

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550029

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いた人工転写因子作成によるp21遺伝子の転写制御系の確立

研究課題名(英文) Establishing a transcriptional regulation system of the p21 gene by artificial transcription factors using genomic editing technique

研究代表者

藤原 智子(石川智子)(Fujiwara, Tomoko)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70402922

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文): 近年、TALENs、CRISPRといったゲノム編集技術が注目されている。いずれも標的とするDNA配列への特異的な結合反応を利用した配列特異的DNA二重鎖切断導入システムによる変異導入系である。本研究では、DNA切断活性を転写制御活性に置き換えた人工転写因子を作成し、特定遺伝子の転写を制御できる系をメダカにおいて確立する事を目指した。DNA切断活性を失活させた変異Cas9と転写活性化因子VP64とのキメラ蛋白がメダカ細胞内で人工転写因子として機能することが、 β -actin遺伝子のプロモーター領域を用いて確認できた。更に、p21の上流領域においても人工転写因子による制御が可能であることが確認できた。

研究成果の概要(英文): Recently genome editing techniques such as TALENs and CRISPR has been reported as attractive novel gene targeting method. Both methods include sequence specific DNA binding, and subsequent introduction of DNA double strand break in vicinity of the binding site. In this study, we tried to establish a transcriptional regulation system in Medaka. We generated the Artificial Transcription Factor (ATF) by replacing the DNA cleavage activity with the transcriptional regulation activity. For this purpose we established in vitro transcription regulation system in β -actin and p21 genes. guideRNA were designed at several positions of upstream in each gene. These gRNA and nuclease-null Cas9 construct which tethering transcriptional activation domain include were introduced in medaka cells, and these transcriptional activation activity were detected as luciferase reporter activity. We detected gRNA mediated transcriptional activity in β -actin and p21 gene by this ATF system.

研究分野: 放射線・化学物質影響化学

キーワード: メダカ ゲノム編集技術 転写制御 p21 放射線 損傷応答

1. 研究開始当初の背景

遺伝子機能解析において、遺伝子発現オン・オフの制御系は極めて重要なツールである。よく用いられている制御系としては、テトラサイクリン(TetR)、タモキシフェン(ERT2)による遺伝子発現誘導系がある。これ等の系はいずれも標的遺伝子の上流、あるいはイントロン内に制御エレメントを挿入する必要がある。極めて煩雑な操作が必要であるだけでなく、個体レベルでの解析を行うとした場合 ES 細胞によるノックインを利用できるマウス以外での実用は困難である。最近、ゲノム DNA 配列を認識し、結合するタンパク質を設計・作成する技術が開発されてきた。この技術を用い特定遺伝子の転写オン・オフを制御できる人工転写因子が作成できるのではないかと考えた。

近年、人工ヌクレアーゼにより細胞内のゲノム DNA を直接 (in vivo で) 改変し、遺伝子機能解析を行う画期的な技術が開発されてきた。この手法は、「ゲノム編集 (Genome editing)」と呼ばれている。人工ヌクレアーゼとは、DNA に特異的に結合するドメインと、細菌の DNA 切断酵素の切断ドメインを連結させたキメラタンパク質であり、このヌクレアーゼによりゲノム DNA に二重鎖切断を導入する事が可能である。人工ヌクレアーゼとしては、Zinc Finger Nuclease:ZFN が既に 2000 年代初頭に開発されていたが、特異的塩基配列を認識する Zinc Finger の設計に経験と熟練を要する事から、それ程一般化しなかった。しかしながら最近、植物に感染するバクテリアのタンパク質 (Transcription Activator-like Effector) の機能解析から 33-34 アミノ酸で 1 塩基を認識できる DNA 結合ドメインが明らかにされ、これを用いた Transcription Activator-like Effector Nucleases:TALENs が開発された。TALENs の設計には ZFN のような経験を必要とせず、容易に作成できる事から、モデル生物に限らず興味深い生命現象を見せる多様な生物種に適用されつつある。本研究では、TALENs の「特異的塩基配列に結合するドメイン」を利用し、ヌクレアーゼドメインの代わりに転写制御ドメインを結合させた人工転写因子を作成する事により、メダカ個体における遺伝子発現制御系を構築する事を目指した。転写制御ドメインとしては、活性化用に HSV-VP16 を 4 回繰り返した VP64 ドメインを、抑制用にヒト KOX1 遺伝子の KRAB(Kruppel-associated box) repressor ドメインを用いることにした。また p21 遺伝子を標的遺伝子とした。p21 は DNA 損傷依存的に p53 により転写活性化される遺伝子であり、損傷応答経路の中核を構成している。P21 遺伝子の発現を自由にオン・オフする事により、これまで明らかにされている損傷応答シグナル経路の検証ができると同時に、個体 (体組織) レベルでの損傷応答解析の優れたモデル系が構築できることを期待した。

2. 研究の目的

近年、人工ヌクレアーゼ (ZFN, TALENs, CRISPR) を利用したゲノム編集技術が注目されている。人工ヌクレアーゼは、DNA に特異的に結合するドメインと、細菌の DNA 切断酵素の切断ドメインを連結させたキメラタンパク質であり、このヌクレアーゼによりゲノム DNA に二重鎖切断を導入する事が可能である。この二重鎖切断は、非相同末端結合により修復された場合、高頻度に当該遺伝子に突然変異が導入される為、新たな遺伝子ノックアウト手法として用いられている。本申請では、このキメラタンパク質のヌクレアーゼドメインを転写制御ドメインに置き換えた人工転写因子を作成し、特定遺伝子の転写オン・オフを制御できる系をメダカにおいて確立する事を目指した。本技術の標的遺伝子として p21 遺伝子を取りあげた。個体レベルでの損傷応答シグナル経路解析の優れたモデル系の構築につながる事が期待される。

3. 研究の方法

1) 人工転写因子コンストラクトの作成：
当初の予定では TALE-DNA 結合モジュールを利用して人工転写因子作製の予定だったが TALENs に引き続きゲノム編集技術として CRISPR/Cas9 が報告された (Mali P et al. Science. 2013 ;339(6121):823-6.)。この方法は細菌の獲得性免疫の機構を利用したもので、標的配列を持つ人工 RNA (guideRNA: gRNA) が標的配列の相補鎖に結合し、それを認識してヌクレアーゼである Cas9 が標的配列中に二重鎖切断を導入する。その後の反応は他の人工ヌクレアーゼ同様、二重鎖切断の修復の際に非相同末端結合が起こることにより欠失、挿入変異が高頻度に導入される。CRISPR の利点は gRNA 設計するうえでの制限が標的配列の 3'側に PAM 配列と呼ばれる NGG の 3 塩基が必要だけで設計上の自由度が高いこと、gRNA に標的配列のオリゴヌクレオチドを組み込むだけで遺伝子破壊の準備ができることで、他のゲノム編集技術、ZFN や TALEN のように設計上の制約が大きいなど作成手法が煩雑で無いことである。非常に簡便なうえ、同等の効果が得られることから、こちらのシステムを利用して人工転写因子の作成を行うことにした。

guide-RNA の設計・作成：CRISPR/Cas9 は gRNA 中の標的配列を入れ替えるだけで任意の遺伝子の変異体を得ることができる非常に簡便な手法である。gRNA の設計には NBRP Medaka の Search for CRISPR target site with micro-homology sequences (URL: [http:// viewer.shigen.info/cgi-bin/crispr/crispr.cgi](http://viewer.shigen.info/cgi-bin/crispr/crispr.cgi)) を利用し、設計された配列について同サイトの Pattern Match - CRISPR を使用して off target site を検索し出来るだけ標的配列特

異なる gRNA の設計を行った。

まず、人工転写因子の活性を確認するために、メダカのβ-actin (ActB)遺伝子の上流領域に gRNA を 4 か所設計した(図 1)。また、同じ人工転写因子でもレポーターに含まれる上流領域の長さによって転写活性に変化があるかどうかを見るために含まれる標的配列の異なる 4 種類のレポーターベクターを作製した(図 1)。レポーターとしてはルシフェラーゼ遺伝子を使用した。

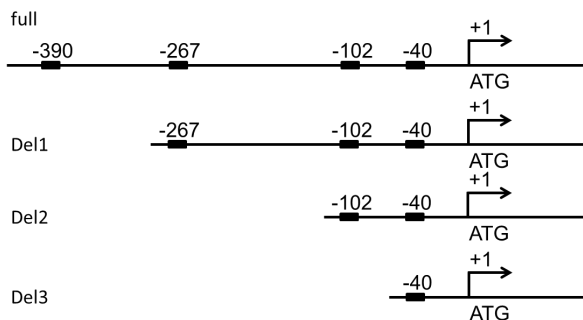


図1 メダカβ-actinレポーターコンストラクトと標的配列の設計

次に、転写調節の標的遺伝子である p21 遺伝子上流領域に標的配列の設計を行った。まず、メダカ p21 遺伝子上流領域の大まかな転写活性化領域を見るために、ATG の上流 10kb を含むレポーターを作製し、同領域に

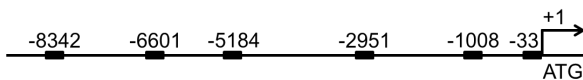


図2 メダカp21レポーターコンストラクトと標的配列の設計
対して 6 か所の gRNA を設計した(図 2)。

VP64 ドメインとヌクレアーゼ活性を失活させた Cas9 のキメラタンパクの発現ベクター(Mali p.et al.Nat Biotechnol. 2013 ;31(9): 833-8.)を addgene より購入し使用した。

4 . 研究成果

メダカ培養細胞において CRISPR システムを利用した人工転写因子の効果、β-actin の上流領域で確認した(図 3)。今回使用したβ-actin の上流領域はなるべく他の因子の影響を受けないよう、ATG の上流 400bp だけを使用した。この領域に対して 4 か所標的配列を設計し、標的配列の数を一つずつ減らす形で、4 つのレポーターコンストラクトを作製した。

図 3 の gRNA なしの結果に示すようにそれぞれのレポーターのプロモーター活性には大きな違いはなかった。各 gRNA を加えてみたところ full のレポーターでは-102 の gRNA で 1.5 倍の転写の活性化が見られた。逆に-40 の gRNA では 1/2 になった。Del1 のレポーターでは、-40 の gRNA で約 4 倍の強い転写活性化が見られた。Del2 のレポーターではいずれの gRNA でも活性化が見られなかった。Del4 のレポーターでは 1.5 倍の転写活性化が見られた(図 3)。

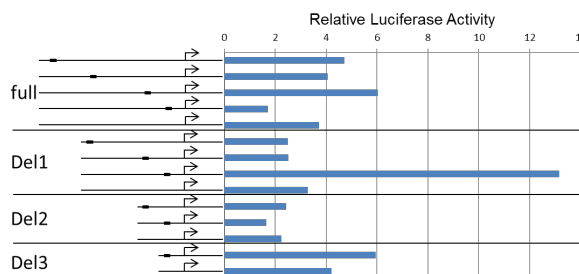


図3 メダカβ-actinプロモーターに対する各人工転写因子の作用

以上の結果より、CRISPR を利用した人工転写因子のシステムはメダカ培養細胞中でも機能することがわかった。また、レポーターに繋ぐ上流領域の長さによって各々の gRNA の効果が異なっており、転写活性化に影響のある配列の有無や、長さの違いによる高次構造の変化などが影響があることが考えられた。

次に、目的の p21 遺伝子上流領域で同様の解析を行った。まず、p21 遺伝子上流領域の大まかな転写活性化領域を見るために、ATG の上流 10kb を含むレポーターと同領域に対して 6 か所の gRNA 発現コンストラクトを作製した。各 gRNA を導入した結果、図 4 に示すように ATG に近い領域ほど高い転写活性化能を示す傾向があることがわかった。

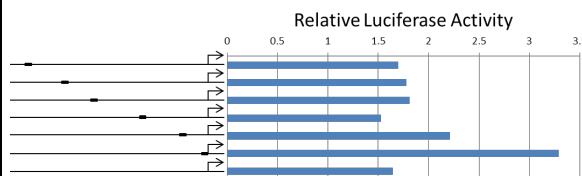


図4 メダカp21プロモーターに対する各人工転写因子の作用

以上の結果より、CRISPR を用いた人工転写因子のシステムでメダカ培養細胞中の遺伝子発現を制御することができることがわかった。

しかしながら、p21 上流領域における転写活性化は起こっているとはいえ弱く今後改善が必要とされる。p21 の上流領域に関してはマウスの先行研究でレポーターをゲノム内に組み込むことにより転写の活性化がより強く起こることが示されている(Nenoi M. et al. Exp Mol Med. 2006 Oct 31;38(5):553-64.)。最終的にメダカ個体内で内在性の p21 遺伝子の発現制御を行うためには、今後、p21 レポーターの stable transformant を作製して検討する必要がある。また、過去に報告されている Zinc Finger-人工転写因子においては転写開始点の上流 100-600 bp に存在する何らかの転写因子の結合配列に設定されているため、p21 でも p53 結合配列などに直接結合する gRNA を設計してみる必要がある。培養細胞におけるシステムが完成したら、個体内でヒートショックプロモーターを利用して転写活性化をオン・オフできる系を作製し、個体レベルでの損傷応答シグナル経路解

析のモデル系の構築につながることを期待している。

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 6件)

1. Murozumi N, Nakashima R, Hirai T, Kamei Y, Ishikawa-Fujiwara T, Todo T, Kitano T. Loss of follicle-stimulating hormone receptor function causes masculinization and suppression of ovarian development in genetically female medaka. **Endocrinology**. 2014 Aug;155(8):3136-45. doi: 10.1210/en.2013-2060. .

2. Oliveri P, Fortunato AE, Petrone L, Ishikawa-Fujiwara T, Kobayashi Y, Todo T, Antonova O, Arboleda E, Zantke J, Tessmar-Raible K, Falciatore A. The Cryptochrome/Photolyase Family in aquatic organisms. **Mar Genomics**. 2014 Apr; 14 :23-37. doi: 10.1016/j.margen.2014. 02.001.

3. Maruyama H, Yasui T, Ishikawa-Fujiwara T, Morii E, Yamamoto Y, Yoshii T, Takenaka Y, Nakahara S, Todo T, Hongyo T, Inohara H. Human papillomavirus and p53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma among Japanese population. **Cancer Sci**. 2014 Feb 13. doi: 10.1111/cas.12369.

4. Otozai S, Ishikawa-Fujiwara T, Oda S, Kamei Y, Ryo H, Sato A, Nomura T, Mitani H, Tsujimura T, Inohara H, Todo T. p53-Dependent suppression of genome instability in germ cells. **Mutat Res**. 2014 Feb;760:24-32. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.12.004.

5. Zantke J, Ishikawa-Fujiwara T, Arboleda E, Lohs C, Schipany K, Hallay N, Straw AD, Todo T, Tessmar-Raible K. Circadian and circalunar clock interactions in a marine annelid. **Cell Rep**. 2013 Oct 17;5(1):99- 113. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.031.

6. Ishikawa T, Okada T, Ishikawa-Fujiwara T, Todo T, Kamei Y, Shigenobu S, Tanaka M, Saito TL, Yoshimura J, Morishita S, Toyoda A, Sakaki Y, Taniguchi Y, Takeda S, Mori K. ATF6 α/β -mediated adjustment of ER chaperone levels is essential for development of the notochord in medaka fish. **Mol Biol Cell**. 2013 May;24(9):1387-1395. doi: 10.1091/mbc. E12-11-0830

[学会発表](計 22件)

1. Molecular mechanism of mutagenesis in Medaka fish Tomoko Ishikawa-Fujiwara,

Yoshihiro Fujikawa, Eri Shiraishi, Takeshi Todo International Symposium on Genome Science 2015 Expanding Frontiers of Genome Science II National Center of sciences Building Tokyo 2015.1.20-21

2. TALENs によるメダカにおける TLS ポリメラーゼ遺伝子群変異体の網羅的作製 藤川 芳宏、藤原(石川) 智子、佐久間 哲史、山本 卓、藤堂 剛 第57回日本放射線影響学会 かがしま県民交流センター 鹿児島県 2014.10-1-3

3. CRISPR/Cas9システムによるメダカ光回復酵素遺伝子変異体の樹立 藤原(石川) 智子、藤川 芳宏、藤堂 剛 第57回日本放射線影響学会 かがしま県民交流センター 鹿児島県 2014.10-1-3

4. メダカ生殖細胞における放射線誘発遺伝的不安定性の解析 藤原(石川) 智子、音在 信治、尾田 正二、三谷 啓志、猪原 秀典、藤堂 剛 第57回日本放射線影響学会 かがしま県民交流センター 鹿児島県 2014.10-1-3

5. Functional conversion of (6-4) photolyase and CPD photolyase Daichi Yamada, Junpei Yamamoto, Tomoko Ishikawa, Tomohiro Suzuki, I. M. Mahaputra Wijaya, Tatsuya Iwata, Elizabeth D. Getzoff, Takeshi Todo, Shigenori Iwai and Hideki Kandori 第52回日本生物物理学会年会 札幌コンベンションセンター 北海道 2014.9.25-27

6. 変異導入による(6-4)光回復酵素からCPD光回復酵素への機能転換 山田 大智、山元 淳平、.I. M. Mahaputra Wijaya、岩田 達也、鈴木智大、石川 智子、Elizabeth D. Getzoff、藤堂 剛、岩井 成憲、神取 秀樹 第18回日本光生物学協会年会 大阪市立大学学術情報総合センター 大阪府2014.8.22-23

7. ゲノム編集技術：CRISPR/Cas9システムによるメダカ光回復酵素遺伝子変異体の樹立 藤原(石川) 智子、藤川 芳宏、藤堂 剛 第18回日本光生物学協会年会 大阪市立大学学術情報総合センター 大阪府 2014.8.22-23

8. TALENsを利用した遺伝子破壊によるメダカの損傷乗り越えDNA合成ポリメラーゼ遺伝子変異体の作成 藤川 芳宏、藤原(石川) 智子、佐久間 哲史、山本 卓、藤堂 剛 第18回日本光生物学協会年会 大阪市立大学学術情報総合センター 大阪府 2014.8.22-23

9. CRISPR/Cas9システムによるメダカ光回復酵素遺伝子変異体の樹立 藤原(石川) 智子、藤川 芳宏、藤堂 剛 大阪大学大学院医学系研究科 第36回光医学光生物学学会 大阪大学医学部学友会館 大阪府 2014.7.25-26

10. メダカにおけるゲノム編集技術(TALENs)を用いた損傷乗り越えDNA合成ポリメラーゼ遺伝子群変異体の作製 藤川 芳宏、藤原(石川) 智子、佐久間 哲史、山本 卓、

藤堂 剛 第36回光医学光生物学会 大阪大学医学部学友会館 大阪府2014.7.25-26

11. メダカにおける人工ヌクレアーゼ (TALEN)を用いた損傷乗り越えポリメラーゼ変異体の作製 藤川芳宏、藤原(石川)智子、佐久間哲史、山本卓、藤堂剛 日本環境変異原学会第42回大会 岡山コンベンションセンター 岡山県 2013.11.29-30

12. Targeted Inactivation of Rev1 gene Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Kumi Nakamura, Yoshihiro Fujikawa, Takeshi Todo The 6th Asia and Oceania Conference on Photobiology Sydney Australia 2013.11.10-13

13. The molecular structure and damaged-DNA repair activity affected by the chromophore binding states in Cryptochrome-DASH from *Platynereis dumerili* Kazunori Zikihara, Kohei Kasakawa, Tomoko Ishikawa, Kristin Tessmar-Raible, Satoru Tokutomi, Takeshi Todo The 6th Asia and Oceania Conference on Photobiology Sydney Australia 2013.11.10-13

14. Targeted Inactivation of DNA photolyase family genes using CRISPR system Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Kumi Nakamura, Yoshihiro Fujikawa, Takeshi Todo The 6th Asia and Oceania Conference on Photobiology Sydney Australia 2013.11.10-13

15. DNA-PK 自己リン酸化異常時における p53 の DSB 修復経路選択への関わり 大西壽子、漆原 佑介、藤原 智子、尾田 正二、藤堂 剛、三谷 啓志 日本放射線影響学会第56回大会 ホテルクラウンパレス青森 青森県 2013.10.18-20

16. ゲノム編集技術 (CRISPR) を利用したメダカ光回復酵素遺伝子変異体の作製 藤原 石川 智子、藤川 芳宏、中村 公美、藤堂 剛 日本放射線影響学会第56回大会 ホテルクラウンパレス青森 青森県 2013.10.18-20

17. ゲノム編集技術 (TALEN) を用いたメダカにおける TLS ポリメラーゼ変異体の網羅的作製 藤川 芳宏、藤原(石川) 智子、中村 公美、佐久間 哲史、山本 卓、藤堂 剛 日本放射線影響学会第56回大会 ホテルクラウンパレス青森 青森県 2013.10.18-20

18. ゲノム編集技術 TALEN を用いた特異的欠損部位変異の作製方法の樹立; メダカ Rev1 BRCT ドメイン欠損変異体作製 中村 公美、藤原(石川) 智子、佐久間 哲史、山本 卓、藤堂 剛 日本放射線影響学会第56回大会 ホテルクラウンパレス青森 青森県 2013.10.18-20

19. Genome editing in medaka: targeted inactivation of TLS polymerase genes usingTALENs

Yoshihiro Fujikawa, Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Kumi Nakamura, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Takeshi Todo 19th Japanese medaka and Zebrafish Meeting Sendai City Information and industry Plaza Miyagi 2013.9.20-21

20. ATF6 / γ -mediated adjustment of ER chaperone levels is essential for development of the notochord in medaka fish Tokiro Ishikawa, Tetsuya Okada, Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Takeshi Todo, Yasuhiro Kamei, Shuji Shigenobu, Minoru Tanaka, Taro L. Saito, Jun Yoshimura, Shinichi Morishita, Atsushi Toyoda, Yoshiyuki Sakaki, Yoshihito Taniguchi, Shunichi Takeda, Kazutoshi Mori 19th Japanese medaka and Zebrafish Meeting Sendai City Information and industry Plaza Miyagi 2013.9.20-21

21. Genome editing in medaka: targeted inactivation of DNA photolyase family genes using CRISPR system Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Yoshihiro Fujikawa, Kumi Nakamura, Takeshi Todo 19th Japanese medaka and Zebrafish Meeting Sendai City Information and industry Plaza Miyagi 2013.9.20-21

22. Genome editing in medaka: targeted inactivation of *Rev1* gene by TALEN Kumi Nakamura, Yoshihiro Fujikawa, Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Takeshi Todo 19th Japanese medaka and Zebrafish Meeting Sendai City Information and industry Plaza Miyagi 2013.9.20-21

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤原 智子(石川 智子)(Fujiwara Tomoko)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70402922