

平成 30 年 4 月 26 日現在

機関番号：82508

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06927

研究課題名(和文) ヒト人工染色体を利用した迅速な巨大ゲノム領域のクローニングおよび他細胞への移植

研究課題名(英文) Rapid cloning and transfer of a huge genome DNA using human artificial chromosome

研究代表者

長谷川 嘉則 (Hasegawa, Yoshinori)

公益財団法人かずさDNA研究所・バイオ研究開発部・チーム長

研究者番号：30387683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR/Cas9システムの最適化により、目的遺伝子(GOI)の両側に部位特異的組換えサイトであるVLoxサイトとSLoxサイトの挿入効率を上げることができた。しかし、その効率は細胞種毎に大きく異なった。その後のHACベクターへのGOIの挿入では、細胞種間での効率には差が少なく、総DNA長が600kb以上についても成功した。GOI搭載HACベクターの、他細胞へのトランスファーには、試した細胞種全てにおいて成功した。1. 巨大ゲノム領域のHACベクターへのクローニング、2. 巨大ゲノム領域搭載HACベクターの目的細胞へのトランスファーまでの工程を2ヶ月で完了させることは十分可能になった。

研究成果の概要(英文)：It was increased an insertion efficiency of VLox and SLox sites, which are used for site specific recombination, on both sides of the target gene (GOI) by optimizing the reaction conditions of a CRISPR/Cas9 system. However, the efficiency varied greatly among cell types. On the other hand, the efficiency of the GOI into the HAC vector was little difference between cell types, and also succeeded for GOI with a total DNA length of 600 kb. It was succeeded in transferring HAC vector carrying GOI to other cells in all cell types tested. By selecting the host cell type, it was possible to complete the process up to cloning of the large GOI into the HAC vector, and transfer of the HAC vector carrying the GOI to the target cell in 2 months.

研究分野：細胞工学

キーワード：巨大ゲノム クローニング ヒト人工染色体 部位特異的組換え Vlox Slox

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノム解読の進展に伴い、「制御領域全体を含んだ巨大な遺伝子領域を対象とした発現解析」や「リボソーム RNA 反復配列 (rDNA) のように大きな非コード DNA 領域を含む巨大反復配列等の長大なゲノム DNA 領域の機能解析」が重要性を増していた。しかし、巨大ゲノム領域のクローニングは非常に困難であり、たとえ成功したとしても結果的に多くの時間を費やしてしまう状況であった。

申請者のグループは、ヒトセントロメア領域に存在するアルフォイド DNA をヒト培養細胞の HT1080 細胞に導入する事によって、ヒト人工染色体 (Human artificial chromosome, HAC) を効率良く作製するという方法を世界で初めて確立した (Ikeno et al., Nat Biotechnol., 1997)。一旦作製された HAC は、細胞のもつ本来の染色体からは独立して存在し、細胞周期に応じて複製、分配されるため、長期間にわたり細胞を培養した場合においても安定に維持される。これらの HAC の特性を基にして、従来ベクター系が抱える問題を克服する HAC ベクターを開発した (Ikeno, Suzuki, Hasegawa, Okazaki, Nucleic Acid Res., 2009)。HAC ベクターは、「狙ったコピー数の遺伝子挿入が可能」、「ゲノム由来の調節領域を含めた巨大な遺伝子領域を挿入できる」などの有利な特性を持つ。申請者らは、ヒト MHC のクラス II 分子である、制御領域を含む 100kb の HLA-DRA 遺伝子と 50kb の HLA-DRB1 遺伝子を 1 コピーずつ搭載した HAC ベクター (HLA-HAC) を保有するマウスを作製した。HLA-HAC はマウス個体において 8 世代以上も安定に継承することが確認され、搭載した遺伝子は組織特異的発現が見られた。発現した HLA-DRA と HLA-DRB1 はヘテロダイマーを形成し表面抗原として機能的に働いていた。これらの成果をまとめて報告したところである (Hasegawa et al, Chromosoma, 2014)。また、HAC ベクターへ搭載可能な DNA のサイズは事実上無限であり、2.4Mb にも及ぶヒトジストロフィン遺伝子を HAC ベクターに挿入した例も報告されている (Hoshiya et al., Molecular Therapy, 2009)。このように複数の巨大ゲノム領域についてコピー数を制限して搭載することが可能なベクターは、HAC ベクターだけである。

BAC クローンや YAC クローンの HAC ベクターへの挿入には 2 ヶ月を要する。その後、目的の細胞へのトランスファーにさらに 2 ヶ月を要する。他方、任意のゲノム領域を HAC ベクターへ挿入するためには、1. 目的遺伝子を持つ染色体への薬剤耐性遺伝子挿入、2. マウス A9 細胞 (染色体トランスファーが可能な細胞) へ薬剤耐性遺伝子を挿入した染色体をトランスファー、3. HAC ベクター保有ニワトリ DT40 細胞 (相同組換えの活性が高く染色体改変可能な細胞) へ染色体をトランスファー、4. DT40 細胞内で遺伝子近傍への部位特異的組換えサイトの挿入、5. DT40 細胞

内での HAC ベクターへの目的遺伝子の挿入、6. 遺伝子搭載 HAC ベクターの CHO 細胞 (染色体トランスファーが可能な細胞) へのトランスファー、7. 目的の細胞への遺伝子搭載 HAC ベクターのトランスファー、という多くのステップが必要であり、実に約 2 年もの期間を要する。直ぐに HAC ベクターへ挿入出来る巨大なゲノム領域は、現実的には BAC クローンや YAC クローンの利用に限られていると言える。

近年 CRISPR/Cas9 システムという新規のゲノム編集技術が定着した。目的のゲノム位置の切断効率が高く、切断箇所への DNA 配列挿入の応用も可能で、操作が非常に簡便であることが、急速に利用者が増えた理由である。一方、申請者らは、蔗糖密度勾配遠心法にて HAC ベクターを高度に精製した後、市販のトランスフェクション試薬を用いてトランスフェクションを行うことにより、HAC ベクターを任意の宿主細胞から任意のレシピエント細胞へ直接トランスファーすることを可能にした (Suzuki, Itou, Hasegawa, Okazaki, Ikeno, Nucleic Acids Res., 2010)。また、申請者らのグループは、Cre/loxP や Flp/FRT の部位特異的組み換えシステムとクロス反応しない新しい部位特異的組み換えシステム、VCre/VloxP と SCre/SloxP を開発した (Suzuki and Nakayama, Nucleic Acid Res., 2011)。VCre/VloxP と SCre/SloxP は使用方法を最適化することにより、Cre/loxP や Flp/FRT に比べ部位特異的組み換え効率が高くなる事を確認している。

### 2. 研究の目的

導入 DNA のサイズに制限がないヒト人工染色体 (HAC) ベクターと CRISPR/Cas9 システムを利用することによって、1. 巨大ゲノム領域の HAC ベクターへのクローニング、2. 巨大ゲノム領域搭載 HAC ベクターの目的細胞へのトランスファーまでを僅か 2 ヶ月で完了させる方法を確立する。

### 3. 研究の方法

巨大ゲノム領域挿入のための VLox サイトと SLox サイトが挿入された HAC ベクター保有ヒト細胞において、CRISPR/Cas9 システムを利用して、制御領域を全て含んだ数百 kb 以上の目的の標的遺伝子 (GOI) の両側に VLox サイトと SLox サイトを挿入する。次に、VCre 酵素と SCre 酵素を同時に発現させて、部位特異的組換えにより、GOI を HAC ベクターへ挿入する。GOI 搭載 HAC ベクターを、複数種の細胞へトランスファーを行う。ここまでの工程を 2 ヶ月で完了させる。具体的には、研究初年度に、1. 制御領域を含んだ総 DNA 長が数百 kb 以上になるような GOI を設定する。2. GOI の両脇で CAS9 がターゲット出来る位置に guideRNA プラスミドを作製する。3. CAS9 がターゲットして切断する位置の上流と下流に各 500bp ずつの相同配列で VLox サ

イトまたは SLox サイトを挟んだプラスミドを作製する。両方のプラスミドに薬剤選択遺伝子を搭載する。4. HAC ベクター保有ヒト細胞における遺伝子発現に適したプロモーターを持つ CAS9 発現ベクターを作製する。5. HAC ベクター保有ヒト細胞へ、CAS9 プラスミド・guideRNA プラスミド・VLox サイトプラスミド・SLox サイトプラスミドをトランスフェクション。6. VCre 酵素プラスミドと SCre 酵素プラスミドをトランスフェクション。HAC ベクターへ GOI を挿入する。研究の二年目に、1. 蔗糖密度勾配遠心法を用いて、GOI 搭載 HAC ベクターを他の染色体から単離する。2. 単離した GOI 搭載 HAC ベクターを市販のトランスフェクション試薬を用いて、マウス ES 細胞を含む様々な細胞へトランスファーを行なう。3. VLox サイトプラスミドと SLox サイトプラスミドに搭載した薬剤選択遺伝子で、薬剤選択を行う。4. 薬剤耐性クローンについて、PCR・FISH・パルスフィールド電気泳動にて HAC ベクターおよび GOI の有無欠失等の構造変化がないか調べる。5. GOI 搭載 HAC ベクター保有マウス ES 細胞からトランスジェニックマウスを作製する。6. 上記と平行して、CAS9 プラスミド・guideRNA プラスミド・VLox サイトプラスミド・SLox サイトプラスミド、および VCre 酵素プラスミドと SCre 酵素プラスミドのトランスフェクションの様々な組み合わせとタイミングを調べて、GOI 搭載 HAC ベクターのトランスファー後の薬剤耐性クローン数が多い条件を検討する。研究の三年目には、3. 過去2年間の結果を考察しながら、より効率の良い HAC ベクターへの巨大ゲノム領域クローニング条件の検討を行なった。

#### 4. 研究成果

本研究を成功させるためには、一回の CRISPR/Cas9 の反応によって、GOI の両側に VLox サイトと SLox サイトを同時に挿入することが必須である。反応条件と標的配列の最適化により、挿入効率を上げて、GOI の両側に一遍に VLox サイトと SLox サイトを挿入することができた。しかし、その効率は、細胞種毎に大きく異なった。HeLa 細胞では高効率であったが、HEK293 では低効率であった。各細胞種での相同組換えの効率の違いによるものと考えられた。その後の HAC ベクターへの GOI 挿入は、細胞種間での効率には差が少なく、総 DNA 長が 600kb 以上の GOI についても成功した。GOI 搭載 HAC ベクターを他細胞へトランスファーを行うことについては、試した細胞種全てにおいて成功した。CRISPR/Cas9 システムの標的配列の最適化と適切なホスト細胞種を選択することにより、1. 巨大ゲノム領域の HAC ベクターへのクローニング、2. 巨大ゲノム領域搭載 HAC ベクターの目的細胞へのトランスファーまでの工程を2ヶ月で完了させることは十分可能であった。

#### 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 3件)

Atsumi T, Suzuki H, Jiang JJ, Okuyama Y, Nakagawa I, Ota M, Tanaka Y, Ohki T, Katsunuma K, Nakajima K, Hasegawa Y, Ohara O, Ogura H, Arima Y, Kamimura D, Murakami M. Rbm10 regulates inflammation development via alternative splicing of Dnmt3b. *Int Immunol*. 2017 Dec 31;29(12):581-591. doi: 10.1093/intimm/dxx067.  
Nemoto K, Kagawa M, Nozawa A, Hasegawa Y, Hayashi M, Imai K, Tomii K, Sawasaki T. Identification of new abscisic acid receptor agonists using a wheat cell-free based drug screening system. *Sci Rep*. 2018 Mar 9;8(1):4268. doi: 10.1038/s41598-018-22538-9.

[学会発表](計 3件)

長谷川嘉則、次世代シークエンサーの活用法と次世代シークエンサーを用いた若返るペニクラゲの研究、第11回ペニクラゲ研究会、2017年8月  
根本圭一郎、香川真貴子、野澤彰、長谷川嘉則、林実、今井賢一郎、富井健太郎、澤崎達也、コムギ無細胞系を基盤としたABA受容体とプロテインホスファターゼの相互作用の解析とその解析系を利用した新規ABAアゴニスト化合物の同定、植物化学調節学会第52回大会、2017年10月  
永尾侑平、三村尚也、竹田淳恵、吉田健一、塩澤裕介、大島基彦、青山和正、更屋敦則、長谷川嘉則、白石友一、千葉健一、田中洋子、川尻-真子千華、大島-長谷川渚、塚本祥吉、酒井紫緒、竹田勇輔、大和田千桂子、武内正博、堺田恵美子、井関徹、三澤園子、宮野悟、小原収、横手幸太郎、桑原聡、真田昌、岩間厚志、小川誠司、中世古知昭、Genetic and transcriptional analyses of plasma cells in POEMS syndrome、第79回日本血液学会学術集会、2017年10月

[図書](計 0件)

[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

長谷川 嘉則 (HASEGAWA YOSHINORI)  
公益財団法人かずさ DNA 研究所  
バイオ研究開発部・チーム長  
研究者番号：30387683

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )