

令和元年6月19日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14973

研究課題名(和文) タンデムCas9を用いたDNAの輸送による新たな遺伝子改変マウス作製技術の開発

研究課題名(英文) Targeted integration with tandemly linked Cas9 molecules

研究代表者

古戎 道典 (Koebis, Michinori)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：20734627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集技術は研究上有用なモデル動物を作製するなど生命科学において欠かせないツールとなっているが、ゲノム上の特定領域にDNAを挿入するノックイン操作効率は高くなく、技術の応用にも限界がある。本研究では、ゲノム編集ツールとして広く用いられているCas9タンパク質を改変することによりノックイン効率の向上を試み、技術開発を行う上で重要な基礎的知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高効率に正確な遺伝子改変を行うことができるゲノム編集技術は、生命科学研究において有用な動物モデルを作製する上で必須であるだけでなく、遺伝子改変生物の安全な産業応用を実現する上でも重要である。本研究は、生物のゲノム上に遺伝子断片を効率的に挿入するための技術開発を目指したものであり、得られた基礎的知見は、今後の技術開発に資するものである。

研究成果の概要(英文)：Genome editing is now essential for biological sciences to generate useful animal models. However, the efficiency of targeted integration into a specific genomic locus is still low, limiting application of the technique. In the present study, I attempted to increase the efficiency of targeted genomic integration by modifying Cas9 protein that is widely used as a genome editing tool and obtained basic information that is important for further development of the editing tool.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム編集 CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

CRISPR/Cas9 や TALEN などのゲノム編集ツールの登場によって、動物胚の遺伝子操作、特に遺伝子欠損動物の作製は飛躍的に容易になった。しかし、数 kb をこえるような大きな DNA 断片のゲノム DNA へのノックインは、いまだに困難である。内在性遺伝子の大規模な改変や、条件的な遺伝子発現を可能にするノックインは、遺伝子の機能を明らかにしたり、疾患の発症機序を明らかにしたりするための生命科学研究に欠かすことのできない技術である。特に近年は、霊長類モデルなど、胚操作がむずかしい動物でも遺伝子操作を行おうとする機運が高まっており、ノックインの効率化が強く求められている。

私が所属する研究室ではこれまで、学内の研究者向けの遺伝子操作マウス作製サービスを提供する一方で、効率的な遺伝子操作のための技術開発を進めてきた (Nakao et al, Exp. Anim., 2010; Nakao et al., Genesis, 2016)。その過程で、アクチン重合阻害により不要な DNA 修復を抑制することで、ノックインを効率化できることを見出した。二本鎖 DNA 切断の大部分は、非相同末端結合 (NHEJ) によってすばやく修復される。このことから、CRISPR/Cas9 によりゲノム DNA を切断しても、すみやかに修復されてしまい、ノックインが阻害されると考えられる。すなわち、ノックインを効率化するためには、ゲノム DNA が修復される前に外来 DNA をリクルートする手法の開発が必要である。

Cas9 はエンドヌクレアーゼとしては特殊な性質をもち、基質 DNA を切断した後も数時間結合しつづける。そこで、2つの Cas9 タンパク質を融合させれば、2つの DNA を切断したまま近づけておくことができるのではないかと考えた。すでに予備実験において、2つの Cas9 を融合すると、組換えが促進されるという結果を得ている。本研究では、タンデム Cas9 のように複数の Cas9 をつなげた「連結型 Cas9」を用いて、マウス胚におけるノックイン効率の向上を目指す。これにより、さまざまなモデル動物での遺伝子改変効率の改善に寄与する技術を開発する。

2. 研究の目的

生命科学研究に有用な遺伝子改変動物を作製するためには、効率的な外来 DNA のノックイン法は欠かすことのできない技術だが、現在のところノックイン動物の作製効率は非常に低い。私は、これまでの遺伝子改変マウスの作製経験にもとづいて、ノックインの効率化のためには、ゲノム編集ツールで切断を行おうとする標的遺伝子座の近傍までドナーとなる外来 DNA を輸送することが必要だと考えた。その上で、2つの Cas9 を連結した「タンデム Cas9」が DNA 間の組換えを促進するのではないかと着想するに至った。本研究では、タンデム Cas9 をノックインマウスの作製に応用し、効率化を目指す。

3. 研究の方法

複数の Cas9 を連結させることにより、マウス受精卵でのノックインが効率化できるかどうかを検証する。そのために、次の2つの実験を行う。

(1) 培養細胞系による連結型 Cas9 の最適化

培養細胞を用いてノックインレポーター系を構築する。これを用いて「連結型 Cas9」のノックイン効率を検証するとともに、連結型 Cas9 のデザインを最適化する。

(2) マウス胚を用いたノックイン効率の検証

最適化したノックインシステムを用いて、マウス受精卵へのノックインを行う。複数の標的遺伝子座や、より長い外来 DNA のノックインを検討し、開発した手法の汎用性を検証する。

4. 研究成果

予備的検討では、プロモーターのみをもつドナープラスミドと、ルシフェラーゼコード領域のみをもつアクセプタープラスミドの2つを用いて、両者の間の遺伝子組換えをルシフェラーゼ活性により測定できる系を構築した。この系では、ドナープラスミドとアクセプタープラスミドがそれぞれ由来の異なる Cas9 (SpCas9, SaCas9) で切断できるように Cas9 の認識配列を挿入しており、さらに、切断点の近傍にドナープラスミドとアクセプタープラスミドに共通の相同配列を挿入することにより、切断にともなって両者の間での相同組換えが起こることを期待している。

このドナープラスミドとアクセプタープラスミド、および Cas9 発現プラスミドを HEK293FT 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、SpCas9 および SaCas9 を別々に発現させた場合よりも、両者を融合させた「タンデム Cas9」を発現させた場合

の方が、より高いルシフェラーゼ活性が観察され、タンデム Cas9 による DNA 組換え効率の向上が示唆される結果を得た（図 1）。

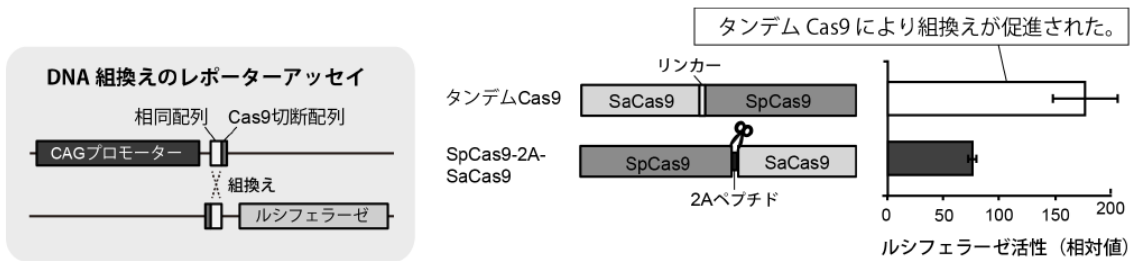


図 1. ルシフェラーゼを利用したプラスミド間相同組換え検出系

そこで、次に、ゲノム上への遺伝子断片の挿入に対するタンデム Cas9 の効果をモニタリングすることを考えた。ヒト AAVS1 (PPP1R12) 遺伝子座へ 2A-EGFP 遺伝子断片を挿入するためのドナープラスミドを構築し、HEK293FT 細胞を用いてノックインに対するタンデム Cas9 の効果を検証した。その結果、この系においてはタンデム Cas9 が AAVS1 遺伝子座への外来 DNA のノックインを有意に促進するという結果は得られなかった。

2 つの Cas9 タンパク質を連結したことによりタンデム Cas9 は 200 kDa を超える巨大タンパク質となる。そのために、タンデム Cas9 のタンパク質発現の効率が低いのではないかとこの点は研究計画の当初より懸念されていた。実際に、HEK293FT 細胞に発現プラスミドをトランスフェクションした場合のタンデム Cas9 の発現量は、それぞれの Cas9 を単独で発現させた場合よりも極めて少なく、結果としてノックイン促進効果が十分に得られないことにつながっていると考えられた。コドンの最適化等により発現量の向上を試みたが、十分な発現量は得られなかった。

そこで、バクテリオファージ MS2 由来のコートタンパク質と、それに結合する RNA ループを利用して、共有結合によらない Cas9 タンパク質の連結も検討した(マルチ Cas9)。この系では、一方の Cas9 の sgRNA に RNA ループを挿入し、他方の Cas9 に MS コートタンパク質を融合させる。ひとつの RNA ループに対して複数の MS コートタンパク質分子が結合するため、この設計により、RNA ループをもつ Cas9・sgRNA 複合体 1 分子に対して複数の MS2-Cas9 タンパク質が結合することができる。RNA ループをもつ Cas9・sgRNA 複合体のターゲットをゲノム上の遺伝子座に、MS2-Cas9 タンパク質のターゲットを挿入するドナー遺伝子とすれば、ターゲット遺伝子座周辺に複数個このドナー遺伝子をリクルートすることができると期待される。この系においては、それぞれの Cas9 を別々に発現させることができるため、タンデム Cas9 において見られたような低発現量の問題は回避することができたが、培養細胞を用いた系においてノックイン効率を向上させるには至らなかった。

培養細胞と受精卵および初期胚では相同組換えの活性が異なることが示唆されていることから、マルチ Cas9 を用いてマウス受精卵の Rosa26 遺伝子座へのノックインを試みた。その結果、マウス受精卵においても連結型の Cas9 システムによる有意なノックイン効率の向上効果は見られなかった。

結果として、本研究課題期間中には当初目標としていた新規のノックインシステムの開発には至らなかった。しかしながら、タンパク質発現コンストラクトの発現量の改善や、遺伝子ノックインをモニタリングするアッセイシステムの構築において多大なノウハウの蓄積があり、これらは今後の遺伝子改変技術開発において非常に有用な知見であると考えている。

また、本研究で利用した、Cas9 によるマウス受精卵の遺伝子改変システムを構築するにあたり、Lamp5 遺伝子座をターゲットとする sgRNA を用いて、Cas9 の切断が十分に行われるかなどの検討を行った。この検討により、副産物として Lamp5 KO マウスが得られたため、表現型を解析し、驚愕反射における LAMP5 タンパク質の寄与を明らかにするに至った (Koebis et al., Molecular Brain, 2019)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

- 1) Michinori Koebis, Shinji Urata, Yo Shinoda, Shigeo Okabe, Tatsuya Yamasoba, Kazuki Nakao, Atsu Aiba and Teiichi Furuichi. LAMP5 in presynaptic inhibitory terminals in the hindbrain and spinal cord: a role in startle response and auditory processing. Molecular Brain, 査読あり, vol.12, 2019.
<https://doi.org/10.1186/s13041-019-0437-4>

6. 研究組織 該当なし

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。