

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06802

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いた両生類の高度モデル動物化のために必要なストラテジーの確立

研究課題名(英文) Development of gene targeting strategies for amphibian research using genome editing

研究代表者

鈴木 賢一 (Suzuki, Ken-ichi)

広島大学・理学研究科・特任准教授

研究者番号：90363043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ポストゲノム時代を迎えた両生類研究において、遺伝子ターゲティング技術の開発は非常に重要かつ喫緊の課題である。近年のゲノム編集技術の発展によりアフリカツメガエル、ネッタイツメガエル、そしてイベリアトゲイモリにおいても逆遺伝学ツールの導入が可能となりつつある。本研究課題では、CRISPR-Casを基盤とした、高効率ノックアウトとノックイン、そしてコンディショナルKOやセーフハーバートランスジェニックシステムの開発を試みた。

研究成果の概要(英文)：Following completion of the genome sequences of amphibians, gene targeting techniques have become increasingly important for the further development of amphibian research in the life sciences. Recent advances in genome editing using the CRISPR-Cas system now allow for reverse genetics in the amphibians, *Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis*, and *Pleurodeles waltl*. In order to refine these amphibians as model animals for life science research, we tried to develop a highly efficient and rapid workflow for gene knock-out, gene knock-in, conditional knock-out, and safe harbor transgenic systems.

研究分野：発生生物学

キーワード：ネッタイツメガエル アフリカツメガエル イベリアトゲイモリ ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

人工ヌクレアーゼである TALEN や CRISPR/Cas システムは、ゲノム編集技術の中心的なツールとして、Knock-out (KO) や Knock-in (KI) がこれまで不可能とされてきた非モデル生物にまで波及している。ゲノム編集技術は生命科学においてパラダイムシフトをもたらした技術革新の一つであり、実験動物学領域のみならず生命科学全体の進歩の大きな原動力となりつつある。

両生類は、古くから細胞生物学・発生生物学・内分泌学・生理学等、基礎生物学に多大な貢献をしてきた実験動物である。特にアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は飼育が容易で、未受精卵・胚を多数得ることができるため、生物学において長年用いられてきた。しかしながら、性成熟の期間が長く (二年程度)、偽四倍体による遺伝子重複があることから、順・逆遺伝学的手法を用いることが難しい。そのため、分子遺伝学的手法を用いる現代生物学の潮流から外れていた感は否めない。その弱点を補うべく、十年ほど前からネッタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) という近縁種が導入されている。アフリカツメガエルより性成熟が最短六ヶ月と短く、二倍体でゲノムプロジェクトが完了している。日本国内ではナチュラルバイオリソースプロジェクト (NBRP) の供給が整いつつあるが、ゲノム編集を中心とした研究戦略整備の遅れから、ツメガエルコミュニティだけでなく一般研究者の導入が進まない現状がある。欧米では、ゲノム編集をメインストラテジーとしたネッタイツメガエルを用いた研究、特に疾患モデル作製が精力的に計画されており、このままでは日本におけるツメガエルを用いた生命科学研究は大きく取り残される危険性がある。

高い再生能力を持つ有尾両生類であるイベリアトゲイモリ (*Pleurodeles waltl*) は飼育が容易であり、性成熟が半年程度と、モデル生物としての利点が多い。加えて、ゲノム編集技術やトランスジェニックによる遺伝子改変動物作製が容易かつ非常に高効率である。これは、第一卵割が 5~6 時間と長く、非常に早い卵割ステージで変異が導入 (トランスジェニック) されるためである。つまり、モザイク性が低い Founder を確保することが可能である。これらの生物学的特徴はゲノム編集技術を用いた逆遺伝学を行う上で大きなメリットであり、近年、大きな可能性を秘めた新たなモデル動物として注目されている。

2. 研究の目的

現在の実験動物学における遺伝子改変動物作製の戦略は、トランスジェニックとゲノム編集の二つである。両生類において

は、メガヌクレアーゼ ISce-I や精子核移植法によるトランスジェネシスが主流である。しかしながら、この方法は挿入されるコピー数やゲノム上の位置を指定できない。加えて、位置効果により外来遺伝子が F1 以降にサイレンシングを受けるとの報告が多数ある。そのため、マウスの Rosa26 への外来遺伝子導入に相当する、「Safe harbor system」が必要である。加えて、胎生致死になるような遺伝子の KO には、時期組織特異的な KO 「conditional KO system」が必要となる。これら二つのシステムは、逆遺伝学的ストラテジーを用いた今後の両生類研究においても必要不可欠であるが、未だ確立されていない。本研究課題では、研究期間を三年と設定している。まず、高効率かつ安定した外来遺伝子の発現が可能なトランスジェニック技術 (Safe harbor system)、および Cre/loxP による Conditional KO system の開発を目指す。これらの技術を用いて、ネッタイツメガエルとイベリアトゲイモリのモデル動物としての開発及び高度化を促進するための研究戦略を確立する。

3. 研究の方法

① Safe harbor system の開発 (鈴木・大学院生二名担当、広島大; 林、鳥取大)
研究代表者らは Microhomology mediated end-joining (MMEJ) を用いた Knock-in 法である、PITCh (Precise Integration into Target Chromosome) 法を開発し報告している (Nakade et al., Nature Communications, in press)。この方法は様々な生物種で応用可能であり、相同組換えに依存しない、高効率な KI 法である。PITCh 法を用いて、マウスの Rosa26 やヒトの AAVs locus と同じ “good locus” に、外来遺伝子を安定制御して挿入する 「Safe harbor system」を構築する。加えて、マウスやヒトでも safe harbor として機能する Roas26 site のオルソログも両生類には存在している。これらのサイトを用いて Multi-integrase/recombinase による外来遺伝子の挿入・排出を可能とする Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) を行うため、変異 loxP、attP や FRT sites を組み込んだ scaffold cassette を PITCh 法により Knock-in する (図1)。この cassette には、g-crystallin promoter に Enhanced Blue Fluorescent Protein (EBFP) を連結しておき、眼の青色蛍光をマーカーとしてスクリーニングを行う。得られた Founder (F0) をスクリーニング後、当該年度中に性成熟させる。

② Conditional KO system の開発 (鈴木・大学院生二名担当、広島大; 林、鳥取大)

発生生物学研究や疾患モデルを想定した場合、個体（発生）にクリティカルな遺伝子の conditional KO は、モデル動物において必須のストラテジーである。しかしながら、ショウジョウバエやマウス等のごく一部の生物種に限られており、一般的に特異性の高い Cre/loxP を用いたシステムが用いられている。このシステムでは、標的領域の両側に loxP (Flox) を挿入するため、loxP を含んだ cassette の標的領域への相同組換えによる Knock-in が必要である。本課題では、より簡便な MMEJ ノックインを用いて、ネッタイツメガエル及びイベリアトゲイモリにおいて Cre/loxP を用いた Flox Conditional KO システムの導入を目指す。

4. 研究成果

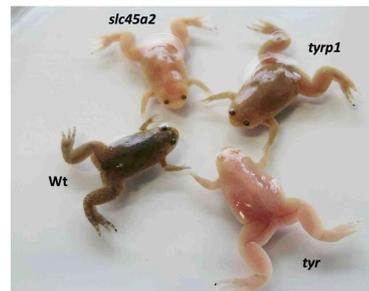
平成27年度

初年度は、ゲノム編集法を用いた高効率の遺伝子改変（ノックアウト・ノックイン）技術プロトコルの確立を行うため、様々な実験条件の検討やジェノタイピング法の開発を行った。まず初めに、色素合成に関する遺伝子をノックアウトすることにより CRISPR-Cas9 システムの有効性を検討した。表現型解析およびアンプリコンシークエンス解析を用いたジェノタイピングの結果、Cas9 mRNA およびタンパク質インジェクションにより、F0（当世代）個体に置いて、体細胞変異率が95%以上という、非常に高い遺伝子変異導入に成功した。Cas9 mRNA 及び gRNA 合成の最適化、変異導入効率やオフターゲット解析法を検討し、当世代 (F0) 胚による簡便かつ高効率な遺伝子ノックアウトプロトコルを確立した。次に、ネッタイツメガエルにおけるノックイン技術の開発を行った。様々な条件検討の中で、マイクロホモロジー媒介末端連結 (MMEJ) を利用したノックイン法がネッタイツメガエルにおいて有効であることが示唆された。そこで、CRISPR-Cas9 とドナーベクターをネッタイツメガエル受精卵に導入し、変異型疾患遺伝子 X cDNA を標的遺伝子 X のイントロンに MMEJ を介してノックインする実験を行った。標的領域への疾患型遺伝子 cDNA のノックインがジェノタイピングにより確認した。これらの個体に関しては性成熟させ、次世代を得る予定である。

平成28年度

ネッタイツメガエルのゲノム編集効率を向上させるために、リコンビナント Cas9 タンパク質と sgRNA をリボヌクレチドタンパク質 (RNP) 複合体（以下 Cas9/sgRNA RNP）として導入する条件について検討した。Burger ら (2016) が実験に用いた Buffer 組成に基づいて Cas9/sgRNA RNP をネッタイツメガエル受精卵に導入すると、孵化前後に奇形が生じ、正常発生率の低下が確認された。そこで Buffer 組成を変えて導入したところ、正常発生率は高いままに、シビアなノックアウト表

現型が高効率で得られた。この条件下で、ヒト遺伝性色素合成疾患遺伝子 4 種類及び眼疾患遺伝子を標的とする sgRNA を作製し顕微注射した結果、生存胚のほぼ全ての胚でシビアな表現型



（メラニン色素が全く見られないアルビノ胚、図1）が得られた。次世代シークエンサーを用いてアンプリコン解析を行ったところ、驚くべきことに、全ての胚において変異導入効率が98%を超え、中には野生型アリルが検出できない、つまり、100%に限りなく近い変異を持った個体が複数確認された。この確立したプロトコルは、Cas9 mRNA を用いた従来のプロトコルと比較しても、非常に高効率である。次に、研究代表者が開発したマイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) を利用したノックイン法を用いて、ノックインに最適な Cas9/sgRNA RNP 導入条件の設定

した。loxP 配列を含むヒト疾患遺伝子 cDNA (Flox-gene X cDNA) 及びセレクションマーカーとして、クリスタリンプロモーターにより赤色蛍光タンパク質発現するコンストラクトをノックインしたネッタイツメガエルの作製を試み、現在、性成熟した F0 個体が得られた (図2)。今後は生殖細胞系伝達した F1 の作出を目指す。イベリアトゲイモリに関しても、CRISPR を用いたゲノム編集の実験系が確立した。安定して外来遺伝子をノックインする領域も同定し終わり、新しい外来遺伝子発現システム用のベクターもすでに作製している。

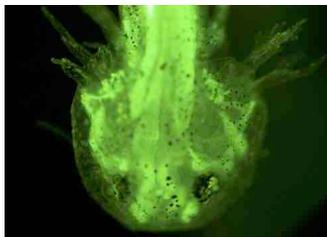


平成29年度

本研究課題の最終年度である平成29年度は、ヒト病態遺伝子を持つネッタイツメガエルの作製及びイベリアトゲイモリにおける高効率トランスジェニックシステムの開発を引き続き遂行した。まず、昨年度に引き続きイベリアトゲイモリのゲノム編集効率を向上させるために、リコンビナント Cas9 タンパク質と sgRNA をリボヌクレチドタンパク質 (RNP) 複合体として導入する条件について検討した。次世代シークエンサーを用いてアンプリコン解析を行ったところ、驚くべきことに、全ての胚において変異導入効率が98%を超えた個体が複数確認された。最終的に、ファウンダー胚 (F0) において迅速な遺伝子機能解析が可能なシステムを両種で確立す

ることに成功した。

次に、ヒト病態モデルツメガエルの作製するため。ネットイツメガエルの遺伝子 X 領域に疾患変異型ヒト X 遺伝子 cDNA のノックインを行い、F0 及び F1 個体の作出を試みた。CRISPR-Cas とドナーベクターを顕微注入し、PCR によるジェノタイプピングの後、ノックインポジティブ F0



個体を性成熟させ、F1 世代の作出を行った。得られた F1 世代個体についてジェノタイプピングを行ったが、ドナーベクターの標的領域へのノックインは確認できなかった。F0 体細胞へのノックインはジェノタイプにより確認されていることを考慮すると、この結果は生殖系列へのノックイン効率が低いことを示唆している。今後、残りのジェノタイプポジティブ F0 個体も性成熟させ、F1 個体の作出を引き続き行っていく。

また、イベリアトゲイモリの safe harbor site の同定に成功し、この site へのドナーベクターのノックインに成功した(図3)。レポーター蛍光は全身性で安定して発現しており、高効率トランスジェニックシステム技術のめどが立った。今後は F1 の作出を行い、生殖系列への伝播を確認する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件) すべて査読有

1. *Suzuki K, Sakane Y, Suzuki M, Yamamoto T: A simple knock-in system for *Xenopus* via microhomology-mediated end joining repair. *Methods in Molecular Biology*, in press.
2. Sakane Y, Iida M, Hasebe T, Fujii S, Buchholz DR, Ishizuya-Oka A, Yamamoto T, *Suzuki K: Functional analysis of thyroid hormone receptor beta in *Xenopus tropicalis* founders using CRISPR-Cas. *Biology Open*, 7(1): doi: 10.1242/bio.030338, 2018.
3. Matsushita M, Ochiai H, Suzuki K, Hayashi S, Yamamoto T, Awazu A, Sakamoto N: Dynamic changes in the interchromosomal interaction of early histone gene loci during early development of sea urchin. *Journal of Cell Science*, 130(24):4097-4107, 2017.
4. Satoh A, Mitogawa K, Saito N, Suzuki M, Suzuki K, Ochi H, Makanae A: Reactivation of larval keratin gene (krt62.L) in blastema epithelium during *Xenopus* froglet limb regeneration. *Developmental Biology*, 432(2):265-272, 2017.
5. Mori J, Sanoh S, Kashiwagi K, Hanada H, Shigeta M, Suzuki K, Yamamoto T, Kotake Y, Sugihara K, Kitamura S, Kashiwagi A, Ohta S: Developmental changes in drug-metabolizing enzyme expression during metamorphosis of *Xenopus tropicalis*. *The Journal of Toxicological Sciences*, 42(5):605-613, 2017.
6. Sakane Y, *Suzuki K, Yamamoto T: A Simple Protocol for Loss-of-Function Analysis in *Xenopus tropicalis* founders using the CRISPR-Cas System. *Methods in Molecular Biology*, 1630:189-203, 2017.
7. *Suzuki K, Suzuki M, Shigeta M, Joshua FD, Mawaribuchi M, Takahashi M, Yamamoto T, Taira M, Fukui A: Clustered *Xenopus* keratin genes: A genomic, transcriptomic, and proteomic analysis. *Developmental Biology*, 426(2):384-392, 2017.
8. Shigeta M, Sakane Y, Iida M, Suzuki M, Kashiwagi K, Kashiwagi A, Fujii S, Yamamoto K, *Suzuki K: Rapid and efficient analysis of gene function using CRISPR-Cas9 in *Xenopus tropicalis* founders. *Genes to Cells*, 21(7): 755-771, 2016.
9. Takemoto A, Miyamoto T, Simono F, Kurogi N, Shirae-Kurabayashi M, Awazu A, Suzuki K, Yamamoto T, Sakamoto N: Cilia play a role in breaking left-right symmetry of the sea urchin embryo. *Genes to Cells*, 21(6): 568-578, 2016.
10. Suzuki M, Takagi C, Miura S, Sakane Y, Sakuma T, Sakamoto N, Endo T, Kamei Y, Kimura H, Yamamoto T, Ueno N, *Suzuki K: In vivo tracking dynamics of histone H3 lysine 9 acetylation in *Xenopus laevis* tail regeneration. *Genes to Cells*, 21(4): 358-369, 2016.
11. Sakuma T, Nakade S, Sakane Y, Suzuki K, Yamamoto T: MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCH systems. *Nature Protocols*,

11(1): 118-133, 2016.

〔学会発表〕(計 3件)

1. 鈴木賢一 ネットアイツメガエルにおけるゲノム編集、平成29年度NBRP ネットアイツメガエル技術講習会 (2018年3月1日)
2. 鈴木賢一 ネットアイツメガエルにおけるゲノム編集、平成28年度NBRP ネットアイツメガエル技術講習会 (2017年3月2日)
3. 鈴木賢一 ネットアイツメガエルにおけるゲノム編集、平成27年度NBRP ネットアイツメガエル技術講習会 (2016年3月1日)

〔図書〕(計 3件)

1. 鈴木賢一: 両生類でのゲノム編集、「All About ゲノム編集」(山本卓編): p98-103、2016、羊土社
2. 重田美津紀、鈴木賢一、山本卓: ゲノム編集における RGEN-RFLP 法を用いた簡便で正確なジェノタイピング法 -MultiNA の活用-、Application Note No. 37、島津製作所、2016
3. 岡田令子、鈴木賢一: 両生類の変態: 分子から個体レベルの制御、生物科学「特集:動物の成熟」、第67巻第3号: p146-153、2016

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 賢一 (SUZUKI KEN-ICHI)

広島大学・大学院理学研究科・特任准教授

研究者番号: 90363043

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

林 利憲 (Hayashi Toshinori)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号: 60580925

(4) 研究協力者

()