

令和 2 年 11 月 30 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20929

研究課題名(和文) 特定の細胞周期で機能するCas9による多重遺伝子ノックインマウス作製

研究課題名(英文) Production of multiple-gene knock-in mice by Cas9 with cell-cycle specific function

研究代表者

水野 沙織(飯島沙織)(Mizuno-Iijima, Saori)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：80732106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：目的配列を標的遺伝子座に挿入したノックインマウスは、生命科学研究で広く使われている。特に、多重遺伝子ノックインマウスは、高い需要がある。本研究では、CRISPR/Cas9システムを用いて、ノックイン効率を上昇させることで、より効率的な多重遺伝子ノックインマウス作製方法を確立することを目指した。細胞周期とノックイン変異が生じる時のDNA修復経路の関係性に着目し、特定の細胞周期のみで機能する改良型Cas9タンパク質を構築した。この改良型Cas9タンパク質を用いて、単一遺伝子を標的としたノックイン系を構築し、マウス受精卵に導入したところ、ノックインマウス作出効率が上昇するという良好な結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内で遺伝子機能を解析可能な遺伝子改変マウスは、生命科学研究にとって重要なツールである。その中でも、目的の配列を標的遺伝子座に挿入したノックインマウスは様々な研究分野で広く使われており、特に、分子間・細胞間の相互作用の解析や、より高次元のヒト化マウス作製などが可能となる、複数遺伝子をターゲットとしたノックインマウスの作製は高い需要がある。本研究では、特定の細胞周期のみで機能する改良型CRISPR/Cas9システムを用いて、ノックイン効率を上昇させることを目指した。本成果を用いることで、多重遺伝子ノックインマウスのより効率的な作製方法が確立されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Knock-in mice carrying mutations into target gene-locus are invaluable tools for functional characterization in vivo. In particular, multiple-gene knock-in mice are much in demand for life-scientists. To answer these needs, we aimed to establish more effective production methods for these mice. We adopted CRISPR/Cas9 genome-editing technology which allow simply and speedy production. However, knock-in efficiency mediated by this technology is tend to be low. Therefore, we focused on the relationship between cell-cycle and DNA-repair pathway which occurs during knock-in mutation. We developed an improved Cas9 protein which functions in specific cell-cycle and injected it into mouse zygotes to produce simple knock-in mice. Predictably, at some experiments, improved Cas9 allowed for more effective knock-in mice production compared with wild-type Cas9. In the next step, we try to produce multiple-gene knock-in mice.

研究分野：実験動物学、発生工学

キーワード：CRISPR/Cas9 ノックイン

1. 研究開始当初の背景

生体内で遺伝子機能を解析可能な遺伝子改変マウスは、生命科学研究にとって重要なツールである。その中でも、目的の配列を標的遺伝子座に挿入したノックインマウスは様々な研究分野で広く使われている。例えば、蛍光遺伝子を目的の遺伝子座にノックインしたレポーターマウスは、遺伝子発現パターンが可視化できる。また、ヒトの疾患関連遺伝子をマウスのホモログ遺伝子座にノックインした遺伝的ヒト化マウスは、優れたヒト病態モデル動物として医薬品開発などの臨床応用に近い分野で活用されている。このように、ノックインマウスの利用価値はノックアウトマウスをはるかに凌ぐ。特に、複数の遺伝子座をターゲットとした多重遺伝子ノックインマウスは、分子間・細胞間の相互作用の解析や、より高次元のヒト化マウス作製などが可能となるため、高い需要がある。

昨今、開発されたゲノム編集法の1つであるCRISPR/Cas9システムは、特定の配列を認識するguide RNAと二本鎖DNAを切断するCas9タンパク質を用いた方法であり、ノックアウトマウス作製に抜群の効果がある(図1)。研究代表者が所属する筑波大学生命科学動物資源センターにおいても、目的の遺伝子をターゲットとしたCRISPR/Cas9システムを受精卵に導入するだけで、80%以上と高効率でノックアウトマウスを作製することに成功した。このCRISPR/Cas9システムによる受精卵ゲノム編集では、ノックアウトマウスだけでなくノックインマウスの作製も可能であることが報告されている(1)。しかし、CRISPR/Cas9システムを用いたノックインマウスの作製効率はノックアウトマウスの作製効率よりも0~15%程度と低い傾向にあり、安定的で高効率にノックインを誘導する方法は未だ確立されていない。

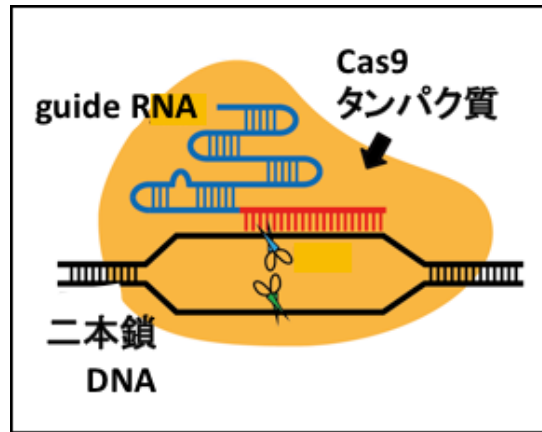


図1: CRISPR/Cas9 システム

参考文献

(1) H Yang, et. al., One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. Cell. 2013. Vol. 154 (6), p. 1370-1379.

2. 研究の目的

本研究では特定の細胞周期のみで機能するCRISPR/Cas9システムを用いて、ノックイン効率を上昇させることにより、より効率的に多重遺伝子ノックインマウスを作製するための方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9システムでは、guide RNA・Cas9タンパク質の導入により、切断されたゲノムDNAが、非相同末端再結合(Non Homologous End Joining、以下 NHEJ)経路で修復されると、数塩基対の予測不能な欠損・挿入変異が起き、ノックアウトアレルが生じる。一方、ノックインアレルはguide RNA・Cas9タンパク質と共導入したドナーDNAを介した相同組換え修復(Homolog Directed Repair、以下 HDR)により、生じる(図2)。すでに、この2つのDNA修復経路(NHEJとHDR)は、細胞周期の異なるステージで起きることが報告されており(2, 3)、本研究では、ノックインアレルが生じる時に

働く HDR 経路に着目し、HDR 優位の細胞周期のみで機能する改良型 Cas9 タンパク質を構築し、マウス ES 細胞およびマウス受精卵を用いてノックイン効率への有用性を調べた。

参考文献

- (2) WD Heyer, et. al., Regulation of homologous recombination in eukaryotes. Annu Rev Genet. 2010. Vol. 44, p. 113-139.
- (3) VT Chu, et. al., Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. Nat Biotech. 2015. Vol. 33, p. 543-548.

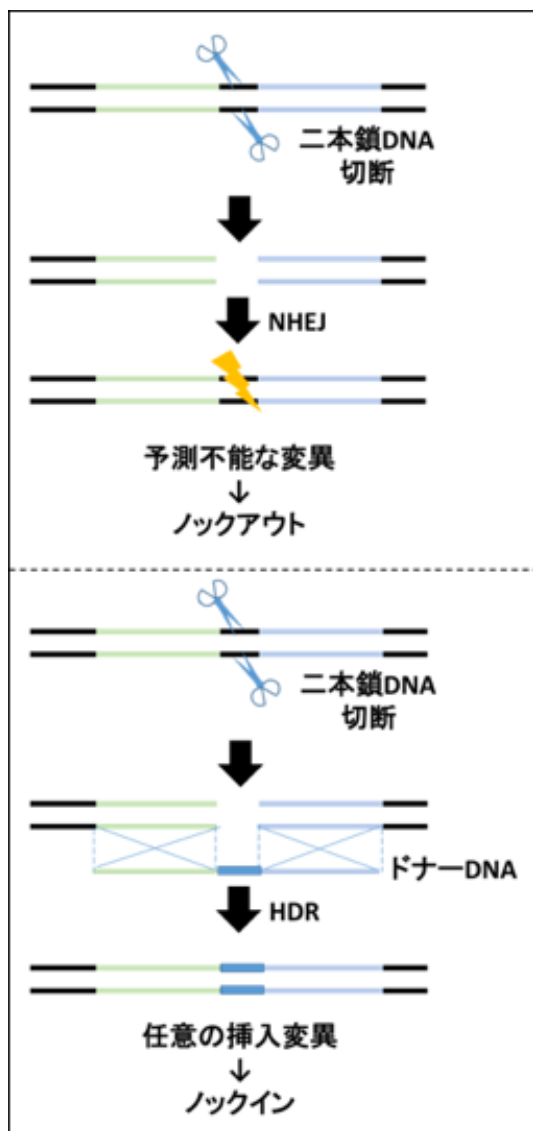


図 2: CRISPR/Cas9 システムにより切断されたゲノム DNA の修復経路

4. 研究成果

HDR が起こる特定の細胞周期のみで機能する改良型 Cas9 タンパク質を構築し、この改良型 Cas9 タンパク質のノックイン効率への有効性を調べるため、単一遺伝子を標的としたノックイン系を構築した。ノックインマウスの作製方法には、ES 細胞を用いた方法と受精卵を用いた方法の 2 パターンがある (図 3)。

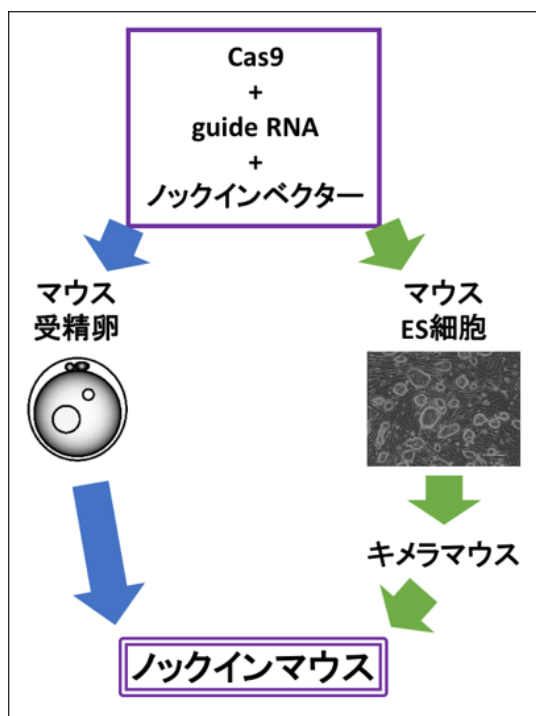


図 3: マウス受精卵及びマウス ES 細胞を用いたノックインマウスの作製

ES 細胞を用いた遺伝子ターゲティングによるノックインマウス作製は、ゲノム編集法開発以前から行われていたが、偶発的な相同組換えによるため、ノックイン効率が低い傾向にあった。そこで、野生型 Cas9 タンパク質または改良型 Cas9 タンパク質を guide RNA・薬剤耐性遺伝子を含むドナーDNA と共にエレクトロポレーション法により、マウス ES 細胞に導入し、薬剤選別後、PCR 解析により、ノックインアレルの有無を判定した。その結果、従来の遺伝子ターゲティング法と比較すると、CRISPR/Cas9 システムを用いることでノックイン効率の上昇が見られたが、野生型 Cas9 タンパク質と改良型 Cas9 タンパク質を用いた

場合とで、結果に差はなく、現在までに、改良型 Cas9 タンパク質の効果を確かめることができなかつた。

一方、野生型 Cas9 タンパク質または改良型 Cas9 タンパク質を guide RNA・ドナーDNA と共に、マウス前核期胚にマイクロインジェクション法によって導入し、移植した。その結果、誕生したマウスの出生率は大差がなかつたものの、ノックインマウスの作出効率が、野生型 Cas9 タンパク質を用いた場合と比較して、改良型 Cas9 タンパク質を用いた場合では、2-4 倍向上した。

誕生したノックインマウスを用いたゲノムを解析したところ、Cas9 タンパク質の挿入頻度及びドナーDNA のランダム挿入の頻度は、野生型 Cas9 タンパク質を用いた場合と改良型 Cas9 タンパク質を用いた場合とで、差はなかつた。さらに、マウス受精卵で生じたノックイン変異は個体作出後も維持され、次世代へと伝播可能であつた。

複数の遺伝子座に対して、同様に改良型 Cas9 タンパク質の効果を調べたが、実験を行なつたほとんどの遺伝子座でノックイン効率の上昇を確認することができた。中には、改良型 Cas9 タンパク質を用いた場合のみ、ノックインマウスが誕生したケースもあつた。

そこで今後は、受精卵を用いた方法において、同時に複数遺伝子をターゲットとしたノックインマウス作製を試みる予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 沙織 (MIZUNO, Saori)
筑波大学・医学医療系・研究員
研究者番号 : 80732106

(2) 研究協力者

杉山 文博 (SUGIYAMA, Fumihiro)
筑波大学・医学医療系・教授

大徳 陽子 (DAITOKU, Yoko)
筑波大学・医学医療系・技術員

星野 貴一 (HOSHINO, Yoshikazu)
筑波大学・人間総合科学研究科・大学院生