

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25252056

研究課題名(和文) ジンクフィンガーヌクレアーゼの遺伝子ノックアウト動物作製への実用化に関する研究

研究課題名(英文) Study on practical application of zinc finger nuclease for gene knockout animal production

研究代表者

内藤 邦彦 (Naito, Kunihiko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：20188858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,600,000円

研究成果の概要(和文)： 遺伝子ターゲティング生物作製の新しい手法として注目されている人工ヌクレアーゼの実用化を推進することを目指し、種々の技術開発および家畜卵と、魚類卵への応用を検討した。

本研究では、CRISPR/Cas系を用い一度にトリプルKOが高率にできること、大規模変異を入れられることを示した。技術開発として非特異切断の抑制が期待されるオフセットニッキング系の構築、PAM配列が異なる別種のCRISPR/Cas系の利用性向上、また応用としてブタ卵やヤマメ、ニジマス卵での利用の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)： The present study was aimed to promote the practical application of artificial nucleases, which has drawn attention as a new method of gene targeting organism production, and studied various technological developments and application to livestock eggs and fish eggs.

In this study, we showed that triple KO can be produced at a time using CRISPR/Cas system, and that large-scale mutation can be introduced. As technology development, we constructed offset nicking system which is expected to suppress nonspecific effects and increased availability of original CRISPR/Cas system of other species with different PAM sequence. For the application, we showed the availability of this system to porcine eggs, Yamame and rainbow trout eggs.

研究分野：生殖遺伝学

キーワード：人工ヌクレアーゼ CRISPR ZFN マウス卵 ブタ卵 魚類卵

1. 研究開始当初の背景

Zinc-Finger Nuclease (ZFN)はゲノム上の標的配列を認識する Zinc-Finger (ZF) タンパク質と DNA を切断する FokI スクレアーゼを結合した人工スクレアーゼであり、DNA に二本鎖切断 (DSB) を入れることにより DNA 修復の過程で変異が入ることを利用した遺伝子ターゲティング生物作製の新しい手法として注目された。ZFN を利用した初の遺伝子欠損 (KO) 個体はショウジョウバエで 2002 年に報告され、哺乳類ではラットで 2009 年に成功例が報告されている。また DSB の修復課程で DNA 断片の取り込みが起こることを利用した標的部位への遺伝子導入 (KI) 動物も 2010 年にマウス、2011 年にはラットとウサギで報告されている。しかし ZFN 作製には費用と時間・労力がかかり、作用効率が低いうえ非特異的な作用がある等の理由から広く実用化されてはいなかった。本研究開始の前年に、当研究室では僅か 1 日で ZFN が安価に作製できる新たな合成方法を開発し、この方法で作製した 4 種類の ZFN がマウス初期胚で標的配列を切断し、胚移植の結果、遺伝子ターゲティングマウスを僅か 1 ヶ月で作製することに成功した。この作成法を完成・普及させれば ZFN の応用に大きく貢献すると思われる。

ところが研究開始年である 2013 年に新たな人工スクレアーゼとして CRISPR/Cas 系が報告された。この系では、標的配列を認識するのはタンパク質ではなく特殊な高次構造を持つ RNA でガイド RNA (gRNA) と呼ばれ、これと特異的に結合するスクレアーゼの Cas9 が標的 DNA を切断する。当研究室もこの作用確認を行ったところ、ZFN と比較し格段に高率が高く、また gRNA の作成は ZFN 作成より容易であった。さらに初の報告があった 2013 年と同年にマウスでダブル KO のみならずトリプル KO やクインタプル KO まで報告された。そのため今後は人工スクレアーゼとしては ZFN より CRISPR/Cas 系が主流になると考えられる。

2. 研究の目的

当初の目的は、ZFN の合成方法を完成させ、家畜卵や魚類卵にまで応用できるようにし、人工スクレアーゼを用いた遺伝子ターゲティングを普及させることであった。しかし上記の通り CRISPR/Cas 系の有用性が ZFN より著しく高いことが判明したことから ZFN のみならず CRISPR/Cas 系も含めて研究を遂行することとした。すなわち、本研究の目的は人工スクレアーゼの遺伝子ターゲティング動物作製への実用化を推進することであり、そのための技術開発を行うことである。なお、本研究課題名には遺伝子ノックアウト動物と記したが、通常の KO 動物のみならず、KI 動物や特定の組織にのみ遺伝子変異を導入するコンディショナル遺伝子変異 (CKO) 動物の作製も含めて研究を行うこととした。

3. 研究の方法

材料として、人工スクレアーゼの技術開発の目的には培養細胞とマウス卵を用い、その応用には家畜卵であるブタ卵と、魚類卵としてゼブラフィッシュ、ヤマメ、およびニジマス卵を用いることとする。人工スクレアーゼ導入の方法としては、培養細胞に対しては発現ベクターをエレクトロポレーションにより取り込ませ、卵に対しては ZFN の mRNA、CRISPR/Cas 系の Cas9 の mRNA と gRNA を in vitro で合成し、これらを卵の細胞質に顕微注入するという手法を用いる。

ZFN については効率を高め、非特異的切断を抑制する方法として、DNA 認識ドメインである ZF の個数を増やすこと、および魚類卵への応用を検討する。

CRISPR/Cas 系については、まずゲノム改変効率を確認した後、非特異作用を抑制する方法としてのオフセットニックング法の利用、KI 動物作成に用いる導入遺伝子の形状の検討、コンディショナル KO 作成のための gRNA と Cas9 を発現させるベクターの検討、および通常用いられている *Streptococcus Pyogenes* (SP)由来以外の CRISPR/Cas 系の利用について検討した。

4. 研究成果

(1) ZFN の ZF 数の検討

DNA 認識ドメインである ZF の個数を増やすことで、ZFN の効率を高め非特異的切断を抑制することができるかを検討するため、通常用いられる 4 ZF ではマウス胚の初期発生停止の毒性を示す ZFN をモデルに、ZF 数を増やし胚発生停止とゲノム改変効率に対する影響を検討した。

当研究室で確立された簡易・安価・迅速な ZFN の作製法である OLTA 法およびその変法を用いて、ZF 数を 6 (Right)および 7 (Left)へと延長することに成功した (図 1)。

先行研究で設計した ZFN (4+4 Fingers)



本研究で設計した ZFN (7+6 Fingers)

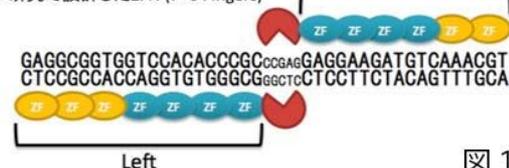
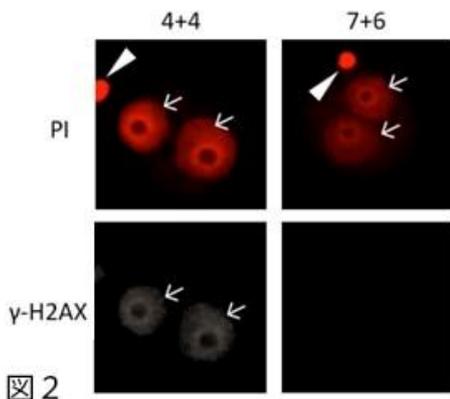


図 1

これらをマウス前核期胚に顕微注入したところ、7ZF の Left-ZFN 実験区において発生停止が救済された。さらに、発生停止を起こす 4ZF の ZFN について、DNA 二本鎖切断 (DSB) の指標となる Histone H2AX のリン酸化 (γ -H2AX) により毒性を確認した結果、DSB が前核の広範囲に及んでおり、ゲノム中の複数の Off-target に変異が見出された。一

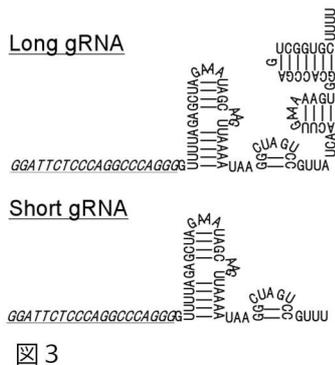
方、7ZF の ZFN を導入した際には γ -H2AX は見出されなかった (図 2)。



なお、6ZF の Right-ZFN 実験区では、発生停止が救済されず、また 7finger の Left-ZFN 実験区において標的配列に変異が導入されたが、4ZF 実験区の改変効率を上回ることではできなかった。以上の結果から、ZFN の ZF 数を延長することにより非特異的切断を改善することは場合により可能だが、ゲノム改変率を劇的に改善することは難しいことが示唆された。

(2) CRISPR/Cas 系のゲノム改変効率

本研究開始時点で CRISPR/Cas 系に用いる gRNA の高次構造には long-type と short-type の 2 種類が報告されていた。(図 3)



そこで、これらの比較を行ったところ short-type では殆ど変異は導入されず long-type を使用した時にのみ高率に変異が導入され、Cas9 mRNA と gRNA を各 10 μ g/ml で注入した時の変異導入率はほぼ 100%であった。また、ZFN と比較し非特異切断は極めて低く、この率は Cas9 mRNA 濃度に依存し、変異導入効率は gRNA 濃度に依存した。

最適条件下で同一染色体上の約 10 kb 離れた 2 か所に gRNA を設計することにより、ダブル変異率は 90%以上であり、両者の間が欠失する大規模な変異の作成にも成功した(約 30%)。また、この大規模変異は正常に次世代に受け継がれることも確認した。

さらに異なる染色体の 3 か所に gRNA を設

計することによりトリプル KO 動物の作成にも成功し、その率は 77.8%と極めて高率であった。

(3) CRISPR/Cas 系におけるオフセットニッキングの利用

非特異切断を抑制する方法として、DSB を導入する Cas9 に変異を導入し、一本鎖のみに切断を入れる Cas9 ニッカーゼを作成した。これと二本鎖のそれぞれの DNA 鎖に対する 2 種類の gRNA と共に注入して変異動物を作成できるかを調べた。本実験では約 1kb 離れた 2 か所を標的部位とし 4 種類の gRNA と Cas9 ニッカーゼを注入したところ、生まれた子の 100%に変異が入っており、83.3%は両部位間の 1kb が欠失していた(図 4)。

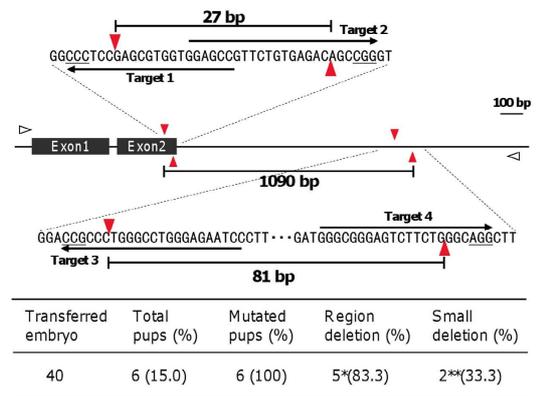


図 4

またこの Cas9 ニッカーゼを用いて Flag 配列を含む 120base の一本鎖オリゴ DNA を共注入することにより Flag タグを KI することにも成功し、その率は 80%であった(図 5)。

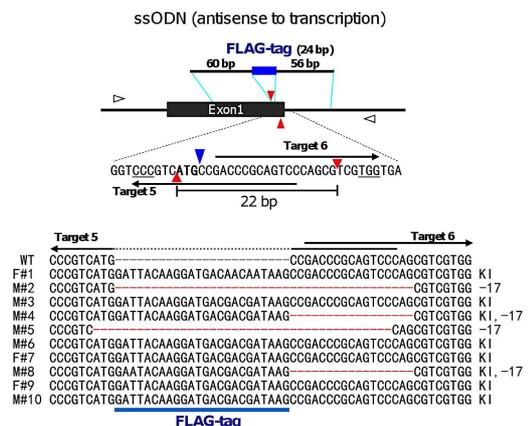


図 5

(4) CRISPR/Cas 系を用いた KI 導入遺伝子の形状の検討

上記の KI 動物作製でも示されている通り、マウス卵に対しドナー DNA として約 150 塩基の一本鎖 DNA を共注入することにより約 80%という高率で KI が起こることを確認した。しかし一般の遺伝子を KI する場合、PCR などで増幅されるドナー DNA は二本鎖であ

り、長さも数 kb に及ぶ。そこで、より長い DNA 挿入を目指し二本鎖 DNA を注入すると多くの卵が死滅すること、低濃度では生存するが KI が起こらなかった。

高濃度の二本鎖 DNA による発生停止のメカニズムについて DNA 損傷応答の面から検討し、前核期のヒストン H2AX リン酸化がこの時に顕著に上昇する一方、その下流である p53 や着床前胚の発生進行に重要な胚性ゲノム活性化に影響は認められなかった。以上より、二本鎖 DNA は受精卵に p53 を介さない DNA 損傷応答シグナルを活性化させることが示唆された。

次に、二本鎖 DNA の導入が胚発生を停止させないようにするため、ドナー DNA の形状を検討した。その結果、5' 末端を 20 塩基ほど突出させることにより胚発生の停止を解除でき、一本鎖 DNA に匹敵する変異導入効率を得られることを見出した。しかし本検討の二本鎖 DNA は 150bp と比較的短いものであり、より長いものの検討が必要である。

(5) CRISPR/Cas 系を用いた CKO 作成法の検討

転写に働く RNA ポリメラーゼ (RNA-P) には I、II、III の 3 種類があるが、組織特異性の高いプロモーターは RNA-P-II に対するもののみで I と III に対するものはほぼ全てが全身性である。RNA-P-II で合成された RNA はキャップ構造を持つため gRNA の発現には適さないため、CRISPR/Cas 系を用いて組織特異的な KO 動物を作成する場合、通常は RNA-P-III に対するプロモーターにより gRNA を全身性に発現させ、Cas9 のみを II に対する組織特異的なプロモーターを用いて発現させている。しかし、Cas9 のみを組織特異的に発現させた場合、目的の組織以外でも変異が入ることが多く、非特異的になりやすい。この点を改善目的で Cas9 と gRNA の両方を組織特異的に発現させる方法の開発を行った。

1 つの RNA-P-II 型プロモーターに Cas9 と gRNA をつなぎ同時に発現させた後にリボザイムを用いて gRNA を切り出すという方法を検討した。そのためリボザイムの遺伝子で gRNA を挟み IRES を介して Cas9 遺伝子をつないだ構造のベクターを構築した。これを細胞に導入し、単一の RNA-P-II 型プロモーターから機能的な Cas9 と gRNA の発現を確認した。今回は全身性の RNA-P-II 型プロモーターを用いたが、いずれ組織特異的なプロモーターを用いれば CKO 動物が作成できるはずである。しかし、今回のリボザイムを用いた方法では変異導入効率が 5% 程度と低く改善が必要である。

(6) SP 由来以外の CRISPR/Cas 系の利用

CRISPR/Cas 系において Cas9 が gRNA に結合するためには標的配列の近くに PAM 配列と呼ばれる特定の配列が必要である。

CRISPR/Cas 系は細菌や古細菌がウイルスの感染を防御するための適応免疫系であり、一般に用いられる *Streptococcus Pyogenes* (SP) 以外にも PAM 配列の異なる多くの種類の CRISPR/Cas 系が存在する。SP が用いられるのは PAM 配列が 5'-NGG と簡単で短いため標的配列の制約が少ないためであろう。しかし標的配列によっては他の PAM の方が適している場合もあり、PAM 配列の異なる CRISPR/Cas 系の有効性について検討することは有意義である。

そこで、培養細胞でゲノム改変に使用可能と報告されている *S. Thermophilus*-1 (ST1) のものが受精卵を用いた KO および KI マウスの作製に応用できるか検討した。その結果、変異導入が 92%、KI が 46% と SP 同等の高率にゲノム編集が可能であることを示した (図 6)。

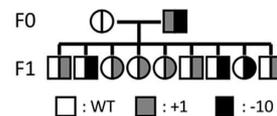
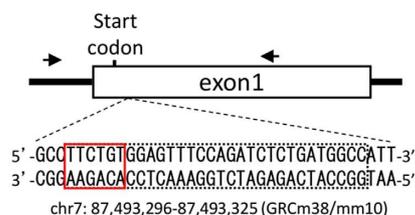


図6

また、*Campylobacter jejuni* (Cj) 由来の CRISPR/Cas 系の PAM 配列を検討し、5'-NNNVRYAC では 80% 前後の変異率が得られるが、これまで PAM として使用可能と報告されている 5'-NNNNACA、5'-NNNNRYAC、5'-NNNVRYM では変異が導入できないことを示し、Cj 由来 CRISPR/Cas 系の使用を可能にした。

(7) 人工ヌクレアーゼのブタ卵への応用

家畜卵としてブタ卵を用い、未受精卵に CRISPR/Cas を作用させると 2 細胞期までに約半分の卵に遺伝子破壊を起せることが明らかとなった。さらに、これまで報告の無い減数分裂過程の未成熟卵に作用させると 48 時間後の第 2 減数分裂中期卵の約 80% と、初期発生過程より効率的に遺伝子破壊が可能であることを見出した。これに対し核膜が存在する GVBD 以前の卵では変異が全く導入できなかった。この原因を検討した結果、未成熟卵の核膜において大分子の核外輸送に関与するエクスポーチン (XPO)1 の特異的阻害剤であるレプトマイシン B を処理すると Cas9 の核内濃度が上昇し GVBD 以前でも遺伝子破壊が起こるようになった (図 7)。

ブタ卵に対する検討では、GV 特有の DNA 形状やゲノム状態が変異導入に及ぼす影響についても解析した。その結果、卵 (4n) の

変異導入アレル数は 62%が 1 本、35%が 2 本と少なかった。これが減数分裂特異的かは確定できないが、成熟過程に導入された変異が必ずしも次世代へ反映されないことが示唆された。LMB 処理 GV 期卵では MII 期卵に比べて長い indel が導入される傾向があり、脱凝縮した染色体は凝縮したものより大きな欠失が起こり易いと考えられた。

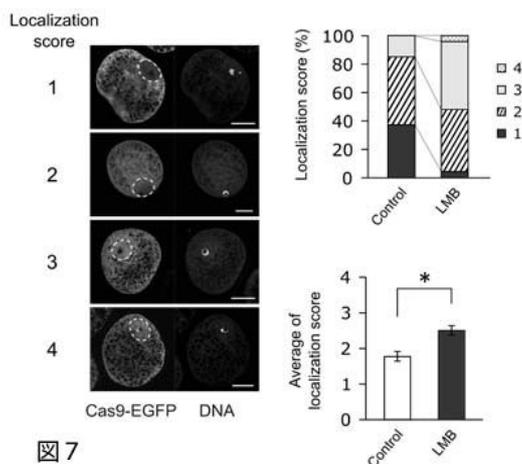


図 7

(8) 人工ヌクレアーゼの魚類卵への応用

魚類卵に対しては人工ヌクレアーゼとして ZFN と CRISPR/Cas 系を検討した。ZFN をゼブラフィッシュ 1 細胞期胚に作用させた結果、高濃度では胚が死滅してしまうが 10 ng/ul では生存胚が存在した。しかし、変異が導入された胚はその約 10% であり CRISPR/Cas 系と比較すると低率であった。

次に CRISPR/Cas システムを用いてヤマメ、ニジマス、ヒメマス卵への変異導入を試みた。その結果、稚魚各 8 尾の変異解析の結果、ヤマメでは 6 尾、ニジマスでは 7 尾、ヒメマスでは 6 尾で変異が認められ、ニジマス 7 尾における変異アレルの出現頻度は、3.1% から 23.3% であった。また、これらの変異は、7 あるいは 8 塩基の欠損、1 塩基の挿入および 1 塩基の置換であった。さらに、ヤマメとニジマスの雄親に由来する F1 個体を解析した結果、ヤマメ 2 尾に由来する F1 の 6.8% と 13.3% の個体が、またニジマス 2 尾に由来する F1 の 1.7% と 3.9% の個体がヘテロ変異体であり、これら同士を交配した F2 では約 1/4 がノックアウト(KO)個体であった。したがって低率だが魚卵にも CRISPR/Cas 系は有効で、変異は次世代に受け継がれることが示された。

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 12 件)

Ooga M, Fuyana S, Hashioka Y, Fujii W, Naito K, Suzuki MG, Aoki F. Chd9 mediates highly loosened chromatin structure in growing mouse oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2018, 500: 583-588.

Fujii W, Ikeda A, Sugiura K, Naito K. Efficient generation of genome-modified mice using *Campylobacter jejuni*-derived CRISPR/Cas. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 2286.

Li Q, Fujii W, Naito K, Yoshizaki G. Application of dead end-knockout zebrafish to recipients of germ cell transplantation. *Mol Reprod Dev*, 2017, 84: 1100-1111.

Onuma A, Fujii W, Sugiura K, Naito K. Efficient mutagenesis by CRISPR/Cas system during meiotic maturation of porcine oocytes. *J Reprod Dev*, 2017, 63: 45-50.

Fujii W, Kakuta S, Yoshioka S, Kyuwa S, Sugiura K, Naito K. Zygote-mediated generation of genome-modified mice using *Streptococcus thermophilus* 1-derived CRISPR/Cas system. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 477: 473-476.

Fujii W, Onuma A, Yoshioka S, Nagashima K, Sugiura K, Naito K. Finding of a highly efficient ZFN pair for *Aqprp* gene functioning in murine zygotes. *J Reprod Dev*, 2015, 61: 589-593.

Yoshioka S, Fujii W, Ogawa T, Sugiura K, Naito K. Development of a monopromoter-driven CRISPR/Cas9 system in mammalian cells. *Scientific Reports*, 2015, 5: 18341.

Nakamura K, Fujii W, Tsuboi M, Tanihata J, Teramoto N, Takeuchi S, Naito K, Yamanouchi K, Nishihara M. Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. *Scientific Reports*, 2014, 4:5635.

Fujii W, Onuma A, Sugiura K, Naito K. One-step generation of phenotype-expressing triple-knockout mice with heritable mutated alleles by the CRISPR/Cas9 system. *J Reprod Dev*, 2014, 60:324-327.

Fujii W, Onuma A, Sugiura K, Naito K. Efficient generation of genome-modified mice via offset-nicking by CRISPR/Cas system. *Biochem Biophys Res Commun* 2014, 445: 791-794.

Fujii W, Kawasaki K, Sugiura K, Naito K. Efficient generation of large-scale genome-modified-mice using gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucleic Acids Res* 2013, 41, e187.

Fujii W, Kano K, Sugiura K, Naito K. Repeatable Construction Method for Engineered Zinc Finger Nuclease Based on Overlap Extension PCR and TA-cloning. PLoS One 2013, 8: e59801.

〔学会発表〕(計 13 件)

藤原亮・片山直人・藤井 渉・内藤邦彦・吉崎悟朗、生殖細胞欠損ニジマスの作出とその代理親魚への応用、平成 30 年度公益社団法人日本水産学会春季大会 (2018)

藤井 渉・池田有沙・杉浦幸二・内藤邦彦、C. jejuni 由来 CRISPR/Cas によるゲノム改変マウスの作製、第 123 回日本畜産学会 (2017)

藤原 亮・片山直人・藤井 渉・内藤邦彦・吉崎悟朗、生殖細胞欠損ヤマメの作出とその代理親魚への応用、平成 29 年度公益社団法人日本水産学会春季大会 (2017)

Ooga M, Fujii W, Naito K, Aoki F. Involvement of Chd9 in highly loosened chromatin structure in growing oocytes. International Symposium on “Epigenome Dynamics and Regulation in Germ Cells” (2016)

藤井 渉・杉浦幸二・内藤邦彦、CRISPR/Cas システムを利用したゲノム改変マウス作製法の開発、第 16 回日本動物遺伝育種学会 (2015)

角田 茂・藤井 渉・小川 哲弘・坂西 俊太・内藤 邦彦・久和 茂、ゲノム編集法による解析ツールとしての疾患モデルマウス作製の取り組み、第 10 回遺伝子栄養学研究会 (2015)

永島圭介・藤井 渉・杉浦幸二・内藤邦彦、ドナー DNA の状態が CRISPR/Cas を用いたマウス前核期卵へのノックインに及ぼす影響、第 119 回日本畜産学会 (2015)

片山直人・定家咲子・矢澤良輔・藤井 渉・内藤邦彦・吉崎悟朗：生殖細胞欠損サケ科魚類の大量生産を目指した dead end 遺伝子のゲノム編集、第 17 回マリンバイオテクノロジー学会 (2015)

Nakamura K, Fujii W, Tsuboi M, Tanihata J, Teramoto N, Takeuchi S, Naito K, Yamanouchi K, Nishihara M. Generation of Dystrophinmutated rats with a CRISPR/Cas system as a new animal model of muscular dystrophy. 2014 FASEB Science Research Conferences. (2014)

Li Q・Fujii W・Naito K・Yoshizaki G、

Knockout of dead end gene using zinc finger nuclease in zebrafish、平成 26 年度日本水産学会秋季大会 (2014)

小沼あすか・藤井 渉・杉浦幸二・内藤邦彦、CRISPR/Cas システムを用いたブタ卵成熟過程におけるゲノム改変効率の検討、第 107 回日本繁殖生物学会 (2014)

藤井 渉・小沼あすか・杉浦幸二・内藤邦彦、オフセットニックング法によるゲノム改変マウスの作製、第 118 回日本畜産学会 (2014)

藤井 渉・川崎 紅・杉浦幸二・内藤邦彦、最適化された CAS9/gRNA システムによるゲノム改変マウスの作製、第 106 回日本繁殖生物学会 (2013)

〔図書〕(計 2 件)

内藤邦彦、遺伝子ノックアウト動物の作製、佐藤英明、河野友宏、内藤邦彦、小倉淳郎編、哺乳動物の発生工学、朝倉書店、118-132、(2014)

内藤邦彦、生殖腺の性分化のメカニズム；日本卵子学会編、生殖補助医療(ART) - 胚培養の理論と実際、近代出版、37-43、(2017)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 邦彦 (Naito Kunihiko)
東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号：20188858

(3) 連携研究者

吉崎 悟朗 (Yoshizaki Goro)
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授
研究者番号：70281003

菊地 和弘 (Kikuchi Kazuhiro)
独立行政法人農業生物資源研究所・動物科学
研究領域・上級研究員
研究者番号：20360456

杉浦 幸二 (Sugiura Koji)
東京大学・農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：20595623