

令和元年6月11日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01012

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を活用した新しい科学実験法の確立

研究課題名(英文) Establishment of new scientific experiments using genome editing technology

研究代表者

王賀 理恵 (OHGA, Rie)

山梨大学・医学部・医学研究員

研究者番号：00160432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脊椎動物におけるモデル生物であるゼブラフィッシュのゲノムを簡便に改変できるゲノム編集技術を確立することを目指した。さらに、確立した技術を用い遺伝子発現をモニターできるレポーター遺伝子を標的ゲノム部位へ効率良く挿入する技術に応用した。ゲノムの性状を理解するためには、ゲノム改変の過程を観察できる生物学実験が有用と考えられる。本研究では、ゲノム編集技術を行った胚を用いゲノム編集の効率やゲノムに誘導された変異の性状を考察できる生物学実験を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPER/Cas9システムによるゲノム編集技術は、様々な生物種にゲノムの特定の部位に効率よく新たに遺伝子の挿入や欠失による変異を生じさせて、従来の組換え技術より正確で簡便な方法として、急速に技術革新が行われている。農・水産・畜産生物の品種改良や、疾患の解明や治療など医学・薬学・生命科学研究等にも広く活用されている。本研究ではゲノム編集技術の中で速攻型遺伝子挿入実験法の改良と医学部や理学部などの生物学実習においてゲノム編集技術を用いてゲノムの働きや機能を調べる事が可能な科学実験法の確立したことに意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is the establishment of the genome editing technology that easily enables to modify the targeted genomic locus in a model vertebrate zebrafish. Furthermore, this technology was applied to insert efficiently the reporter gene at the targeted genomic locus, leading to monitor its gene expression during embryogenesis. The biological experiment acceptable for observation of genome modifications is useful to understand properties in genome. In this study, I established the biological experiment that is suitable to consider genome editing efficiency and various genomic mutations induced by genome editing using zebrafish embryos modified by the genome editing technology.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ゲノム編集技術 発生工学 技術 遺伝子破壊 遺伝子挿入 科学実験法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む様々な生物種に対するゲノムプロジェクト(全塩基配列の解読)が進められた結果、現在、それらのゲノム情報を生命科学研究に利用できる状況にある。これからの生命科学は、ゲノムに潜む新しい機能を解明することが重要な研究課題と考えられるが、残念ながらゲノムの機能解明に必要な解析技術が十分に揃っていないとも言えない。その主な理由は、ある特定のゲノム領域を自在に操作する技術が存在しなかったことであるが、2013年にCRISPR/Cas9法が開発され、多くの研究者がguide-RNAとCas9 mRNAを受精卵や培養細胞に導入することで、標的ゲノム部位にDNA二重鎖切断を簡便に誘導できるようになった。すなわち、それに連動して機能するゲノム修復の過程で生じる高頻度のエラーを利用することで、簡単に標的遺伝子の破壊を行うことができるようになってきている。

本研究は、モデル脊椎動物であるゼブラフィッシュを用い簡便にゲノム編集を遂行できる技術を確立すること、確立したゲノム編集技術を用い外来遺伝子を標的ゲノム部位に挿入する手法に改良すること、さらに、本研究で用いるゲノム編集技術の評価法を医学部の生物学実験に適用することを目指している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ゼブラフィッシュにおけるゲノムの機能を簡便に解析できるように既存のCRISPR/Cas9法を改良し速攻型のゲノム編集技術を確立することである。さらに、本研究で確立する速攻型CRISPR/Cas9法を外来遺伝子の標的ゲノム部位へのノックイン法へ改良すること、さらに、ゼブラフィッシュにおけるゲノム編集効率の評価法を用い新しい生物学実験を構築することを目的とする。実際には、本研究で化学合成したCRISPR RNA (crRNA), tracrRNA (*trans-activating crRNA*)とCas9タンパク質をゼブラフィッシュ受精卵に注入することにより効率的に遺伝子を破壊する速攻型CRISPR/Cas9法を確立する。次に、速攻型CRISPR/Cas9法を用い緑色蛍光タンパク質(eGFP)を持つレポーター遺伝子を非同末端結合により標的ゲノム部位に効率よく挿入する技術に応用する。さらに、本研究の速攻型CRISPR/Cas9法で得られたゲノム編集胚を用いゲノム編集効率の測定やゲノム変異の性状を考察する医学部の生物学実験に適した生物学実験を樹立する。

## 3. 研究の方法

### (1) 速攻型CRISPR/Cas9法の確立

従来のgRNAとCas9 mRNAをゼブラフィッシュ受精卵に注入する方法に対して、crRNA, tracrRNAおよびCas9タンパク質を注入する速攻型CRISPR/Cas9法が機能するかを調べる。特に、標的ゲノム部位における継時的なゲノム変異の性状やゲノム編集の効率を調べる。

この速攻型CRISPR/Cas9法を用いて、組織特異的な発現を示す未解析の遺伝子座に対してゲノム編集を行い、未解析の標的遺伝子に対する機能欠損変異体の表現型解析を行う。

速攻型CRISPR/Cas9法でゲノム編集を行ったゼブラフィッシュ胚を用いゲノム編集効率をヘテロ二本鎖移動度解析で評価する新しい生物学実験を樹立する。

### (2) 非同末端結合修復を利用したノックイン法の確立

速攻型CRISPR/Cas9法をレポーター遺伝子の標的ゲノム部位への挿入に応用する。レポーター遺伝子として、ヒートショック・タンパク質(hsp)のプロモーター領域の下流にeGFPを接続し、その両端にcrRNAの標的部位を付加した。レポーター遺伝子をcrRNA, tracrRNAとCas9タンパク質と一緒にゼブラフィッシュ受精卵に注入することで、F0胚において、標的遺伝子の

発現部位に eGFP の発現が認められるかで検討する。さらに、ゲノム編集胚からゲノム DNA を調整し、標的ゲノム部位に挿入されているかを確認する。

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) 速攻型 CRISPR/Cas9 法の確立

本研究では、化学合成した crRNA, tracrRNA および Cas9 タンパク質を用い、従来の gRNA と Cas9 mRNA を用いた手法とのゲノム編集における比較を行った。標的遺伝子としては、スフィンゴシン-1-リン酸輸送体である *spns2* 遺伝子とメラニン合成に關与する酵素 *tyrosinase* (*tyr*) を選んだ。これらの遺伝子の破壊は、二叉心臓および色素合成異常 (アルビノ) の表現型を示す。化学合成した *spns2*-crRNA, *tyr*-crRNA, tracrRNA と Cas9 タンパク質をゼブラフィッシュ受精卵に注入した場合、高い効率で二叉心臓とアルビノの表現型を誘導することが明らかとなった。ゲノム編集効率は、従来の *spns2*-sgRNA, *tyr*-sgRNA と Cas9 mRNA を用いた場合と同等であった。次に、胚前期と原腸胚期でゲノム DNA を調整し、ゲノム編集効率を検討した。その結果、*spns2*-crRNA, *tyr*-crRNA, tracrRNA と Cas9 タンパク質の複合体の方が従来法よりも早い胚前期の段階からゲノム変異が導入されていることが明らかとなった。

本研究で確立した速攻型 CRISPR/Cas9 法を用い組織特異的発現を示す未解析の遺伝子である *slurp-like1* と *cart-like* (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript*) の機能解析に応用した。*slurp-like1* 遺伝子は、哺乳類の *SLURP1* 遺伝子に相同性が認められた。*SLURP1* はヒト遺伝性皮膚疾患の原因遺伝子として最近報告され、皮膚の恒常性の維持に重要な分子と考えられているが形態形成における機能は不明である。一方、*cart-like* 遺伝子は、哺乳類の *CART* 遺伝子に相同性を示す新規の遺伝子と考えられた。*cart-like* の発現は、初期発生過程で三叉神経節と Rohon-Beard neuron に特異的に認められた。速攻型 CRISPR/Cas9 法により *slurp-like1* 変異体と *cart-like* 変異体の樹立に成功した。現在、初期発生における *slurp-like1* 変異体と *cart-like* 変異体の表現型解析を行っているが、顕著な発生異常は認められていない。

速攻型 CRISPR/Cas9 法でゲノム編集を行ったゼブラフィッシュ胚を用いてゲノム編集効率を計測する生物学実験を確立した。我々は、これまでにゲノム編集活性を評価する簡便な解析法として、挿入・欠失変異を 12.5% アクリルアミドゲル電気泳動で分離・検出するヘテロ二本鎖移動度分析 (*heteroduplex mobility assay*: HMA) を開発している。図 1 に示すように、ゲノム編集効率やゲノム編集により誘導された変異の性状を考察できる医学科における生物学実験を樹立した。

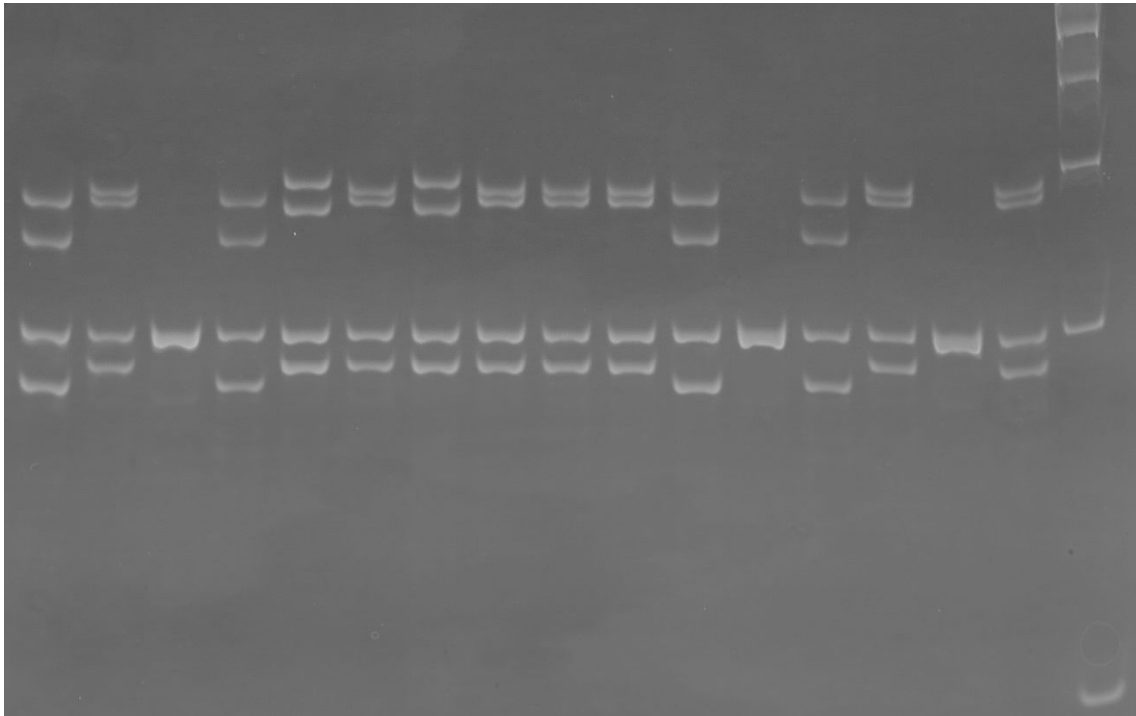


図1 医学科の生物学実習で解析したヘテロ二本鎖移動度分析の結果

ゲノム編集を行った F0 ファウンダーを野生型系統と交配し、16 個体の初期胚からゲノム DNA を調整した。標的ゲノム部位に対する野生型のバンドは 100 塩基対付近(左に分子量マーカーがあり下から 50 塩基対、100 塩基対、150 塩基対である)にバンドが見られる。この F0 ファウンダーは様々な欠失変異を産生すると考えられた。

## (2) 非相同末端結合修復を利用したノックイン法の確立

速攻型 CRISPR/Cas9 法をレポーター遺伝子の標的ゲノム部位へのノックインに応用した。レポーター遺伝子として、crRNA に対する標的部位を付加し、その下流に hsp プロモーター領域と eGFP 遺伝子を接続した。標的遺伝子として未解析遺伝子である *epdr1* (*ependymin related 1*) を選んだ。速攻型 CRISPR/Cas9 法でレポーター遺伝子をゼブラフィッシュ受精卵に注入し、図 2 に示すような Tg[*epdr1*-hs:eGFP] 系統の樹立に成功した。*epdr1* アンチセンス・プローブを用いた whole-mount *in situ* hybridization (WISH) 解析により *epdr1* は、終脳、眼莖、中脳後脳境界部、後脳および脊髄神経に発現していることが明らかとなった。Tg[*epdr1*-hs:eGFP] 系統における eGFP の発現を蛍光実体顕微鏡で解析した結果、WISH 解析と同じ領域で eGFP が発現していることが観察された。*epdr1* 遺伝子座の両アレルにレポーター遺伝子が挿入された胚では、中脳後脳境界部における eGFP 陽性細胞の数が減弱しており、*epdr1* 遺伝子が中脳後脳境界部の発生に関与している可能性が示唆された。

本研究で確立したゲノム編集技術が、未解析遺伝子の機能解析やゲノム編集により誘導された変異の効率や性状を調べる生物学実験に有用であることが示された。

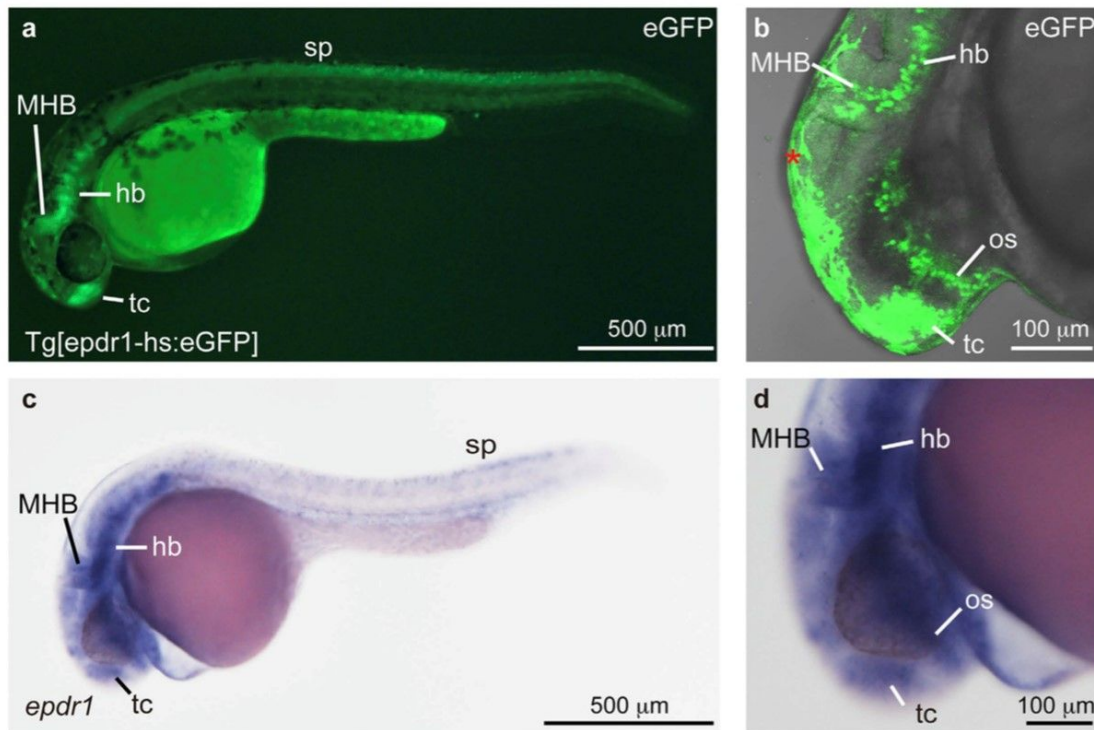


図2 *epdr1* 遺伝子座にレポーター遺伝子を挿入した系統の機能解析

(a, b) Tg[*epdr1*-hs:eGFP]系統の樹立。終脳 (tc), 眼茎 (os), 中脳後脳境界部 (MHC), 後脳 (hb), 脊髄神経 (sp) に eGFP の発現が認められた。(c, d) 終脳 (tc), 眼茎 (os), 中脳後脳境界部 (MHC), 後脳 (hb), 脊髄神経 (sp) に *epdr1* mRNA の発現が認められた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Kawahara A, Morita H, Yanagi K, Ishizuka T, Taimatsu K, Ohga R Developmental expression of the slurp-like1/ly2.3/ly97.3 and slurp-like2/ly2.2/ly97.2 genes during zebrafish early embryogenesis *Gene Expression Patterns*, 査読有, 30, 32-36 (2018), doi: 10.1016/j.gep.2018.08.006.
2. Kawahara A, Morita H, Yanagi K, Suzuki H, Mori T, Ohga R, Taimatsu K Spatiotemporal expression of the cocaine- and amphetamine-regulated transcript-like (cart-like) gene during zebrafish embryogenesis *Gene Expression Patterns*, 査読有, 30, 1-6 (2018), doi: 10.1016/j.gep.2018.08.002.
3. Ota S, Taimatsu K, Yanagi K, Namiki T, Ohga R, Higasijima S, Kawahara A Functional visualization and disruption of targeted genes using CRISPR/Cas9-mediated eGFP reporter integration in zebrafish *Scientific Reports*, 査読有, 6, 34991 (2016), doi: 10.1038/srep34991

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 柳かのこ, 並木智宏, 王賀理恵, 泰松清人, 川原敦雄 Functional disruption of uncharacterized small protein genes using the CRISPR/Cas9 第 22 回小型魚類研究会 2016 年 8 月 20 日 愛知県岡崎市 岡崎カンファレンスセンター

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/lifescience/kouza/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。