

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657156

研究課題名(和文)人工酵素ZFNを用いたユニバーサル遺伝子改変システムの開発

研究課題名(英文)Development of universal method for genome modification using zinc finger nuclease

## 研究代表者

山本 卓(Yamamoto, Takashi)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90244102

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、人工ヌクレアーゼのZFNやTALENを用いたゲノム編集技術によって、様々な動物において利用可能な標的遺伝子の破壊法および外来遺伝子のノックイン方法の確立を行った。バフンウニHesC遺伝子をターゲットとするZFNタンパク質を大腸菌で作製し、ウニ受精卵に顕微注射したところ、ZFN mRNAを用いた変異導入に比べて発生の早期での変異導入が観察された。さらに、新たに開発されたTALENの作製システムの構築し、高活性型TALEN(Platinum TALEN)を用いた線虫、ショウジョウバエ、コオロギ、ウニ、ホヤ、カエル、イモリなど様々な動物での標的遺伝子破壊を成功させた。

研究成果の概要(英文): In this study, I tried to establish the method for gene modifications such as targeted gene knockout and gene knock-in in various animal species using artificial endonucleases (ZFN and TALEN). Using ZFN protein targeting sea urchin HesC gene generated by E. coli, I observed mutations in early stage of sea urchin embryo, indicating that microinjection of ZFN protein can efficiently introduce mutations in target gene compared to that of ZNF mRNA. Moreover, I established construction system for a highly active TALEN (Platinum TALEN) and demonstrated efficient targeted gene disruption using Platinum TALENs in various animal species such as roundworm (*C. elegans*), fruit fly (*D. melanogaster*), sea squirt (*C. intestinalis*), sea urchin (*H. pulcherrimus*), frog (*Xenopus laevis*) and newt (*P. waltl*).

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：バイオテクノロジー ゲノム編集

### 1. 研究開始当初の背景

目的の遺伝子を改変する遺伝子ターゲティングは、酵母やマウスなど限られた生物において有効な技術である。これらの生物では、相同組換えを利用した任意の遺伝子の破壊が可能であるが、ほとんどの生物では相同組換え活性が低いいため標的遺伝子のノックアウト個体を作製することは困難である。ランダムに変異導入されたプールから、標的遺伝子に変異導入された系統をスクリーニングすることは可能であるが、多大な労力と経費を必要とすること、変異導入箇所を正確に選べないことから、様々な生物に利用可能な標的遺伝子のターゲティング技術の開発が待たれていた。

近年、人工制限酵素 ZFN によって標的遺伝子の特異的に切断し、修復過程での挿入・欠失変異の導入あるいはドナーベクターを介した遺伝子ノックインが可能となってきた。研究者が任意の標的配列を選択することが可能であることから、人工ヌクレアーゼを利用したゲノム編集は、次世代の遺伝子ターゲティング技術として注目されている。このような利用価値の高い ZFN であるが、特定企業の高額な受託作製に頼っており、広く利用されるに至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、申請者が確立した方法 (Ochiai ら, 2010) をベースとして、受精卵において高い翻訳活性と高い切断活性を発揮する ZFN を独自に作製し、これを用いてウニの効率的な遺伝子改変法を開発する。これらの開発から、発生研究に使われる生物種に広く利用できる遺伝子改変システムを確立する。特に、次世代での解析が困難な生物種に利用可能な、受精卵での完全遺伝子破壊技術の確立を目的とする。具体的には、ZFN の翻訳効率化のための UTR の改変、高活性化のためのヌクレアーゼドメインの改変、ZFN タンパク質での導入を行い、ウニ受精卵への導入によって変異導入効率を評価する。さらに、本技術のグローバルな有効性を、前口動物のコオロギと後口動物のホヤをモデルケースとして確認する。コオロギやホヤは遺伝学が確立しており、変異体系統作出のスクリーニングの効率化をもたらすと考えられるため、その点も解析する。

次世代シーケンサーの発達によってゲノム情報が指数関数的に増加する一方、ゲノム配列を細胞内で自由に改変することは未だ困難である。本研究によって、ZFN 導入世代での遺伝子ノックアウト法が確立すれば、発生生物学のみならず遺伝学や医学を含む生命科学分野に与える影響は大きい。さらに、この技術は遺伝子調節領域の改変に利用することも可能であり、ゲノム生物学および進化生物学、合成生物学における利用など可能性は高い。

### 3. 研究の方法

**1) ZFN を用いたウニ受精卵での効率的な遺伝子破壊...申請者がこれまでに作製したウニ HesC 遺伝子の ZFN をモデルとして、受精卵での遺伝子破壊実験を行う。**ウニ胚での変異導入は、受精後 4 時間以降に変異導入を開始することがわかっているため、変異の時期を早めるために、第一に HesC ZFN のヌクレアーゼドメインを高活性型 Sharkey 変異体へ改変する (Guo et al., 2010)。加えて、導入する mRNA の UTR に安定化配列を付加し、翻訳効率を上昇させる。一方、ZFN のタンパク質として導入を平行して実施する。HesC ZFN の cDNA を大腸菌の発現ベクターに挿入し、融合タンパク質として発現させ、HesC ZFN タンパク質を調製する。予備実験では、His タグを付加された ZFN 融合タンパク質はニッケルカラムと Heparin アフィニティーカラム精製できることを確認している。精製した HesC ZFN の in vitro での標的配列切断活性を調べた後に、マイクロインジェクションによりウニ受精卵に導入し、受精卵および 2 細胞胚での HesC 遺伝子への変異導入効率を解析する。

**2) 様々な動物での遺伝子破壊効率の検討と系統の確立...遺伝学的解析が可能なコオロギおよびホヤの GFP トランスジェニックシステムを用いて、GFP 遺伝子の効率的な破壊を行う。**コオロギでの遺伝子破壊は連携研究者の野地澄晴 (徳島大学・教授) が実施する。GFP 破壊用 ZFN を用いて、既にコオロギにおいて導入変異の生殖細胞への転移は確認されている。そこで、変異導入効率を上昇させるためにヌクレアーゼドメインを高活性型に改変した GFP ZFN セットを作製する。この高活性型 ZFN をコオロギ卵に導入し、変異解析により受精卵での導入条件を検討する。

さらに新しい人工ヌクレアーゼである植物病原細菌の転写因子様エフェクターの TALE タンパク質を利用した TALEN を用いた遺伝子破壊を行うために、TALEN 作製システムの確立および高活性型 TALEN の開発を行う。さらに、高活性型 TALEN を用いて様々な動物 (線虫、ショウジョウバエ、コオロギ、ウニ、ホヤ、ツメガエル、イモリ、マウス、ラットなど) での標的遺伝子破壊を行う。

**3) コオロギ、ホヤおよびツメガエルでの遺伝子ノックインシステムの作出...ウニ胚で確立した ZFN を介したノックイン技術を利用して、コオロギ、ホヤおよびツメガエルにおいてレポーター遺伝子のノックイン実験を行う。**細胞系譜特異的な遺伝子に対する高活性型 ZFN およびドナー構築を作製し、それぞれの卵に導入し、GFP 遺伝子の PCR での検出および蛍光観察を行う。これらの解析からノックインの最適条件を決定し、ノックインシステムの作出を試みる。

#### 4. 研究成果

**1) ZFN を用いたウニ受精卵での効率的遺伝子破壊...HesC 遺伝子を切断する ZFN タンパク質を、大腸菌を用いて作製・精製し、ウニ受精卵にマイクロインジェクションすることによって変異導入を行った。その結果、ZFN タンパク質においても ZFN mRNA と同様に変異導入が可能であることが示された。さらに、変異導入の時期は、mRNA では受精後6時間以降であったのに対し、タンパク質では受精後3時間において変異導入が確認でき、変異導入の時期を早めることに成功した。ZFN タンパク質によって導入された変異について塩基配列の解析を行ったところ、そのほとんどが欠失変異であることが明らかになった。しかしながら変異導入の割合が低く、タンパク質の導入量を増やす等の更なる改良が必要であることがわかった。**

**2) 様々な動物での遺伝子破壊効率の検討とシステムの確立...コオロギおよびホヤでの人工ヌクレアーゼの効果を調べるために、GFP 遺伝子破壊する人工ヌクレアーゼ ZFN を作製し、それぞれの種のトランスジェニックシステムを用いて破壊を試みた。ZFN を導入した結果、コオロギでは、F0 世代において蛍光が消失した胚は見られなかったが、F1 世代において蛍光が見られない卵が多数得られ、塩基レベルで変異導入されていることが確認された (Watanabe et al., 2012)。一方、ホヤにおいては F0 世代において蛍光が消失する個体を得られ、高効率での変異導入が可能であることが示された (Kawai et al., 2013)。**

次に、人工ヌクレアーゼの TALEN によって変異導入が可能かどうかを検討するため、高活性型の TALEN (Platinum TALEN) を開発し、その作製システムを確立した (Sakuma et al., 2013, 2014)。このシステムを用いて作製した TALEN を利用して、線虫 (Sugi et al., 2014)、ショウジョウバエ (Kondo et al., 2014)、ウニ (Hosoi et al., 2014)、ホヤ (Treen et al., 2014)、カエル (Sakane et al., 2014)、イモリ (Hayashi et al., 2014)、マウス、ラットにおいて、高効率に遺伝子破壊が可能であることを確かめた。これらの成果をまとめ、日本発生生物学会機関誌 Development Growth & Differentiation においてゲノム編集特集を企画した。

Platinum TALEN を用いたホヤの体細胞および生殖細胞での変異導入効率を調べたところ、生殖細胞において高い変異導入が見られた (Yoshida et al., 2014)。この結果は、ホヤにおいて Platinum TALEN を用いた変異体作製は実用レベルの技術であり、今後の様々な遺伝子の変異システム作製に重要な情報を得ることができた。

アフリカツメガエルにおいて Platinum TALEN を用いた変異体作製を試みた。ツメガエルのチロシナーゼ遺伝子の破壊を行ったところ、F0 世代において完全なアルビノ個体を得られた (写真 1)。この結果から、アフリカツメガエルにおいては、F0 世代において

遺伝子破壊個体の作製が可能であることが示された (Suzuki et al., 2013)。さらに、Platinum TALEN を用いて複数の遺伝子を同時に破壊できるかどうかを調べた。チロシナーゼ遺伝子および GFP 遺伝子が GFP 遺伝子のトランスジェニックシステムにおいて同時に破壊するために、2 セットの TALEN mRNA を受精卵に顕微注入したところ、GFP 蛍光を消失したアルビノ個体が観察された (Sakane et al., 2014)。また、2 倍体のカエルであるネツタイツメガエルを用いて甲状腺ホルモン受容体の破壊を行い、発生におけるこの受容体機能の新たな側面を解明した (Choi et al., 2015)。



写真 1 : Platinum TALEN を用いたアフリカツメガエルチロシナーゼ遺伝子の破壊

**3) コオロギ、ホヤおよびツメガエルでの遺伝子遺伝子ノックインシステムの作出...ZFN および TALEN を用いて標的遺伝子を切断し、切断箇所にはドナーベクターを用いてレポーター遺伝子を挿入する実験を行った。当初、ZFN を中心に研究を進める予定であったが、研究期間中に TALEN が開発されたことから、本研究項目では作製がより簡便な TALEN を用いた。コオロギにおいては、相同組換えによってノックイン個体を得ることができなかったが、ホヤでは効率は低いながらも相同組換えでの挿入が確認された。さらに、ツメガエルにおいては、切断箇所には非同組換えによってレポーター遺伝子を挿入する方法に加えて、マイクロホモロジー-媒介末端結合を利用して、レポーター遺伝子を挿入することが可能であることがわかった。**

#### 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 16 件)

1. Choi J, Suzuki KT, Sakuma T, Shewade L, Yamamoto T and Buchholz DR. Unliganded thyroid hormone receptor alpha regulates developmental timing via gene repression as revealed by gene disruption in *Xenopus tropicalis*. *Endocrinology*, 査読有, 156: 735-744, 2015 (DOI: 10.1210/en.2014-1554)
2. Yoshida K, Treen N, Hozumi A, Sakuma T, Yamamoto T and Sasakura Y. Germ cell

- mutations of the ascidian *Ciona intestinalis* with TALE nucleases. *Genesis*, 査読有, 52: 431-439, 2014 (DOI: 10.1002/dvg.22770)
3. Treen N, Yoshida K, Sakuma T, Sasaki H, Kawai N, Yamamoto T and Sasakura Y. Tissue-specific and ubiquitous gene knockouts in *Ciona* by electroporating TALENs provide new approaches to investigate gene functions. *Development*, 査読有, 141: 481-487, 2014 (DOI: 10.1242/dev.099572)
  4. Sugi T, Sakuma T, Ohtani T and Yamamoto T. Versatile strategy for isolating TALEN-mediated knockout mutants in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Growth Differ*, 査読有, 56: 78-85, 2014 (DOI: 10.1111/dgd.12108)
  5. Sakane Y, Sakuma T, Kashiwagi K, Kashiwagi A, Yamamoto T and Suzuki K. Targeted mutagenesis of multiple and paralogous genes in *Xenopus laevis* using two pairs of TALENs. *Dev Growth Differ*, 査読有, 56: 108-114, 2014 (DOI: 10.1111/dgd.12105)
  6. Hosoi S, Sakuma T, Sakamoto N and Yamamoto T. Targeted mutagenesis in sea urchin embryos using TALENs. *Dev Growth Differ*, 査読有, 56: 92-97, 2014 (DOI: 10.1111/dgd.12099)
  7. Hayashi T, Sakamoto K, Sakuma T, Yokotani N, Inoue T, Kawaguchi E, Agata K, Yamamoto T and Takeuchi T. TALENs efficiently disrupt the target gene in Iberian ribbed newts (*Pleurodeles waltl*), an experimental model animal for regeneration. *Dev Growth Differ*, 査読有, 56: 115-121, 2014 (DOI: 10.1111/dgd.12103)
  8. Kondo T, Sakuma T, Wada H, Akimoto A, Yamamoto T and Hayashi S. TALEN-induced gene knock out in *Drosophila*. *Dev Growth Differ*, 査読有, 56: 86-91, 2014 (DOI: 10.1111/dgd.12097)
  9. Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Kudo Y, Asami K, Ogawa A, Watanabe A, Kajii T, Yamamoto T and Matsuura S. TALEN-mediated single-base-pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有, 111: 1461-1466, 2014 (DOI: 10.1073/pnas.1317008111)
  10. Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, Suzuki K, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S and Yamamoto T. Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Scientific Reports*, 査読有, 3: 3379, 2013 (DOI: 10.1038/srep03379)
  11. Kato T, Miyata K, Sonobe M, Yamashita S, Tamano M, Miura K, Kanai Y, Miyamoto S, Sakuma T, Yamamoto T, Inui M, Kikusui T, Asahara H, Takada S. Production of Sry knockout mouse using TALEN via oocyte injection. *Scientific Reports*, 査読有, 3: 3136, 2013 (DOI: 10.1038/srep03136)
  12. Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki KI, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S and Yamamoto T. Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes Cells*, 査読有, 18: 315-326, 2013 (DOI: 10.1111/gtc.12037)
  13. Suzuki KI, Isoyama Y, Kashiwagi K, Sakuma T, Ochiai H, Sakamoto N, Furuno N, Kashiwagi A and Yamamoto T. High efficiency TALENs enable F0 functional analysis by targeted gene disruption in *Xenopus laevis* embryos. *Biology Open*, 査読有, 2: 448-452, 2013 (DOI: 10.1242/bio.20133855)
  14. Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Horch H, Hamaguchi N, Nakamura T, Bando T, Ohuchi H, Yamamoto T, Noji S and Mito T. Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases. *Nat Commun*, 査読有, 3: 1017, 2012 (DOI: 10.1038/ncomms2020)
  15. Ochiai H, Sakamoto N, Fujita K, Nishikawa M, Suzuki KI, Matsuura S, Miyamoto T, Sakuma T, Shibata T and Yamamoto T. Zinc-finger nuclease-mediated targeted insertion of reporter genes for quantitative imaging of gene expression in sea urchin embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有, 109: 10915-10920, 2012 (DOI: 10.1073/pnas.1202768109)
  16. Kawai N, Ochiai H, Sakuma T, Yamada L, Sawada H, Yamamoto T and Sasakura Y. Efficient targeted mutagenesis of the chordate *Ciona intestinalis* genome with zinc-finger nucleases. *Dev Growth Differ*, 査読有, 54: 535-545, 2012 (DOI: 10.1111/j.1440-169X.2012.01355.x)
- 〔学会発表〕(計 10 件)
1. Sakuma Tetsushi, Suzuki Kenichi and Yamamoto Takashi, Genome editing using Platinum TALENs, FASEB Science Research Conference, 22-27 Jun 2014, Nassau, Bahamas
  2. 山本 卓, ゲノム編集技術の限らない可能性, 鳥取大学染色体工学研究センター研究成果発表会, 2014 年 2 月 21 日, 東京
  3. 山本 卓, ゲノム編集革命-人工ヌクレアーゼを利用した遺伝子改変技術の開発, 平成 25 年度広島バイオフォーラム「ここまで進んだゲノム科学とその活用」, 2013 年 11 月 21 日, 広島
  4. 山本 卓, 高活性型 TALEN の開発と哺乳類培養細胞および動物での標的遺伝子改変, 第 65 回日本生物工学会シンポジウム「次世代の植物バイオテクノロジー」, 2013 年 9 月 18 日, 広島
  5. 山本 卓, 人工ヌクレアーゼを用いた両生

類でのゲノム編集, 日本動物学会第 84 回大会シンポジウム「生物実験材料としてのネッタイツメガエルの長所と有用性」, 2013 年 9 月 8 日, 岡山

6. 山本 卓, Platinum TALEN の開発と様々な動物におけるゲノム編集, 理研シンポジウム「ゲノムデザイン技術と疾患モデル研究」, 2013 年 6 月 28 日, つくば
7. 山本 卓, ZFN 法と TALEN 法を用いたゲノム編集時代の到来, 第 35 回日本分子生物学会シンポジウム, 2012 年 12 月 10 日~12 月 15 日, 福岡
8. 山本 卓, 人工ヌクレアーゼ (ZFN や TALEN) を用いたゲノム編集研究の現状と可能性, 第 5 回 DNA 鑑定学会, 2012 年 11 月 29 日~2012 年 11 月 30 日, 東京
9. 山本 卓, 人工ヌクレアーゼを基盤とした培養細胞および動物でのゲノム編集, 日本動物学会第 83 回大会シンポジウム, 2012 年 9 月 13 日~9 月 15 日, 大阪
10. 山本 卓, 人工ヌクレアーゼを基盤とする動物におけるゲノム編集, 日本学術会議公開シンポジウム, 2012 年 5 月 14 日, 東京

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 核酸挿入用ベクター

発明者: 鈴木賢一・坂根祐人・佐久間哲史・山本 卓

権利者: 広島大学

種類: 特許 (通常)

番号: 特願 2013-230349

出願年月日: 2013 年 11 月 6 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

分子遺伝学研究室:

<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/smg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 卓 (YAMAMOTO TAKASHI)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 9 0 2 4 4 1 0 2