

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25250014

研究課題名(和文)人工制限酵素を用いたゲノム編集技術の開発とその応用

研究課題名(英文)Application of CRISPR/Cas9 system for gene manipulation in mice

研究代表者

伊川 正人 (IKAWA, MASAHITO)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：20304066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ZFNやTALENに代わる新しい遺伝子改変技術であるCRISPR/Cas9システムを用いてマウス個体レベルでのゲノム編集技術を確立した。まずpCAG-EGxxFPプラスミドを作製し、EGFP蛍光を指標に培養細胞内でのDNA切断効率を判定する系を確立した。次に、標的配列を認識するgRNAとDNA切断するCAS9酵素を発現するプラスミドを受精卵に注入し、両者を一過性に発現させることで、約半数の子孫で遺伝子破壊マウスを作製できる系を確立した。さらにゲノム編集したES細胞を用いたキメラ解析などが実用的であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We have introduced CRISPR/Cas9 system to generate genome edited mice. First, we prepared pCAG-EGxxFP plasmid to assess gRNA cleavage efficiency. Next, we injected gRNA/Cas9 expressing plasmids into pronucleus to generate genome edited mice. Transiently expressed gRNA/Cas9 complex digests the target locus and indels destroy gene function. Finally, we generated chimeric mice with genome-edited ES cells and analyzed gene function in mice. Our system can accelerate the reverse genetics in mice.

研究分野：実験動物学

キーワード：ゲノム編集 生殖不全 遺伝子破壊 点変異 ES細胞

### 1. 研究開始当初の背景

これまで遺伝子機能を個体レベルで解析するためには、外来遺伝子を組み込んだトランスジェニック (TG) マウスや、目的遺伝子を破壊したノックアウト (KO) マウスを作るアプローチがなされており、確実に成果を挙げてきた。特に KO マウスは個々の遺伝子機能を個体レベルで調べるために欠かせないツールとなっており、2007年にノーベル賞を受賞したことも記憶に新しい。我々もこれまでに 300 系統以上の KO マウスを作製し、自らの生殖生物学研究に用いるだけでなく、広く他グループの遺伝子機能解析研究を推進してきた。

しかし KO マウスの作製は容易ではなく、ターゲティングベクターの構築や胚性幹 (ES) 細胞を介したキメラマウス作製など、高度な技術や多大な労力・時間・費用がかかる問題点があった。そこで海外では集約による問題の解決を目指し、少数拠点で網羅的に KO マウスを作製する国際プロジェクト (KOMP; Knock-Out Mouse Project) が開始されている。ただ殆どは遺伝子破壊された ES 細胞の状態凍結保存されており、キメラマウスを介して個体復元する必要がある。ES 細胞が培養の間に全能性を失うことも少なく、その場合には振り出しに戻るリスクを抱えている。

また、従来の KO マウスの解析から分かることは、エクソンがコードするタンパク質がない時の生体情報に限られている。そのため実際にヒトで見られるような 1 塩基変異 (SNPs) による疾病との関連や、タンパク質をコードしない non-coding RNA や small RNA、さらにはイントロンや遺伝子間に広がる無数の塩基配列が個体に及ぼす影響を知ることが出来ない。そこで、ゲノムを 1 塩基単位で任意に操作できる次世代の遺伝子改変技術、オンデマンドゲノム編集システムの開発が望まれていた。

### 2. 研究の目的

近年、Zinc Finger Nuclease (ZFN) や Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) などの人工制限酵素を用いた遺伝子ノックアウト技術が報告されている。切断された DNA 二重鎖が修復される時に起きるエラー (NHEJ; Non Homologous End Joining や HDR; Homology Dependent Repair) を利用するものであるが、哺乳動物への応用研究は緒についたばかりである。本研究課題では、主に TALEN 人工制限酵素をマウスやラットに最適化して応用するとともに、LV-TG 法や、半数体ゲノムしか持たないハプロイド ES 細胞、さらには生殖幹 (GS) 細胞などと組み合わせることにより、1 塩基レベルで任意の遺伝子操作を可能にするシステムを構築する。

さらに、新規に KO マウスを作製して必須遺伝子を探ることに加え、重要な因子についてはマーカー融合遺伝子に置換 (ノックイン; KI) してイメージング解析を実施したり、点変異マウスを作製して機能ドメインを探したり、最終的にはヒト遺伝子化 (正常型および疾病型との置換) による疾患モデル動物の開発も実施する。

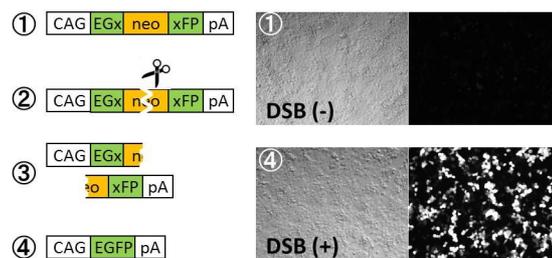
### 3. 研究の方法

本研究課題では、サブテーマを設けて目標を明確化すると同時に、連携研究者 4 人を担当者に配置することで、リスクの軽減と問題点の早期発見・解決を可能にする。

#### (1) ゲノム編集システムの開発

##### DNA 切断効率測定系の開発【図 1】

人工制限酵素等による 2 本鎖 DNA 切断効率を判定するためにはレポーターシステムを構築する必要がある。そこで、DNA 切断時に誘発される相同性を利用した遺伝子修復を活用して、EGFP 蛍光タンパク質が発現するシステムを考えた。具体的には、緑色蛍光タンパク質 EGFP を前半 2/3・後半 2/3 に分断し、その間にマルチクローニングサイトを挿入し、標的配列を挿入できる EGxxFP カセットを構築した。標的配列が切断されると、重複する中部 1/3 の間で相同性を利用して修復し、EGFP 配列が復元されることを期待した。次に、哺乳類細胞内で普遍的に発現する CAG プロモーターの制御下に、EGxxFP カセットを polyA シグナルと共に配置した、pCAG-EGxxFP レポータープラスミドを構築した。



【図 1】DNA 切断活性測定システム

CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムの導入。本研究を申請後すぐに、TALEN に変わる新しいゲノム編集システムとしてバクテリア病原体由来の CRISPR/Cas9 システムが Science 誌に報告された。CRISPR/Cas9 システムでは、ガイド RNA により 20 塩基の標的配列と直下の PAM 配列 (NGG) を認識し、Cas9 タンパク質が PAM の直上 3 塩基目と 4 塩基目の間を平滑末端に切断する。そこで、U6 プロモーター制御下にガイド RNA、Chicken b-actin プロモーターの制御下に hCas9 (コドンヒト化した Cas9) を発現する pX330 プラスミドを手に入して、TALEN システムと比較検討した。

#### ガイド RNA の探索

本研究課題では、遺伝子破壊しても致死となる可能性の低い、精巢特異的発現遺伝子群を標的とした。候補遺伝子について、翻訳開始点の下流に NGG 配列を 4 箇所検索し、その上流 20 塩基を標的配列とするガイド RNA を設計し、BbsI サイトを用いて pX330 に挿入した。標的配列を含む約 300~600 塩基を PCR 増幅し pCAG-EGxxFP に挿入しレポータープラスミドとした。両プラスミドを HEK293T 細胞に導入し、EGFP 蛍光強度の高いガイド RNA を優先的に実験に用いた。

#### 受精卵でのゲノム編集

ホルモン投与により過排卵処理したメスマウスをオスマウスと交配させ、受精卵を回収した。受精卵の前核に pX330 プラスミドを注入した後、偽妊娠マウスの卵管に移植した。得られた仔マウスについては、離乳時にゲノム DNA を抽出して標的遺伝子の変異を確認した。さらに交配によりホモ遺伝子変異マウスを作製し、後の実験に用いた。点変異導入には短鎖の 1 本鎖 DNA (ssODN)、ノックインには 2 本鎖 DNA (dsDNA) を同時注入した。なお 2 つの pX330 を混合して注入して 2 箇所切断することで領域欠損することも試みた。

#### ES 細胞でのゲノム編集

マウス ES 細胞を  $1 \times 10^3$ /well で 6 穴プレートに播種し、トランスフェクション試薬を用いて、pX459 (pX330 に puro 耐性カセットを有するプラスミド) を導入した。翌日から puromycin 選択を開始し、3 日後に継代、薬剤なしで培養を続け、約 7 日後にコロニーピックアップしてクローン化した。PCR とシーケンスにより変異クローンを同定した後、必要があれば ICR 系統の 8 細胞期胚に注入してキメラマウスを作製した。さらに、交配により生殖系列に寄与させた後、ホモ変異マウスを作製して解析した。

#### (2) ゲノム編集マウスの表現型解析

##### 妊孕性試験

精巢特異的に発現する遺伝子を破壊したマウスについては、ホモ変異オスマウスを作製し、野生型メスと数ヶ月間同居させて妊娠回数、産仔数などを記録した。平均産仔数が少ない場合には、雄性不妊を疑い、精巢の重量測定や組織学的解析を行った。

##### 精子受精能力試験

精子形成に異常が認められない場合には、精巢上体から精子を採取して、その数、形態を観察した。さらに CASA (computer

assisted sperm parameter analysis) を用いて精子運動性を解析し、その後、体外受精試験を行った。体外受精には、ホルモン投与により過排卵処理したメスから未受精卵を回収し、卵丘細胞あり、透明帯あり、両者なしの群に分けて媒精した。なお運動性などが全く認められない場合には、マイクロマニピュレーターで顕微鏡下に精子頭部のみを見受精卵の細胞質に注入する顕微授精を実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ゲノム編集システムの開発

###### DNA 切断効率測定系の開発

申請者らが開発した緑色蛍光を指標とした gRNA 検定システムは簡便で再現性が高く、非営利団体 Addgene を通じて延べ 600 回以上の分与を実施した。また多数の遺伝子および gRNA を検討した結果から gRNA は G で始まらなくても良いこと、PAM 配列の最初の N に塩基間で活性に及ぼす違いは殆どないことが明らかとなった。

CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムの導入  
CRISPR/Cas9 システムでは、gRNA デザインに 1 日程度、オリゴ合成と pX330 への挿入に 3 日程度、同時進行で標的部位増幅プライマー合成と PCR、pCAG-EGxxFP への挿入、さらに HEK293T 細胞へのトランスフェクションと緑色蛍光観察に 3 日程度と、約 1 週間で DNA 切断ベクターが完成できた。また切断活性を比較しても CRISPR/Cas9 システムは ZFN や TALEN と遜色ないことが確認できた。

###### ガイド RNA の探索

研究を開始当時は目視による gRNA の検討を行っていたが、その後、短鎖配列検索用 Bow-Tie ソフトを導入した。さらに Web ソフト CRISPRdirect を活用するなど、最新のソフトを用いた探索を実施している。

###### 受精卵でのゲノム編集【図 2】

精巢特異的に発現する約 100 遺伝子について上記法にて gRNA をデザインし、pX330 プラスミドを受精卵前核に注入することで、遺伝子破壊マウスを作製した。約半数の仔で Indel 変異(約 10 塩基程度の小さな遺伝子欠損や挿入)が認められた。また両アレル欠損個体が得られることもあった。

なお pX330 と同時に ssODN を導入した場合には産仔の約 10%、dsDNA を導入した場合には産仔の約 5%で点変異マウス、ノックインマウスをそれぞれ得ることができたが、遺伝子座によっては全く得られないことも少なくなかった。

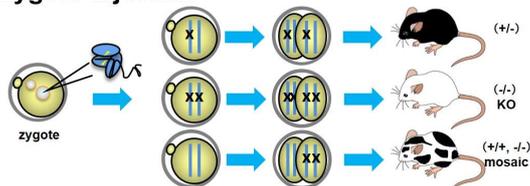
## ES細胞でのゲノム編集【図2】

前核注入法で Indel 変異効率の悪かった gRNA 配列を組み込んだ pX459 プラスミドを作製し、ES細胞にトランスフェクションしてクローン化したところ、約8割以上の確率で Indel 遺伝子変異を確認した。また2箇所切断による800kbpを超える長領域欠損も、ES細胞なら30%程度の高効率で達成できた。

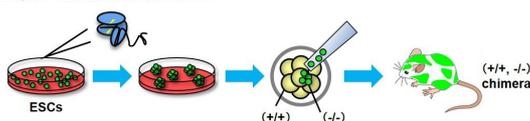
また ssODN を用いた点変異等は殆ど導入できないのに対し、dsDNA を用いた場合には点変異も EGFP 等のノックインも効率よく達成できることを確認した。

さらに受精卵前核注入法では、卵割後に遺伝子変異が導入されることも少ないため、ファウンダー産仔がモザイク状態になることも多かった。我々は緑色蛍光で標識したES細胞を用いて、両アレル変異したクローンを樹立し、キメラマウスを作製すれば、ファウンダーマウスで緑色蛍光を指標に遺伝子変異を有する細胞を同定・選別できることを示した。さらに本系を用いて、致死性遺伝子についても簡単に表現型解析できる可能性を示すことができた。

### zygote-injection



### ESC-transfection



【図2】受精卵前核注入およびES細胞を用いたゲノム編集マウス作製法

## (2) ゲノム編集マウスの表現型解析

### 妊孕性試験

約20年をかけて従来法で作製した23系統、約3年をかけてCRISPR/Cas9法で作製した31系統の精巣特異的発現遺伝子のノックアウトオスマウスを野生型メスマウスと交配し、それらが雄性の妊孕性に必須でないことを明らかにした。

### 精子受精能力試験

解析を終えた約80遺伝子の内、54遺伝子が必須でなかったものの、残り26遺伝子について不妊であったマウスについて、原因究明と解析を行った。特に免疫抑制剤の標的として有名なカルシニューリンの精巣ホモログについて、詳細な解析を進めた。

カルシニューリンは catalytic domain と regulatory domain の2つのタンパク質

がヘテロダイマーを形成したものであるが、それぞれ3遺伝子 (Ppp3ca, Ppp3cb, Ppp3cc) と2遺伝子 (Ppp3r1, Ppp3r2) にコードされる。本研究では、Ppp3cc欠損マウスを作製して解析を行ったところ、精子形態には異常が認められず、精子機能(運動性)に異常があり、雄性不妊となった。さらにカルシニューリン阻害剤であるFK506やCiclosporinを投与した場合にも同様の表現型が観察できることから、投与中止後には妊孕性が回復できることから、新たな男性避妊薬の標的候補因子となることを論文報告した。

その他、本研究により開発した技術を活用した共同研究を多数実施するとともに、作製したマウス系統は理研BRC、熊大CARDなどの公的バイオリソースセンターを通して分与可能な体制を整えた。

## 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 10件)

Young SA, Miyata H, Satouh Y, Muto M, Larsen MR, Aitken RJ, Baker M, Ikawa M. CRISPR/Cas9-mediated mutation revealed cytoplasmic tail is dispensable for IZUMO1 function and male fertility. *Reproduction*. 2016 Dec;152(6):665-672. 査読有

DOI: 10.1530/REP-16-0150

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27624483>

Oji A, Noda T, Fujihara Y, Miyata H, Kim YJ, Muto M, Nozawa K, Matsumura T, Isotani A, Ikawa M. CRISPR/Cas9 mediated genome editing in ES cells and its application for chimeric analysis in mice. *Sci Rep*. 2016 Aug 17;6:31666. 査読有

DOI: 10.1038/srep31666.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27530713>

Miyata H, Castaneda JM, Fujihara Y, Yu Z, Archambeault DR, Isotani A, Kiyozumi D, Kriseman ML, Mashiko D, Matsumura T, Matzuk RM, Mori M, Noda T, Oji A, Okabe M, Prunskaitė-Hyrylainen R, Ramirez-Solis R, Satouh Y, Zhang Q, Ikawa M, Matzuk MM. Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jul 12;113(28):7704-10. 査読有

DOI:10.1073/pnas.1608458113

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27624483>

7357688

Miyata H, Satouh Y, Mashiko D, Muto M, Nozawa K, Shiba K, Fujihara Y, Isotani A, Inaba K, Ikawa M. Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive. *Science*. 2015 Oct 23;350(6259):442-5. 査読有  
DOI:10.1126/science.aad0836  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26429887>

Young SA, Miyata H, Satouh Y, Kato H, Nozawa K, Isotani A, Aitken RJ, Baker MA, Ikawa M. CRISPR/Cas9-Mediated Rapid Generation of Multiple Mouse Lines Identified Ccdc63 as Essential for Spermiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2015 Oct 16;16(10):24732-24750. 査読有  
DOI:10.3390/ijms161024732  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26501274>

Tokuhiro K, Satouh Y, Nozawa K, Isotani A, Fujihara Y, Hirashima Y, Matsumura H, Takumi K, Miyano T, Okabe M, Benham AM, Ikawa M. Calreticulin is required for development of the cumulus oocyte complex and female fertility. *Sci Rep*. 2015 Sep 21;5:14254. 査読有  
DOI:10.1038/srep14254  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26388295>

Qiu B, Shi X, Wong ET, Lim J, Bezzi M, Low D, Zhou Q, Akincilar SC, Lakshmanan M, Swa HL, Tham JM, Gunaratne J, Cheng KK, Hong W, Lam KS, Ikawa M, Guccione E, Xu A, Han W, Tergaonkar V. NUCKS Is a Positive Transcriptional Regulator of Insulin Signaling. *Cell Rep*. 2014 Jun 26;7(6):1876-86. 査読有  
DOI:10.1016/j.celrep.2014.05.030  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24931609>

Young S, Baker M, Ikawa M. Genome Editing in Mice Using CRISPR/Cas. Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases. Springer Japan 2014;151-166. 査読有  
[http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-55227-7\\_10](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-55227-7_10)

Mashiko D, Young SA, Muto M, Kato H, Nozawa K, Ogawa M, Noda T, Kim YJ, Satouh Y, Fujihara Y, Ikawa M. Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes. *Dev Growth Differ*. 2014

Jan;56(1):122-9. 査読有  
DOI:10.1111/dgd.12113  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24372541>

Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep*. 2013 Nov 27;3:3355. 査読有  
DOI:10.1038/srep03355  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24284873>

[学会発表](計 5件)

伊川正人. CRISPR/Cas9 Mediated Genome Editing and its Application for the Study of Reproduction. 第20回日米科学技術会議. 2017.3.9. FDA (Silver Spring, USA)

伊川正人. CRISPR/Cas9 mediated genome editing and its application for the study of reproduction. The 4th SKLRB Symposium on Reproductive Biology. 2016.10.27. UCAS international Conference Center (Beijing, China)

伊川正人. CRISPR/Cas-Mediated Genome Editing in Mice and Its Application for the Study of Reproduction. SSR 2015 Annual Meeting. 2015.6.21. Puerto Rico Convention Center (San Juan, Puerto Rico, USA)

伊川正人. CRISPR/Cas システムを用いたマウスゲノム編集. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014.11.12. パシフィコ横浜会議センター(神奈川県横浜市)

伊川正人. CRISPR/Cas システムを用いたマウスゲノム編集. 第36回日本分子生物学会年会. 2013.12.3. 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

[その他]

ホームページ等  
<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊川 正人 (IKAWA, Masahito)  
大阪大学・微生物病研究所・教授  
研究者番号: 20304066

(2) 研究分担者 : なし

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

磯谷 綾子 ( ISOTANI ,Ayako )  
奈良先端科学技術大学院大学・准教授  
研究者番号：20444523

藤原 祥高 ( FUJIHARA ,Yoshitaka )  
大阪大学・微生物病研究所・助教  
研究者番号：70578848

宮田 治彦 ( MIYATA ,Haruhiko )  
大阪大学・微生物病研究所・助教  
研究者番号：50604732

佐藤 裕公 ( SATOUH ,Yuhkoh )  
大阪大学・微生物病研究所・助教  
研究者番号：40545571

(4)研究協力者 :なし  
( )