

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650088

研究課題名(和文)TALENを用いたショウジョウバエにおける遺伝子ノックイン手法の開発

研究課題名(英文)Establishment of the efficient gene knock-in technique in the Drosophila genome

研究代表者

中村 輝(Nakamura, Akira)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：90323245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ポストゲノムプロジェクト時代におけるショウジョウバエ遺伝学を飛躍的に加速させる目的で、TALENならびにCRISPR/Cas9を利用したゲノム編集の手法開発を行った。その結果、標的遺伝子のノックアウトとともに、相同組み換えを利用した遺伝子ノックインも可能となった。ノックインの効率は数%から90%程度と標的部位により異なるが、既に7遺伝子座についてGFP遺伝子のノックインに成功しており、実用的な効率として遺伝子ノックインの手法が確立されたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To accelerate artificial manipulations of the Drosophila genome in the post-genome project era, we sought to establish genome editing methodologies in Drosophila using TALEN and CRISPR/Cas9 technologies. We have succeeded in establishing protocols for gene knockout as well as knock-in through homologous recombination. Although gene knock-in efficiencies were varied from a few percent to ~90%, depending on targets, we have already generated GFP knocked-in strains in seven different loci, indicating that the gene knock-in methodology in Drosophila has been practically established.

研究分野：発生生物学

キーワード：ショウジョウバエ TALEN CRISPR/Cas9 遺伝子ノックアウト ゲノム編集 相同組み換え

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエは遺伝学・発生生物学のモデル生物の中でも最も多様な解析手法が確立している。しかしながら、標的遺伝子に任意の改変を行うジーン・ターゲティングに関しては、Golic らの手法が報告されているが、複数のトランスジェニック系統間の煩雑な掛け合わせを必要とし、また効率も極めて低いことから、膨大な労力と時間を必要とする状況であった。このような背景から、より簡便で効率の良い遺伝子改変技術が確立されると、ポストゲノムプロジェクト時代におけるショウジョウバエ遺伝学を飛躍的に加速させる新たな技術となることが期待された。

TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) は植物感染細菌である *Xanthomonas* に由来する TALE の DNA 結合のリピートドメインと、2 量体を形成することで活性を持つ制限酵素 FokI のヌクレアーゼドメインとを融合させた人工タンパク質であり、指定された配列に特異的に結合して DNA 鎖を切断することができる。標的配列に対する TALEN ペアを細胞内で発現させることにより配列特異的に DNA に二重鎖切断を誘導し、その修復過程で挿入あるいは欠失型の変異 (indel) を引き起こすことが出来る。さらに、本研究開始とほぼ同じ時期になって、原核生物のバクテリアファージに対する防御機構である CRISPR/Cas (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats) システムを改変した、ゼブラフィッシュに対するゲノム編集技術が報告された。このような背景から、TALEN や CRISPR は、これまでマウスや酵母など限られた生物種においてのみ可能であった *in vivo* での標的遺伝子破壊を培養細胞から人に至るまでの広範囲の生物種・生物試料で可能にする新しい技術になると期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、TALEN 法を用いてショウジョウバエゲノム上の任意の標的遺伝子座に対する遺伝子破壊技術の確立を目指した。また、本研究開始とほぼ同時期に報告された CRISPR/Cas9 の系についてもショウジョウバエ実験系への導入を検討した。さらに、TALEN あるいは CRISPR/Cas9 システムによって生じた DNA 二本鎖切断を相同組み換えによって修復させることにより GFP や GAL4 等外来のレポーター遺伝子をゲノムの任意の場所に挿入する遺伝子ノックイン手法の確立を目指した。

3. 研究の方法

研究開始時点において既に、ショウジョウバエにおいて TALEN が有効であることは確認できていたが、その効率は極めて低く、ショウジョウバエにおけるルーティンのゲノム編集技術として用いるには変異を誘発する

効率を上げる必要があると考えられた。そこで、本研究では、まず最初に、ショウジョウバエにおける TALEN の効率化を図った。次に、CRISPR/Cas9 技術をショウジョウバエに導入するため、各種発現ベクター・トランスジェニック系統を調達し、最も有用なシステムの構築を図った。さらに、TALEN 及び CRISPR/Cas9 によって DNA 二本鎖切断を引き起こした後に相同組み換えによって外来遺伝子を標的部位にノックインする手法の確立を行った。

(1) ショウジョウバエゲノム編集における TALEN の効率化

TALEN の効率化のために Addgene 社より購入したオリジナルの Golden TALEN の構造を改変した。ゼブラフィッシュで TALEN 手法を精力的に進めているユタ大学星島博士より TALE 領域の DNA 結合ドメインを除く N 末、C 末側を欠失させると *in vivo* における活性が劇的に向上するとの情報を得た (Dahlem et al. 2012)。そこで、星島博士よりゼブラフィッシュへの TALEN mRNA インジェクションを目的に作成されたプラスミドの分与を受け、このプラスミドを出発点としてショウジョウバエにおける効率を検討した。また、星島博士より、FokI エンドヌクレアーゼドメインについても 2 量体形成の効率を引き上げる突然変異を導入することによって標的切断の特異性と効率が改善するとの情報も得た (Hu et al. 2013)。そこで、このような 2 量体形成能改善による標的遺伝子の突然変異誘導への効率化についても検討を行った。

作成した TALEN mRNA を発現するプラスミドより、キャップアナログ (me7GpppG) 存在下での *in vitro* transcription と Poly (A) ポリメラーゼによるポリアダニル化によって mRNA を合成した。mRNA を精製後、TALEN ペア mRNA をショウジョウバエ初期胚の後極細胞質領域に顕微注射した。顕微注射した F0 胚は成虫まで発生させた。F0 ゲノム中において、突然変異はモザイクに存在していることから、F0 成虫をバランサーストックのハエと交尾させ、F1 世代で突然変異の有無を検討した。具体的には、まず 5~10 匹程度の F1 個体よりゲノム DNA を抽出し、標的部位を含んだ 500 bp 程度の領域を PCR により増幅した。次に、PCR 産物を 1 本鎖に解離後に再アニールさせた。この DNA 断片を T7 エンドヌクレアーゼ I で処理することにより、標的部位に indel が存在した断片を分解した後、切断断片を生じる個体群をアガロースゲル電気泳動により同定した (T7EI アッセイ; Reyon et al. 2012)。次に、切断断片が確認できた F1 個体群に由来する飼育バイアルより、ハエを 1 匹ずつバランサーストックと交配させ、十分な F2 幼虫を得た後、ハエ 1 個体よりゲノム DNA を抽出して PCR および T7EI アッセイを行い、indel を持つ F1 個体を同定した。さらに、PCR 断片を精製し、DNA シークエンスにより突然変異の配列を決定した。

(2) ショウジョウバエゲノム編集における CRISPR/Cas9 システムの検討

CRISPR/Cas9 システムについては、始めに国立遺伝学研究所・近藤周博士の開発した手法 (Kondo and Ueda 2013) を検討した。具体的には、U6 プロモーター制御下で sgRNA を発現するプラスミド (pBFv-U6.2) に標的配列を挿入後、トランスジェニック系統を作成した。そして、*nanos* プロモーター制御下で Cas9 を発現する系統 (*nanos*-Cas9) と掛け合わせるにより、生殖細胞で Cas9 と sgRNA とを共発現させ、標的部位への DNA 切断と修復時の indel を誘導した。Indel の検出には TALEN と同じく T7E1 アッセイを用い、最終的に PCR 断片を DNA シークエンスすることにより配列決定を行った。次に pBFv-U6.2 プラスミドを *nanos*-Cas9 システム由来の胚に直接顕微注射することにより indel を誘導できるかについて検討した。さらに、U6-sgRNA と共に *hsp70* プロモーター制御下で Cas9 を発現するプラスミド (pDCC6; Gokcezade et al. 2014) を用いて *y w* 等 sgRNA や Cas9 のトランスジェニック系統ではない胚に顕微注射して indel を得ることができるのかについて検討を行った。

(3) CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子ノックイン手法の開発

TALEN 及び CRISPR/Cas9 による標的部位への indel 挿入が可能となった後、GFP や GAL4 等の DNA 配列を相同組み換えにより標的部位に挿入するノックイン技術の開発を進めた。まず、外来 DNA 断片が挿入されたことが容易に判別できるように、幼虫の脳及び成虫の眼で赤色蛍光タンパク質が発現する 3xP3-RFP をマーカーに用いてノックイン現象の有無について検討を行った。さらに、様々な遺伝子座に対して GFP をノックインして、ゲノムの標的遺伝子部位で正確に GFP 配列が挿入され、GFP 融合タンパク質を発現する個体の作出を進めた。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエゲノム編集における TALEN の効率化

TALEN による遺伝子ノックアウトの標的として、研究室で解析を進めつつある膜輸送因子 Exocyst の構成因子の一つ *exo84* を選択した。*exo84* のエクソン配列に対して TALEN 標的部位を検索した結果をもとにして、3カ所の標的部位を検討することとした。Golden Gate 法により TALE 領域の配列を組み上げ、FokI ドメインの 2 量体形成効率を改善した pCS2TAL3-DDD および RRR プラスミド上で TALEN コンストラクトを作成した。これらプラスミドを鋳型として mRNA を合成し、*y w* 胚に 1 µg/µl の濃度で顕微注射した。F0 幼虫 4 匹よりゲノム DNA を抽出して標的部位をクローニングしてシークエンスした結果、3カ所

の標的のうち 2カ所において 19~38%の効率で indel が検出された。Indel の長さは 3 bp 程度から 17 bp 欠失まで広い範囲にわたっており、翻訳の読み枠がずれた突然変異を引き起こすクローンも検出された。

次に FokI ドメインの 2 量体形成効率に対して indel を生じる効率との相関を検討したところ、FokI-DDD/RRR ペアとホモダイマーを形成する野生型との間では顕著な差は認められなかった (DDD/RRR ペア 7 indels/15 クローンに対して野生型ペア 7 indels/14 クローン)。一方、DDD/RRR ペアはヘテロダイマーのみを形成することから、標的配列に対する特異性がより高まっていると予想される。このことから、以後の実験でも DDD/RRR のペアで実験を進めることにした。

さらに、本手法が様々な遺伝子座に対して有効であるのかについて検討を進めるために、*sec8*, *CCh2* *receptpr* (*CCh2-R*) 他 3 遺伝子に対して遺伝子ノックアウト系統の作成を試みた。その際、より効率良く indel を検出するために T7E1 アッセイ法を確立した (図 1)。確立した T7E1 法の条件は以下のようになる。

- ・ 標的部位を挟んで 500 bp 程度を PCR 増幅
- ・ 94 °C 5 分処理後 25 °C までの徐冷により 1 本鎖への解離と再アニールにより野生型鎖と indel 鎖との hetero-duplex を形成させる。
- ・ T7E1 を 1U/10 µl の反応スケールで加え、37 °C で 60 分処理。
- ・ 2%アガロース電気泳動により分解産物を検出する。

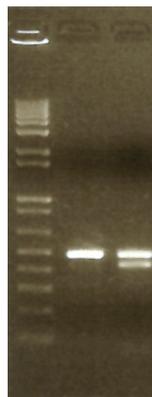


図 1 : 野生型のみ (左レーン) および野生型と indel を持つ変異鎖との hetero-duplex を T7E1 アッセイを行ったアガロースゲル電気泳動写真

T7E1 アッセイと DNA シークエンスの結果、*CCh2-R* および他 3 遺伝子において欠失変異体が作成された。一方、*sec8* に対しては 2カ所の標的部位を設定したがどちらの TALEN ペアからも indel を得ることはできなかった。

以上の結果から、TALEN は TALE ドメインの一部欠失によって高活性型に改変された結果、ショウジョウバエにおいても実用可能なレベルで機能すること、indel 導入効率は標的部位の配列に依存すること、が明確となった。体系的にどのような配列が効率良く切断されるのかについては不明であるが、今回の実験から標的遺伝子に対して 3~4カ所の切断部位を設定することで、高い確率で indel

による突然変異体を得ることが可能であると予想された。

(2) ショウジョウバエゲノム編集における CRISPR/Cas9 システムの検討

CRISPR/Cas9 によってショウジョウバエゲノム編集が効率良く引き起こされるかについて検討するために、*sec8* 遺伝子を標的とした。TALEN のノックアウト効率は標的の配列に大きく依存したことから、CRISPR/Cas9 についても同様の傾向があるのかを検討するため、複数の部位を標的として設定した。*sec8* 遺伝子のエクソン配列に対して4カ所の sgRNA 領域をデザインし、sgRNA 発現システムを作成した。これらシステムを *nanos*-Cas9 システムと掛け合わせた結果、全ての sgRNA から高効率で indel システムが選別された。興味深いことに、30 ラインについて PCR 断片を DNA シークエンスした結果、全ての indel が独立の異なった変異であることが判明した。すなわち、CRISPR/Cas9 システムはショウジョウバエにおいて極めて効率良く機能し、配列特異性も比較的低いことが明らかとなった。

次に、トランスジェニックシステムの作成なしに CRISPR/Cas9 システムが効率良く機能するのかについて検討した。まず、pBFv-U6.2 で作成した sgRNA 発現プラスミドを *nanos*-Cas9 由来の胚に顕微注射して検討した。その結果、indel の出現効率はトランスジェニックシステムを作成した場合に比べて低下するものの、十分実用的な効率で機能することがわかった。

さらに、U6-sgRNA と *hsp70* プロモーター制御下で Cas9 を発現するプラスミド (pDCC6) を用いて、CRISPR/Cas9 システムを検討した。*yw* 胚に顕微注射した結果、十分実用的な効率で indel を引き起こすことが判明した。すなわち、pDCC6 をもとにした実験系を使うことにより、任意のショウジョウバエ系統のバックグラウンドで効率良く遺伝子ノックアウトすることが可能となった。

(3) CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子ノックイン手法の開発

CRISPR/Cas9 システムは TALEN よりも配列依存性が低いと考えられたので、CRISPR/Cas9 のシステム下で遺伝子ノックインが可能であるのかについて検討した。まず、標的部位への indel 誘導活性が確認できている *sec8* 遺伝子座へのノックインを検討した。具体的には標的切断部位の 5' 側と 3' 側各々約 1 kb のゲノム領域を PCR により増幅し、それら DNA 断片の間に成虫の眼で RFP を発現する 3xP3-RFP カセットを挿入したノックインベクターを作成した。そして、U6-sgRNA と *nanos*-Cas9 とを共に発現する雌由来の胚に顕微注射した。その結果、効率は約 1% 程度ながら眼で RFP が発現する系統を得ることができた。さらに、PCR 解析により、標的領域に 3xP3-RFP の遺伝子カセットが正確にノックインされていることを確認した。

次に、標的遺伝子のコーディング配列 (CDS) の末端に GFP の CDS を翻訳読み枠を合わせて挿入することが可能であるかを検討した。始めに、*mei-P26* 遺伝子について CDS の 5' 端近傍に sgRNA 配列を設定し、トランスジェニックシステムを作成した。そして N 末端側に GFP が挿入されるようにデザインしたノックインベクターを作成して顕微注射を行った。ノックイン領域周辺の配列と GFP 遺伝子内に PCR プライマーを設定し、F1 個体についてノックインシステムをスクリーニングした。その結果、正確に GFP 遺伝子が挿入されたノックインシステムが作出できた。GFP の発現パターンを検討した結果、論文発表されている抗 *Mei-P26* 抗体を用いた発現パターンと酷似していた。

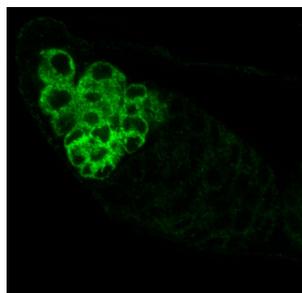


図 2 : 卵巣先端部における GFP::Mei-P26 タンパク質の発現

さらに、他の遺伝子についても GFP のノックインを試みた。現在までに、*mei-P26* を含めて 7 遺伝子について GFP ノックインシステムの作出に成功した (図 3, 図 4)。GFP ノックインの効率は、数%程度のものから 90%ぐらいのものまで様々であったが、F1 個体を複数まとめて PCR 解析した後、1 個体ゲノムの PCR によるスクリーニングを進めることにより、数%程度のノックイン効率の場合には確実にノックインシステムを回収可能であった。

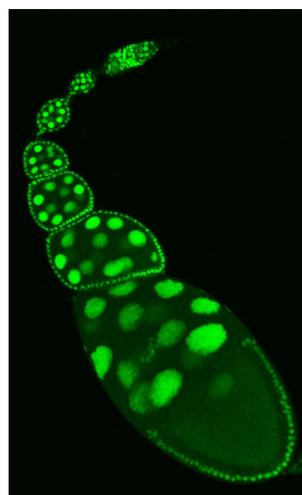


図 3 : 卵巣における GFP::Piwi の発現

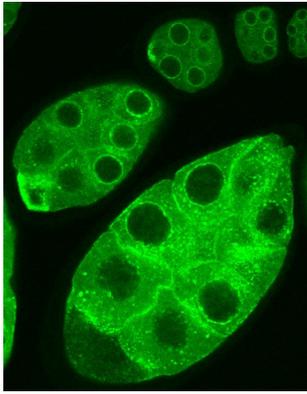


図 4: 卵巣における Bruno::GFP の発現

以上、当初の目的であった遺伝子ノックインの手法は確立出来たと考えられる。

<引用文献>

Dahlem, T. J., Hoshijima, K., Juryne, M. J., Gunther, D., Starker, C. G., Locke, A. S., Weis, A. M., Voytas, D. F., and Grunwald, D. J. (2012) Simple methods for generating and detecting locus-specific mutations induced with TALENs in the zebrafish genome. *PLoS Genet.* 8, e1002861.

Gokcezade, J., Sienski, G., and Duchek, P. (2014) Efficient CRISPR/Cas9 plasmids for rapid and versatile genome editing in *Drosophila*. *G3* 4, 2279-2282.

Hu, R., Wallace, J., Dahlem, T. J., Grunwald, D. J., and O'Connell, R. M. (2013) Targeting human microRNA genes using engineered Tal-effector nucleases (TALENs). *PLoS ONE* 8, e63074.

Kondo, S. and Ueda, R. (2013) Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics* 195, 715-721.

Reyon, D., Tsai, S. Q., Khayter, C., Foden, J. A., Sander, J. D. and Joung, J. K. (2012) FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat. Biotech.* 30, 460-465.

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3件)

Tsai, Y. C., Chang, W., Liou, W., Lee, W. H., Chang, Y. W., Wang, P. Y., Tanaka, T., Nakamura, A. and Pai, L. M. (2014) Endophilin B is required for the *Drosophila* oocyte to endocytose yolk downstream of Oskar. *Development* 査読有 141, 563-573. doi:10.1242/dev.097022

Kim, G., Pai, C.-I., Sato, K., Person, M. D., Nakamura, A. and Macdonald, P. M. (2015).

Region-specific activation of *oskar* mRNA translation by inhibition of Bruno-mediated repression. *PLoS Genet.* 査読有 11, e1004992.

doi:10.1371/journal.pgen.1004992

Sano, H., Nakamura, A., Texada, M., Truman, J. W., Ishimoto, H., Kamikouchi, A., Nibu, Y., Kume, K., Ida, T. and Kojima, M. The nutrient-responsive hormone CCHamide-2 controls growth by regulating insulin-like peptides in the brain of *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 査読有 In press.

<http://journals.plos.org/plosgenetics/>

[学会発表](計3件)

Nakamura, A. Spatio-temporal regulation of *oskar* RNA localization and translation by the conserved P-body component, Edc3 (招待講演) The 10th biennial conference on "Intracellular RNA localization and Localized Translation" 2013.7.7~7.12, Queen's Landing Hotel, Niagara-on-the Lake (Canada)

中村 輝、生殖細胞形成における RNA 制御 (招待講演) RNA フロンティアミーティング、2013.9.3、ラフォーレ修善寺(伊豆市)

田中 翼 他、ショウジョウバエ長鎖 dsRNA を介した RNAi 誘導における小胞型 H⁺/Cl⁻ 交換輸送体 Clc-7 の役割、第 15 回日本 RNA 学会年会、2013.7.24~26、愛媛県民文化会館 (松山市)

[図書](計1件)

Scott F. Gilbert (阿形清和、高橋淑子 監訳) *メディカル・サイエンス・インターナショナル*、ギルバート発生生物学「ショウジョウバエ体軸形成の遺伝学」(翻訳) 2015, pp183-220.

[その他]

ホームページ等

http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/germline_development/

<https://www.facebook.com/NakamuraLabo>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 輝 (Akira Nakamura)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号: 90323245