

Fbxw 遺伝子クラスターを欠失する ES 細胞の作製

西村 和真¹・中村 肇伸^{1,2}

¹長浜バイオ大学バイオサイエンス学部アニマルバイオサイエンス学科

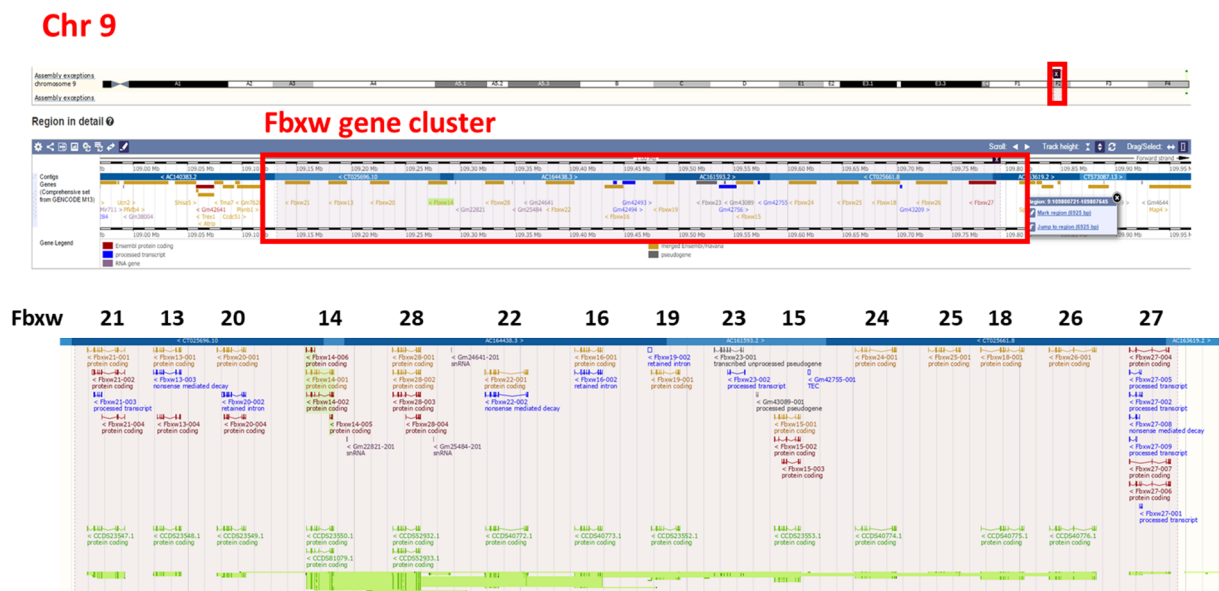
²長浜バイオ大学ゲノム編集研究所

要旨

本研究では、全能性を有する初期の着床前胚で特異的に発現する遺伝子を *in silico* で探索し、Fbxw (Fbox/WD repeat containing protein) 14 を同定した。また、マウスの 9 番染色体には Fbxw14 を含め、15 個の Fbxw 遺伝子がクラスターを形成し、その全てが全能性細胞で特異的に発現していることを明らかにした。さらに、このクラスターに存在する Fbxw 遺伝子は、核酸及びアミノ酸レベルで高い相同性を示すことから、各遺伝子の機能が重複する可能性が示唆された。本研究では、CRISPR/Cas システムを用いて、このクラスター全体を欠失する ES 細胞の作製を試みた。

1. Fbxw 遺伝子群の同定

全能性細胞で高発現する遺伝子群を同定するために、NCBI の DDD (Digital Differential Display) を用いて *in silico* screening を行った。その結果、823 個の遺伝子が受精卵から桑実胚の間で特異的に発現する候補遺伝子として同定された。その中から、ヒトゲノムにホモログが存在し、かつ機能未知の遺伝子を抽出し、F-box ドメインを有する Fbxw14 と Fbxw18 を同定した。また、Fbxw14 と Fbxw18 はマウスの 9 番染色体の同じ領域に存在し、合計 15 個の Fbxw 遺伝子がクラスターを形成していることが明らかとなった (図 1)。



Modified from Ensembl genome browser 95

図 1 Fbxw 遺伝子クラスター

Fbxw クラスターに存在する遺伝子間の相同性について検討したところ、Fbxw 遺伝子間では核酸レベルで非常に高い相同性を示し、アミノ酸レベルでも高い相同性を示すことが明らかとなった。これらのことから、この遺伝子クラスターに存在する Fbxw 遺伝子の機能は遺伝子間で重複している可能性が示唆された。

Species	Gene Symbol	Identity (%)	
		Protein	DNA
M.musculus	Fbxw21		
vs. M.musculus	Fbxw13	74.0	87.1
vs. M.musculus	Fbxw14	67.3	82.4
vs. M.musculus	Fbxw15	71.0	83.7
vs. M.musculus	Fbxw16	72.2	85.3
vs. M.musculus	Fbxw18	71.9	84.8
vs. M.musculus	Fbxw19	71.5	84.4
vs. M.musculus	Fbxw20	74.4	86.2
vs. M.musculus	Fbxw22	70.6	84.2
vs. M.musculus	Fbxw23	71.7	84.4
vs. M.musculus	Fbxw24	70.6	83.5
vs. M.musculus	Fbxw26	72.8	85.0
vs. M.musculus	Fbxw27	71.6	83.5
vs. M.musculus	Fbxw28	67.7	82.6

Data from NCBI HomoloGene

図2 Fbxw クラスターに存在する遺伝子の相同性

2. Fbxw 遺伝子クラスターを欠失する ES 細胞の作製

Fbxw クラスターに存在する 1 個の遺伝子を欠失させても、他の遺伝子が欠失した遺伝子の機能を相補する可能性が高いため、Fbxw クラスター全体を欠失させることにより、生体内での Fbxw 遺伝子群の機能を解析することとした。現在までに、CRISPR/Cas システムを用いて全長約 150kbp の Dux cluster のノックアウトマウスが作製されているが^{1,2)}、Fbxw クラスターは全長約 650kbp もあるため、本研究では高効率で大規模な欠失を誘導することができるトリプルターゲット CRISPR/Cas システム^{3,4)}を用いることとした。また、受精卵において大規模に欠失を誘導することは困難であることが予想されるため、ES 細胞を用いて Fbxw 遺伝子クラスター全体の欠失を試みた。図 3A に示すように Fbxw 遺伝子クラスターの両端と中央に計 3 種類の guideRNA を設計した。これらの gRNA を用いて ES 細胞において Fbxw 遺伝子クラスター全体が欠失できるかどうかを検討した。ゲノム編集後の ES 細胞からゲノムを回収し、

図 3A に示すプライマーにより、Fbxw 遺伝子クラスターの欠失の有無を検討した。その結果、図 3B に示すように、クラスターの両端に設計した 2 種類の gRNA (gRNA1 と 3) を用いた場合でも、3 種類の gRNA (gRNA1 と 2 と 3) よりは効率が低いもののクラスター全体が欠失できることが明らかとなった。今後、この ES 細胞を用いて Fbxw 遺伝子クラスターのノックアウトマウスを作製し、このクラスターに存在する遺伝子の機能を解析する予定である。

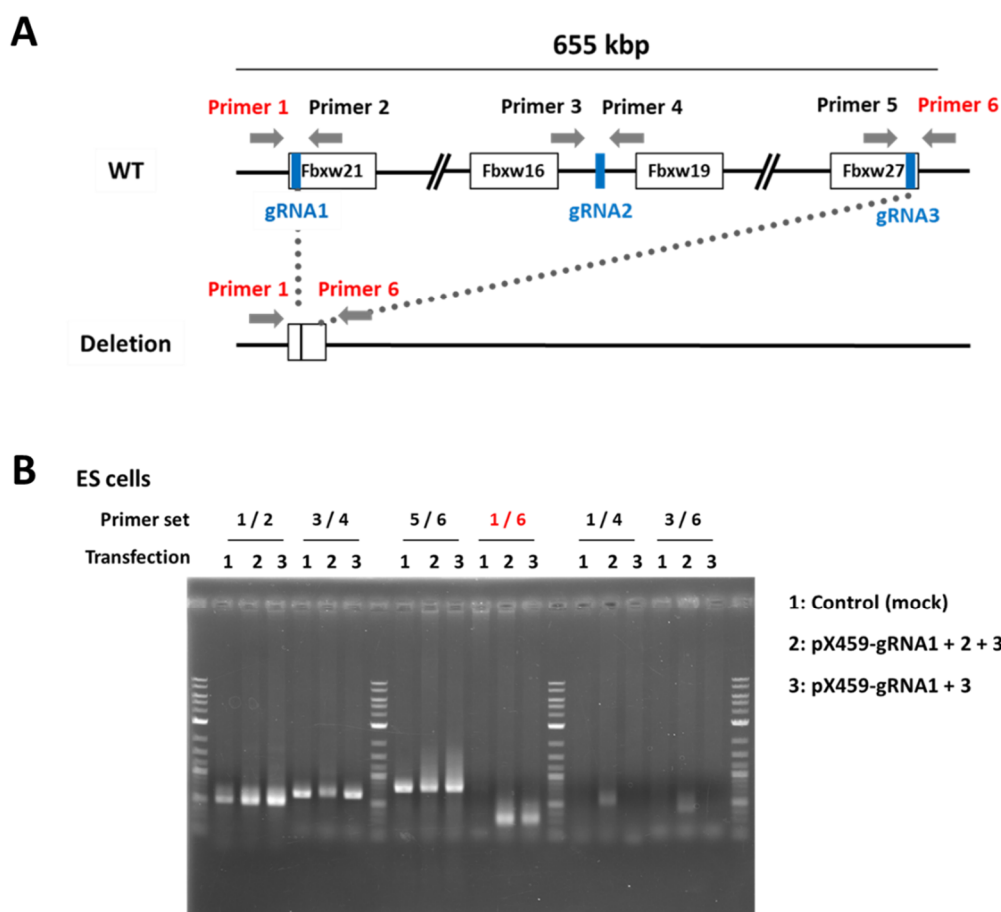


図 3 Fbxw 遺伝子クラスターを欠失する ES 細胞の作製

参考文献

- 1) Chen Z and Zhang Y., Loss of DUX causes minor defects in zygotic genome activation and is compatible with mouse development., **Nature genetics**. 51, 947-951, (2019).
- 2) De Iaco A, Verp S, Offner S, Grun D, and Trono D., DUX is a non-essential synchronizer of zygotic genome activation., **Development**. 147, dev177725, (2020).
- 3) Susaki EA, Ukai H, and Ueda HR., systems biology. Next-generation mammalian genetics toward organism-level., **NPJ System Biology Applications**. 3, 15 (2017).
- 4) Sunagawa GA, Sumiyama K, Ukai-Tadenuma M, Perrin D, Fujishima H, Ukai H, Nishimura O, Shi S, Ohno R, Narumi R, Shimizu Y, Tone D, Oda KL, Kuraku S, and Ueda HR., Mammalian Reverse Genetics without Crossing Reveals Nr3a as a Short-Sleeper Gene., **Cell Reports**. 14, 662-677 (2016).