP の配列は完全には一致しないため、直接この SNP の影響をマウスモデルで検証することは不可能である。この SNP を含むヒト NgR1 神経活動依存性エンハンサーをマウスの NgR1 エンハンサーと置換し、統合失調症に関連の見られる SNP rs701428 の NgR1 神経活動依存性エンハンサーに及ぼす影響を生体内で検証することを目的とする。

#### [1-2]研究の方法・経過

先端酵素学研究所初期発生研究分野の竹本龍也博士が開発された、electroporation を用いた簡便かつ高率にゲノム編集マウスを作製する方法を用いて、SNP rs701428 を含むヒト NgR1 神経活動依存性エンハンサーをマウスの NgR1 エンハンサーと置換したマウスを作製する。平成 28 年度に神経活動性エンハンサーの上流と下流を標的とする 2 種類のガイド RNA と Cas9 を用いて、NgR1 の神経活動依存性エンハンサーを欠損したマウスを樹立した。この 2 種類のガイド RNA は CRISPR/Cas9 法にて良好な切断効率が得られたため、このガイド RNA を用いてヒト NgR1 神経活動依存性エンハンサーとの置換を試みる。

### 【2】研究の成果

#### [2-1]本研究で明らかになった研究成果

NgR1 の 3' に位置する神経活動依存性エンハンサーの上流と下流を標的とする 2 種類のガイド RNA、ヒト NgR1 神経活動依存性エンハンサーを含む DNA 断片及び Cas9 をマウス受精卵に electroporation し、ヒト NgR1 神経活動依存性エンハンサーをもつマウスの樹立を試みた。以下の複数の条件を検討して、得られた産児をゲノム PCR によりスクリーニングを行ったが、ヒト型エンハンサーに置換されたマウスは樹立できなかった。

## 検討内容

- ・マウスエンハンサーを欠損させ、同時にヒトエンハンサーを導入する実験
- ・マウスエンハンサーを欠損させた受精卵に、ヒトエンハンサーを導入する実験  
(2か所の標的配列の切断が起こる確率が低いためと考え、得られたエンハンサー欠損マウスを用い、ガイドRNAを1種類に減らしヒト NgR1 神経活動依存性エンハンサーのノックインを試みた。)
- ・受精卵に導入する DNA として、二本鎖 DNA
- ・受精卵に導入する DNA として、一本鎖 DNA

## [2-2]本共同研究による波及効果および今後の発展性

ヒトの統合失調症と関連が認められる NgR1 の機能的 SNP が統合失調症様行動異常にどのような影響を与えるかマウスの行動実験を用いて解明できれば、統合失調症新規治療法の開発につながる可能性がある。

### 【3】主な発表論文等

論文発表、学会発表、成果資料等

1) Copy number elevation of 22q11.2 genes arrest the developmental maturation of working memory capacity and adult hippocampal neurogenesis.

Boku S, Izumi T, Abe S, Takahashi T, Nishi A, Nomaru H, Naka Y, Kang G, Nagashima M, Hishimoto A, Enomoto S, Duran-Torres G, Tanigaki K, Zhang J, Ye K, Kato S, Männistö PT, Kobayashi K, Hiroi N.

2) Contribution of Endothelial-to-Mesenchymal Transition to the Pathogenesis of Human Cerebral and Orbital Cavernous Malformations.

Takada S, Hojo M, Tanigaki K, Miyamoto S.

### 【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

竹本龍也博士が開発された、electroporation を用いたゲノム編集マウスを作製する方法を用いれば、非常に高効率に遺伝子の欠損誘導や SNP の導入は高確率に可能である。一方で、外来遺伝子の導入は、共同研究開始時には達成されておらず、非常にチャレンジングな課題であった。共同研究期間中に、竹本らが平行して行った実験で、EGFP などの比較的短い遺伝子の挿入に成功している。本研究が目指すヒト NgR1 エンハンサーノックインは 3Kb と非常に長いため、作成に至らなかったと推測している。本研究の様なヒト型 DNA 断片の挿入は、医科学分野全般において重要な課題であるため、引き続き共同研究を行う。