

令和元年6月13日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07085

研究課題名(和文) 超高効率ノックインシステムの開発

研究課題名(英文) Ultra efficient knockin system

研究代表者

相田 知海 (AIDA, Tomomi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50540481

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)：ゲノム編集による長鎖DNAノックインは基礎研究から遺伝子治療までの広い分野に革新をもたらす基盤技術である。しかしながらその効率は極めて低く、特にマウス等の生物個体では依然困難であり、その改善はゲノム編集における主戦場となっていた。本プロジェクトでは様々な独自技術を開発することにより、長鎖DNAを極めて簡単、かつ100%に迫る超高効率でマウスにノックインすることを実現した。これらは世界中で用いられる標準技術となっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集技術を用いて、あらゆる遺伝子配列を極めて高効率に動物個体に正確に導入可能にした。これらはヒト疾患に忠実な動物モデルの確立、高効率で精度の高い遺伝子治療法などの基盤として世界中で用いられている。

研究成果の概要(英文)：Precise and highly efficient integration of the exogenous gene into the target genomic locus (knockin) in vivo is the main challenge in the genome editing field. We have developed a series of new CRISPR technologies that enable highly efficient (up to 100%) knockin in mouse embryos.

研究分野：ゲノム編集

キーワード：CRISPR ノックイン マウス

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

1. 研究開始当初の背景

長い遺伝子カセットを正確に自在に簡単にゲノムにノックインする技術は、例えば蛍光タンパク質等のノックインのように、基礎研究から遺伝子治療までの広い分野に革新をもたらす基盤となる。これは CRISPR の登場により培養細胞では現実となった。一方で、マウス等の生物個体では依然困難であり、その改善はゲノム編集における主戦場となっている (Skarnes, *Genome Biol* 2015)。CRISPR を用いた長い遺伝子カセットのノックインマウス作製は 2013 年に初めて報告されたが、その頻度は 10% 程度であり、その後 2 年近く追試が報告されていない。この停滞は、最近の我々の高効率クローニングフリー CRISPR 発表を気に打ち破られた。世界中のグループが応募者の方法を参考に改良型 CRISPR を用いてノックインマウス作製に取り組んでいる。ノックイン効率を向上させる別の試みが、細胞内の DNA 損傷修復機構を対象とした研究である。頻度の低い相同組換えを誘導する化合物がマウスでのノックイン効率を高める事が報告されている。これらの報告はごく短い配列のノックインに留まる。一方、低頻度の相同組換えでなく、高頻度の MMEJ や非同相末端結合 (NHEJ) を用いたノックイン手法開発も進められている (Nakade et al. *Nat Commun* 2014; Ran et al. *Cell* 2013)。これらの報告も培養細胞や短い配列に留まり、マウスでの遺伝子カセットノックインへの適用は未知である。CRISPR によるゲノム編集は生命科学に広く革命を巻き起しているが、生物個体への高効率なノックインの実現はその最重要課題であり、上記のように様々な試みが進められている。ノックインの為に 2 要素：標的配列の高効率かつ迅速な切断、およびノックインを促進する細胞内の DNA 損傷修復機構操作、を組み合わせ、今後技術革新が進むと考えられる。

2. 研究の目的

長い遺伝子カセットを正確に自在に簡単にゲノムにノックインする技術は、基礎研究から遺伝子治療までの広い分野に革新をもたらす基盤となる。これは CRISPR の登場により培養細胞では現実となったが、マウス等の生物個体では依然困難であり、その改善はゲノム編集における主戦場となっている。最近、我々は独自開発の改良型 CRISPR を用いてマウス受精卵での長い遺伝子カセットのノックイン効率を 50% まで高める事に成功した。本研究ではこの技術を基盤に、受精卵内 DNA 損傷修復、ノックイン機構の操作及び修復ドナーの最適化に取り組む。これにより長い遺伝子カセットを「極めて簡単」かつ「100% に迫る超高効率」でマウス受精卵にノックインする技術開発を目標とする。

3. 研究の方法

本研究ではクローニングフリー CRISPR を基盤に、受精卵内 DNA 損傷修復、ノックイン機構の操作及び修復ドナーの最適化のマウス受精卵での実現を目的とする。初年度は、これらを各々促進する因子 (同定済み) を用いて、各々について独立して、マウス受精卵での遺伝子カセットノックイン促進効果を集中的に検証していく。

4. 研究成果

(1) CRISPR を用いた長い遺伝子カセットのノックインは、特にマウス等の生物個体では依然困難である。ノックインには通常、相同組換え機構が用いられるが、その頻度は一般に極めて低い。平成 28 年度は、マウス受精卵での DNA 修復機構のおよそ半数を占めるマイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) を応用したノックイン方法を開発した。この高頻度の MMEJ に基づくノックインシステム・PITCh は、受精卵内で CRISPR によりドナー DNA を切断して損傷修復反応を誘導すると共に、遺伝子カセット両末端にゲノム DNA に相同な 40 塩基マイクロホモロジーを付加して正確なノックインを促進する。現在困難とされる 5000 塩基の遺伝子のノックインをモデルとして、PITCh によるノックインマウス作製を行ったところ、およそ 10% の効率でノックインマウスを得ることに成功した。しかしながらその効率は、世界的な平均値に比べて相当高いものの、我々の従来法に比べると 1/3 程度であった。そこで培養細胞系でのスクリーニング系を構築・探索し、多くの MMEJ エンハンサーを同定、MMEJ の分子機構の全貌を明らかにした。これらの MMEJ エンハンサーのうち、Exo1 に着目してその後の実験を行なった。Exo1 の過剰発現により、ヒト培養細胞でのノックイン効率は中程度に高まった。次に Exo1 を加えて、上記の 5000 塩基の遺伝子のノックインマウス作製を行ったところ、そのノックイン効率を、30% を越えるまでに高めることに成功した。さらにこの手法を用いて、現在最も困難とされる flox マウスの作製を行ったところ、同様に 30% を越えるノックイン効率で flox マウスを得ることに成功した。以上から、Exo1 で増強した MMEJ に基づく PITCh 法により、ヒト細胞及びマウス受精卵で高効率なノックインが実現された。本研究成果は論文発表した。

(2) Cre-loxP システムを用いたコンディショナルノックアウトマウスは、現代生物学に欠かすことのできない重要なツールである。このシステムには、Cre リコンビナーゼを発現するマウス (ノックインマウス) と、標的遺伝子が二つの loxP 配列で挟まれている flox ノックインマウスの二つの遺伝子改変マウスが必要である。CRISPR の登場により単純なノックアウトマウスの作製は、従来の ES 細胞を用いることなく、受精卵の直接改変により、極めて容易に迅速に実現可能になった。一方で、CRISPR を用いた Cre リコンビナーゼや flox ノックインマウスの受精卵直接改変による作製は、その基盤となる相同組換えの効率が極めて低いため、依然困難で

ある。平成 29 年度は、Cre リコンビナーゼや flox 遺伝子を標的ゲノムに導入するために従来用いられて来た二本鎖 DNA ドナーに代わり長鎖一本鎖 DNA ドナーを開発した。さらに長鎖一本鎖 DNA ドナーと、我々がこれまでに開発してきた高効率 CRISPR システム・クローニングフリー CRISPR を組み合わせる事で、マウス受精卵において極めて高いノックイン効率を実現可能であることを示した。様々な Cre リコンビナーゼノックインマウス及び flox ノックインマウスを最大 100%の極めて高い効率で作出する事に成功した。合計 13 遺伝子において、Cre リコンビナーゼノックインマウス及び flox ノックインマウスを作出し、この手法が極めて頑強であることを示した。そのノックイン効率は、ほとんどの遺伝子座で数十%のレンジであり、3 遺伝子においては最大 100%に達した。本手法は極めて簡便で、ノックイン効率は極めて高く、様々な遺伝子で同様の効果を発揮し、最短 1 ヶ月で完了する事から、今後の遺伝子改変マウス作製の標準手法となることが期待される。この本研究成果は論文発表した。

(3) 本研究プロジェクトではこれまでに外来遺伝子ノックインマウス、コンディショナルノックアウトマウスの高効率な作出手法を相次いで開発してきた。医学生物学分野で残る重要な遺伝子改変マウスは、ヒト疾患変異を時期・臓器・細胞種特異に発現誘導または抑制可能なコンディショナルノックインマウスである。いくつかのコンディショナルノックイン戦略が考案されてきたものの、スプライシング異常と nonsense-mediated decay による遺伝子ノックアウトが誘導されてしまう事、あるいは遺伝子発現の不完全制御による発現量減少等の根本的な問題を抱えていた。最終年度はこれらの問題を克服するコンディショナルノックイン戦略と、これを実装したコンディショナルノックインマウス作製のための強力なノックイン手法を開発した。新たなコンディショナルノックイン戦略は発現誘導後もそれ以前と同等の遺伝子発現レベルを実現するが、そのために 5-10kb 程度の複雑な長鎖 DNA のノックインを必要とする。CRISPR による受精卵直接改変でこのような長鎖 DNA ノックインを作出することは極めて困難である。本研究では遺伝子スクリーニングから得られたノックインエンハンサーを用いることにより、これを極めて高効率に実現した。さらに 3 系統のヒト疾患コンディショナルノックインマウスを作出し、in vivo で任意の時期に任意の臓器・細胞種でヒト疾患変異を正常な遺伝子発現レベルで誘導可能であることを明らかにした。この新たなコンディショナルノックイン戦略と強力なノックイン手法は、ヒト疾患の忠実なモデルマウスの作出とその分子細胞基盤の解明のための強力なツールとなる。本研究成果は現在論文投稿中である。なお本研究により同定されたノックインエンハンサーを用いることで、我々は 2017 年の Nature 誌で生命科学分野に一大論争を巻き起こした受精卵における inter-homolog repair の存在について、最終的な結論を得ることに成功し、当該分野の発展に大きく貢献した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

Nakade S, Mochida K, Kunii A, Nakamae K, [Aida T](#), Tanaka K, Sakamoto N, Sakuma T, Yamamoto T, Biased genome editing using the local accumulation of DSB repair molecules system, Nat Commun, 査読有, 2018, 9, 3270

DOI: 10.1038/s41467-018-05773-6

Miyasaka Y, Uno Y, Yoshimi K, Kunihiro Y, Yoshimura T, Tanaka T, Ishikubo H, Hiraoka Y, Takemoto N, Tanaka T, Ooguchi Y, Skehel P, [Aida T](#), Takeda J, Mashimo T, CLICK: one-step generation of conditional knockout mice. BMC Genomics, 査読有, 2018, 19, 318

DOI: 10.1186/s12864-018-4713-y

Quadros RM, Miura H, Harms DW, Akatsuka H, Sato T, [Aida T](#), Redder R, Richardson GP, Inagaki Y, Sakai D, Buckley SM, Seshacharyulu P, Batra SK, Behlke MA, Zeiner SA, Jacobi AM, Izu Y, Thoreson WB, Urness LD, Mansour SL, Ohtsuka M, Gurumurthy CB, Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins, Genome Biol, 査読有, 18, 2017, 92.

DOI: 10.1186/s13059-017-1220-4

Kasagi Y, Takahashi D, [Aida T](#), Nishida H, Nomura N, Zeniya M, Mori T, Sasaki E, Ando F, Rai T, Uchida S, Sohara E, Impaired degradation of medullary WNK4 in the kidneys of KLHL2 knockout mice. Biochem Biophys Res Commun, 査読有, 487, 2017, 368-374

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.068

Mizuno Y, Shimada S, Akiyama Y, Watanabe S, [Aida T](#), Ogawa K, Ono H, Mitsunori Y, Ban D, Kudo A, Arii S, Yamaoka S, Tanabe M, Tanaka S. DEPDC5 deficiency contributes to resistance to leucine starvation via p62 accumulation in hepatocellular carcinoma, Sci Rep, 査読有, 8, 2018, 106

DOI: 10.1038/s41598-017-18323-9

[Aida T](#), Nakade S, Sakuma T, Izu Y, Oishi A, Mochida K, Ishikubo H, Usami T, Aizawa H, Yamamoto T, Tanaka K, Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ, BMC Genomics, 査読有, 17, 2016, 979.

〔学会発表〕(計7件)

Jonathan J. Wilde, Tomomi Aida, Martin Wienisch, Qiangge Zhang, Peimin Qi, Guoping Feng, Efficient zygotic genome editing via RAD51-enhanced interhomolog repair, Cold Spring Harbor Laboratory meeting GENOME ENGINEERING: THE CRISPR-CAS REVOLUTION, 2018

Shota Nakade, keiji Mochida, Kazuki Nakamae, Tomomi Aida, Kohichi Tanaka, Naoaki Sakamoto, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Biased genome editing using the LoAD (local accumulation of DSB repair molecules) system, Cold Spring Harbor Laboratory meeting GENOME ENGINEERING: THE CRISPR-CAS REVOLUTION, 2018

相田知海, Molecular machinery of zygotic knockin, 日本ゲノム編集学会, 2018

Tomomi Aida, Making knock-in mice easy with Cloning-free CRISPR, South China Agriculture University Symposium, 2017

Tomomi Aida, Making knock-in mice easy with Cloning-free CRISPR, Innovation Mouse Models 2017, 2017

Tomomi Aida, Making knock-in mice easy with Cloning-free CRISPR, 日本ゲノム編集学会 Satellite Symposium, 2017

相田知海, Opportunities and challenges in animal model innovation in CRISPR-era, 日本神経化学会, 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 遺伝子ノックイン細胞の作製方法

発明者: 相田知海、田中光一

権利者: 国立大学法人東京医科歯科大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/027838

出願年: 2016

国内外の別: 国内、国際

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/aud/index.html>

6. 研究組織

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。