様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ６ 月 ２５ 日現在

機関番号：１４３０１
研究種目：若手研究
研究期間：2022～2023
課題番号：２２Ｋ１５０２９

研究課題名（和文）核移行型ドナーDNAプラスミドによる新規遺伝子ターゲティング技術の開発

研究課題名（英文）Development of gene targeting technology using nuclear transfer donor DNA plasmids.

研究代表者
石橋　理基（Ishibashi, Riki）

京都大学・医生物学研究所・助教

研究者番号：２０７７８２７９

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）：本研究では、CRISPR-Cas9およびCRISPR-Cas12aを用いて細胞内で切断可能な高汎用型ドナープラスミドpCriMGET_9-12a（plasmid of synthetic CRISPR coded RNA target sequence-equipped donor plasmid mediated gene targeting via Cas9 and Cas12a）systemを開発し、20系統以上の新規遺伝子改変マウスの樹立に成功した。さらに、マウス生体内においてもpCriMGET_9-12a systemによる遺伝子ターゲッティングが可能である事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究により開発されたpCriMGET_9-12a systemにより、CRISPR-Cas9だけではなくCRISPR-Cas12aを用いても効率的な長鎖DNAノックイン個体の樹立が可能となった。plasmid DNAはRIKEN BRCに寄託しオープンソースとすることで、様々な生命科学研究の発展に貢献することが期待される。また、pCriMGET_9-12a systemは生体内における遺伝子ターゲッティングにも利用可能である事が明らかとなり、非ウイルス型の生体内遺伝子ターゲッティング技術としてより安全な遺伝子治療法の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, a highly versatile donor plasmid pCriMGET_9-12a (plasmid of synthetic CRISPR coded RNA target sequence-equipped donor plasmid mediated gene targeting via Cas9 and Cas12a) system was used to establish more than 20 new lines of genetically modified mice. It was also demonstrated that gene targeting using the pCriMGET_9-12a system is feasible in vivo in mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム編集　遺伝子ターゲッティング　CRISPR-Cas9　CRISPR-Cas12a

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

申請者は、マウスとヒトのゲノム上でのオフターゲットを最小化した人工 CRISP-Cas9 切断配列（Syn-crRNA-TS (Synthetic crRNA target sequence)）をデザインし、これをマルチクローニングサイト(MCS)の両端に配した汎用性の高いドナープラスミド pCriMGET（plasmid of synthetic CRISPR coded RNA target sequence-equipped donor plasmid mediated gene targeting）を開発した（Ishibashi R., et al. *Sci. Rep*. 2020）。pCriMGET システムでは、導入された細胞内にて標的ゲノム配列と同時に pCriMGET ドナーDNA プラスミドも CRISPR-Cas9 により切断されることでノックイン効率が上昇し、様々な遺伝子座に長鎖 DNA 配列を正確にノックインした個体の効率的な作出に成功していた。しかし、受精卵への障害性がより低く、短時間で簡便に CRISPR-Cas システムを導入可能なエレクトロポレーション法を用いた場合、ドナーDNA プラスミドが細胞質へ導入されるため効率的なノックイン個体の樹立には至っていない。そこで、より汎用性の高いドナープラスミドシステムの改良、およびドナーDNA プラスミドの効率的な核への移行によりノックイン個体の樹立効率が改善される可能性が考えられた。また、pCriMGET system の生体内ゲノム編集技術への応用を進めることで、より安全かつ効率的な新規遺伝子治療法の開発に繋がることが期待された。

２．研究の目的

本研究の目的は、長鎖ドナーDNA テンプレートの核移行を介した新規 CRISPR-Cas 遺伝子ターゲッティング技術の開発である。具体的には、初代培養細胞等の非分裂細胞およびマウス受精卵におけるドナーDNA プラスミドの核移行について検証し、高効率・高汎用性を備えた新規核移行型長鎖ドナーDNA プラスミドの開発を目指す。また、生体内における遺伝子ターゲッティングについても検証を行う。本研究により開発される高汎用型遺伝子ターゲッティング技術を用いて、様々な遺伝子改変実験動物、および細胞株の迅速な作出が可能になることに加え、新たな遺伝子治療法の開発に繋がることが期待される。

３．研究の方法

(1) pCriMGET_9-12a system の開発

以前の研究にて開発した pCriMGET システムを元に、CRISPR-Cas12a による切断に対応できるよう改良した新たな高汎用型ドナープラスミド pCriMGET_9-12a（plasmid of synthetic CRISPR coded RNA target sequence-equipped donor plasmid mediated gene targeting via Cas9 and Cas12a）の開発を試みた。構築した pCriMGET_9-12a plasmid に長鎖 DNA targeting cassette 配列を cloning し、培養細胞およびマウス受精卵において CRISPR-Cas9 および CRISPR-Cas12a による遺伝子ターゲッティングが可能であるかどうか検証した。また、マウス受精卵においてエレクトロポレーション法による遺伝子ターゲッティングが可能であるかどうかも検証した。

(2) pCriMGET_9-12a system を用いた *in vivo* gene targeting

pCriMGET_9-12a system による遺伝子ターゲッティングがマウス生体内でも可能であるかどうか検証した。具体的には、pCriMGET_9-12a targeting cassette と共に CRISPR-Cas9 もしくは CRISPR-Cas12a 発現 plasmid を Hydrodynamic Injection 法を用いてマウスに導入し、生体マウス肝臓における内在性遺伝子座へのレポーター遺伝子ノックイン効率を PCR 解析、シーケンス解析、蛍光免疫染色解析、および FACS 解析により評価した。

４．研究成果

(1) pCriMGET_9-12a system の開発

以前の研究で用いたマウスとヒトのゲノム上でのオフターゲットを最小化した人工 CRISPR/Cas9 切断配列（Syn-crRNA-TS (Synthetic crRNA target sequence)に CRISPR-Cas12a の PAM 配列である TTTC 配列を追加し、CRISPR-Cas12a での切断も可能にした pCriMGET_9-12a 遺伝子ターゲッティングシステムを構築した（図 1）。マウス受精卵の核に pCriMGET_9-12a ドナープラスミド、Cas12a タンパク質、標的ゲノム切断用 crRNA および pCriMGET_9-12a 切断用 crRNA をマイクロインジェクション法によ

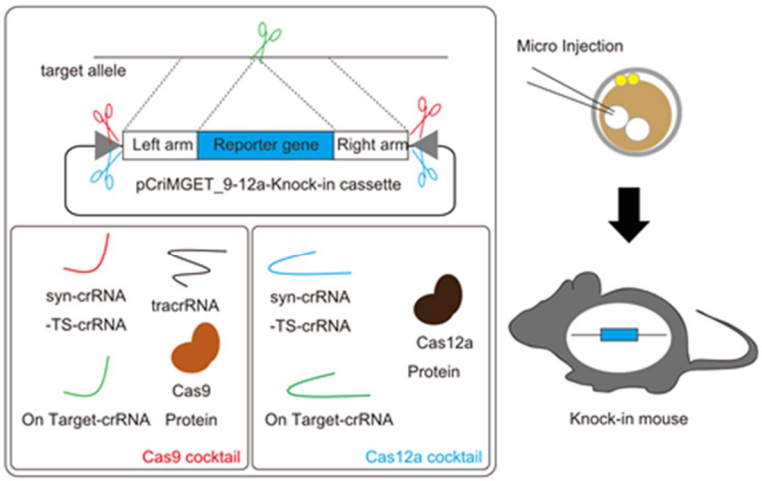
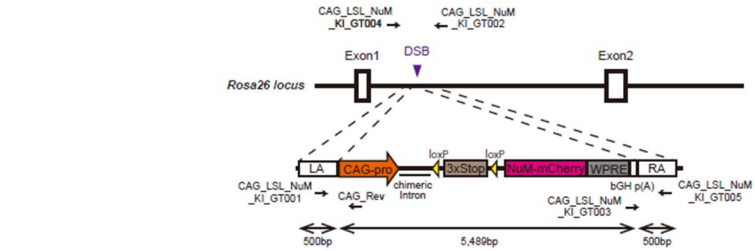


図1 pCriMGET_9-12a system



Rosa26 $^{CAG\text{-}LSL\text{-}NuM}$: *Tbx3* ^{CreERT2}

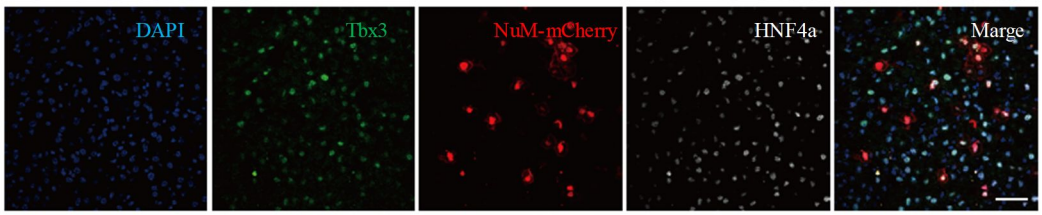


図2 *Rosa26* $^{CAG\text{-}LSL\text{-}NuM}$ マウス樹立

り導入し、*Rosa26* 遺伝子領域に全長 5.5kb の *CAG-Lox-STOP-Lox-NuM* (Nuclear and Membrane) -*mCherry* ドナーDNA テンプレートを CRISPR-Cas12a を用いて挿入した *Rosa26*$^{CAG\text{-}LSL\text{-}NuM}$ ノックインマウスの樹立に成功した。本マウスと以前の研究で樹立していた *Tbx3*^{CreERT2} KI マウスとを交配し、得られた産仔にタモキシフェンを投与した結果、Cre-loxP 組み換えにより生体マウス肝臓の Tbx3 陽性細胞の核と膜において NuM-mCherry の発現が観察された（図 2）。また、セーフハーバー領域のひとつとして知られている *Hipp11* 領域に全長 5kb の *CAG-tdTomato* ドナーDNA テンプレートを CRISPR-Cas9 を用いて挿入したノックインマウスの樹立にも成功した。本システムを用いて研究期間中に 20 系統以上の新規ノックインマウス樹立に成功した。本研究成果により、pCriMGET_9-12a system による効率的な遺伝子ターゲッティング個体の作出が可能となった。

更に、priMGET_9-12a system を用いてエレクトロポレーション法による Rosa26 領域へ *CAG-Venus* 配列をノックインしたマウスの樹立を試みたが、先行研究で示された結果と一致して plasmid DNA はマウス受精卵核へ移行せず、ノックイン産仔を得ることは出来なかった。

(2) pCriMGET_9-12a system を用いた *in vivo* gene targeting

LmnA 遺伝子座の開始コドン直下に *mCherry* 配列をノックインするための pCriMGET_9-12a ドナー plasmid を構築し、Hydrodynamic Injection 法により CRISPR-Cas9 発現 plasmid と共に生体マウスへ導入した結果、生体マウス肝臓において核膜に *mCherry* 遺伝子の発現が見られる肝細胞の出現が確認された（図 3）。また、*Epidermal growth factor receptor* (*Egfr*)遺伝子座の終止コドンの直上に *mCherry* 配列をノックインするための pCriMGET_9-12a ドナーplasmid を構築し、Hydrodynamic Injection 法により CRISPR-Cas12a 発現 plasmid と共に生体マウスへ導入した結果、生体マウス肝臓において細胞膜に *mCherry* 遺伝子の発現が見られる肝

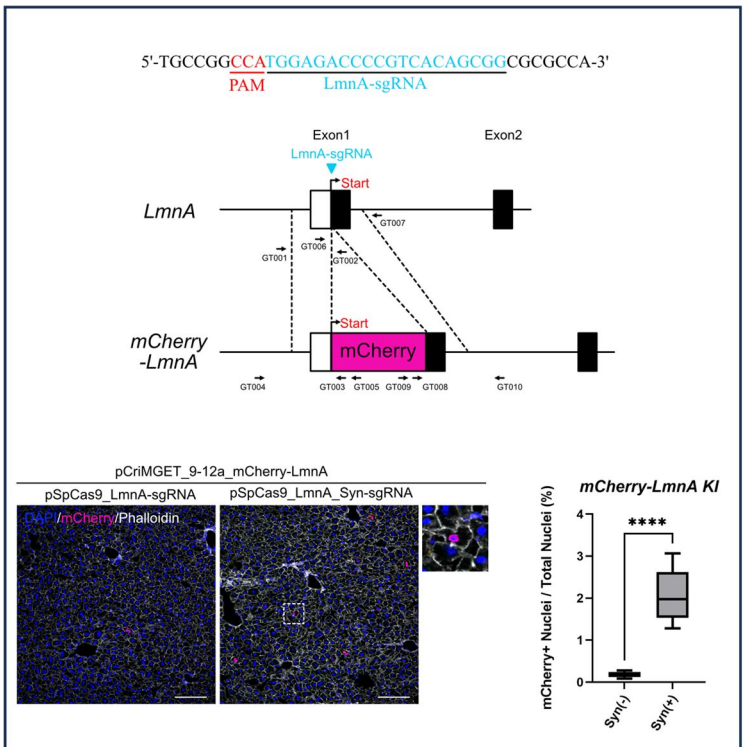


図3 *mCherry-LmnA* 遺伝子ターゲッティング

細胞の出現が確認された（図4）。検証した遺伝子座におけるノックイン効率は、いずれもpCriMGET_9-12a ドナー plasmid を細胞内で切断した場合で上昇していたことより、*in vivo* での遺伝子ターゲッティングにおいても pCriMGET_9-12a system が有用である可能性が示唆された。加えて、シーケンス解析を行った結果、ノックイン遺伝子座における indel 変異は観察されなかった事から、生体内においても pCriMGET_9-12a system により正確な遺伝子ターゲッティングが可能であると考えられる。また、Hydrodynamic Injection 法による生体肝臓へのドナーおよび CRISPR-Cas9 および CRISPR-Cas12a 発現 plasmid の送達は細胞内への流入後、核へと移行している可能性が示唆された。

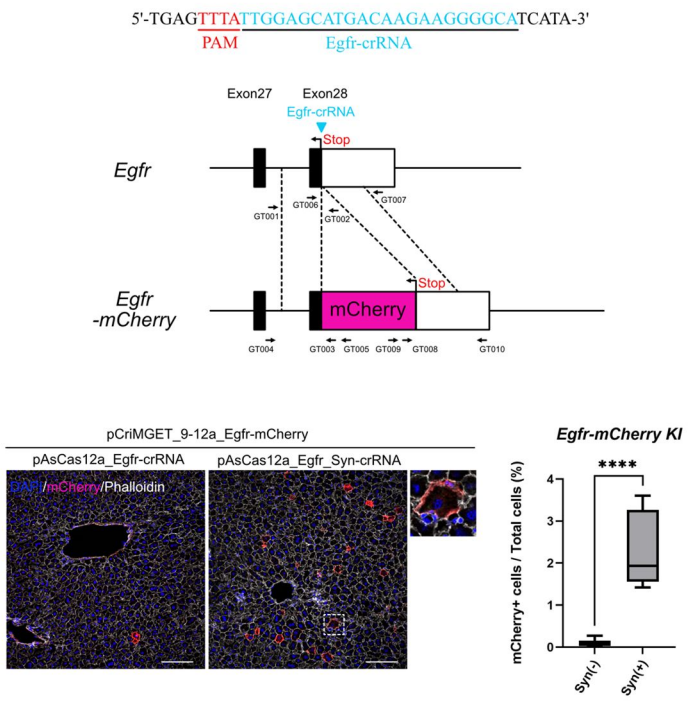


図4 *Egfr-mCherry* 遺伝子ターゲッティング

本研究により、pCriMGET_9-12a system は効率的なノックイン細胞や個体の作出に使用可能なだけではなく、生体内遺伝子ターゲッティングにも利用可能であることが明らかとなった。非ウイルス性の DNA 送達法を利用した生体内遺伝子ターゲティング法として、より安全性の高い遺伝子治療法への開発への貢献が期待される。一方で、pCriMGET_9-12a system による生体内遺伝子ターゲッティング効率は最大 2-3%程度と低かった。これは Hydrodynamic Injection 法による plasmid DNA の送達率が最大 10%程度と低い事が原因であると考えらえる。より効率的な送達方法、および送達後の核への効率的な移行についてさらなる研究が必要であると考えられる。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Ishibashi Riki、Maki Ritsuko、Kitano Satsuki、Miyachi Hitoshi、Toyoshima Fumiko	４．巻 12
２．論文標題 Development of an in vivo cleavable donor plasmid for targeted transgene integration by CRISPR-Cas9 and CRISPR-Cas12a	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Scientific Reports	６．最初と最後の頁 17775
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-22639-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Ishibashi Riki、Maki Ritsuko、Toyoshima Fumiko	４．巻 14
２．論文標題 Gene targeting in adult organs using in vivo cleavable donor plasmids for CRISPR-Cas9 and CRISPR-Cas12a	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Scientific Reports	６．最初と最後の頁 7615
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-024-57551-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 石橋　理基
２．発表標題 CRISPR-Cas9およびCRISPR-Cas12aによるin vivo切断型高汎用性遺伝子ターゲッティングplasmidの開発
３．学会等名 第45回日本分子生物学会年会
４．発表年 2022年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

CRISPR-Cas9およびCRISPR-Cas12aを用いた新規高汎用型遺伝子ターゲッティングプラスミドシステムの開発
https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/post-3221/

RIKEN BRCへのplasmid DNA寄託
pCriMGET_9-12a (RDB20013)
https://dnaconda.riken.jp/search/RDB_clone/RDB20/RDB20013.html

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関