

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290070

研究課題名(和文) ゲノム編集を利用した遺伝子ノックイン新技術の開発

研究課題名(英文) Development of a novel genome editing-mediated gene knock-in system

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロホモロジー媒介性末端結合(MMEJ)による新規の遺伝子ノックイン法であるPITCh法を確立した。PITCh法を用いて培養細胞および動物個体(カエルおよびマウス)へのレポーター遺伝子のノックインを行った結果、HR経路と比較して高効率でのノックインを確認し、さらに正確にノックインされていることをシーケンス解析によって確認した。さらに、MMEJを促進する因子を培養細胞を用いてスクリーニングし、Exonuclease I(ExoI)によってPITCh法によるノックインの効率上昇が確認された。さらに、マウスにおけるPITCh法によるノックインにおいてもExoIの効果が確認された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I established microhomology-mediated end-joining (MMEJ) dependent gene knock-in system that I termed precise integration into target chromosome (PITCh). I performed reporter gene knock-in experiments using PITCh system in cultured cells and animals such as frog and mice. As results, I observed efficient and precise gene knock-in by PITCh method compared with those achieved by HR-mediated gene knock-in. Additionally, I performed genetic screening of MMEJ enhancers and identified that PITCh efficiency upon Exonuclease I (ExoI) overexpression was increased to 2.5 fold compared with that upon mock overexpression. I also confirmed the effect of ExoI overexpression in endogenous gene locus in cultured cells and mouse zygote.

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

目的の遺伝子座へ外来DNAを挿入する遺伝子ノックイン技術は、大腸菌や酵母、多細胞生物ではマウスなど限られた生物やES細胞など幹細胞において利用できる技術である。これらの生物や細胞では、細胞内の相同組換え活性により外来遺伝子と標的遺伝子の置換を行い、標的遺伝子の不活性化やレポーター遺伝子の挿入ができるが、多くの動物では相同組換え活性が低いため、この方法で効率的に遺伝子改変生物を作製することはできない。そのため、多くの生物や細胞で利用可能な遺伝子改変技術の開発が待ち望まれていた。

近年、人工DNA切断酵素を用いたゲノム編集によって、遺伝子ノックアウトや遺伝子ノックインが可能となってきた(山本, 2013)。人工DNA切断酵素は、DNA結合ドメインに制限酵素FokIのDNA切断ドメインを連結させた人工酵素であり、標的遺伝子へ特異的に二本鎖DNA切断(DSB)を導入し、非同末端連結修復(NHEJ)経路での挿入・欠失変異の導入あるいは相同組換え(HR)経路で遺伝子挿入が可能である。DNA結合ドメインとしてZincフィンガーをもつZFNや植物細菌キサントモナスの転写因子TALEを利用したTALENなどの人工ヌクレアーゼの発現によって、二本鎖DNA切断(DSB)を誘導し、その修復過程において遺伝子を改変する。さらに最近、RNAをガイドとするCRISPR-Casシステムによる標的ゲノム編集技術も開発されている(Richter et al., 2013)。これらの技術を利用した遺伝子ノックアウトは多くの細胞や動物・植物で報告される一方、標的遺伝子への遺伝子ノックインについての成功例は少ない。この原因は、ゲノム編集を利用した遺伝子ノックイン方法も依然HRに依存し、HR活性の低い培養細胞や動物種ではノックインが困難なことによる。また、NHEJを利用したノックインも確立されているが、つなぎ目部分が不正確であり、外来遺伝子のノックインの方向性を選ぶことが困難であり、正確かつ効率的な遺伝子ノックイン法の開発が必要とされている。

ゲノム編集の基盤となる人工DNA切断酵素の開発は、欧米を中心に進んでいる。国内においてはゲノム編集コンソーシアム(平成28年4月に日本ゲノム編集学会となる)を拠点として、様々な生物(ショウジョウバエ、ウニ、ホヤ、ゼブラフィッシュ、カエル、マウス、ラットなど)において標的遺伝子破壊に成功している。さらに申請者は、これまでにウニ胚を用いたレポーター遺伝子の標的遺伝子座への挿入に成功している(Ochiai et al., 2012)が、様々な生物で利用可能な遺伝子ノックイン技術の開発は進んでいない。ノックイン技術が自在に使えるようになれば、マウスなどのモデル生物で必要とされる遺伝子ノックイン個体の作製時間を大幅に短縮できるだけでなく、レポーター遺伝子を用いた遺伝子

発現モニタリングが個体レベルで可能となり、ゲノム編集を介した革新的技術に発展すると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が開発してきた高活性型の人工DNA切断酵素Platinum TALENや汎用性の高いCRISPR-Cas9システムを用いて、様々な細胞や動物に利用可能な遺伝子ノックイン法を開発することを目的とする。ゲノム編集は、任意の配列を切断する人工DNA切断酵素を用いて標的遺伝子を切断し、その修復過程において遺伝子を改変する技術である。ゲノム編集によって様々な生物において標的遺伝子破壊が可能になる一方、標的配列へ正確に外来遺伝子を挿入する遺伝子ノックインは、HR活性が低い細胞や生物個体では現状では非常に成功率が低い。

そこで本研究では、HRやNHEJとは異なるDSB修復経路であるマイクロホモロジー媒介性末端結合(microhomology-mediated end-joining: MMEJ)を利用し、原理的に全ての細胞や生物において遺伝子ノックインの可能な新規の方法を開発する。本方法開発によって、レポーター遺伝子をゲノムの任意の領域に挿入できることが可能になれば、遺伝子発現をモニターする細胞や生物個体をワンステップで作製することが可能となる。また、本方法によって分化細胞の発現をモニターすることができれば、幹細胞からの細胞分化機能の解明に大きく寄与することが期待される。

3. 研究の方法

1) 培養細胞におけるMMEJを介した遺伝子ノックイン法の確立...ヒト培養細胞のFBL遺伝子座およびベータアクチン遺伝子座を標的としたPlatinum TALENを設計・作製した。また両遺伝子座の標的配列とほぼ同じ位置を切断するsgRNAとドナーベクターを切断するsgRNAを設計した。設計した複数のsgRNAとCas9を発現するベクターを構築した。さらに、DSB部位の両側のマイクロホモロジー配列を有するTALEN用およびCRISPR用のPITChドナーベクターを作製した。ドナーベクターはレポーター遺伝子としてmNeonGreen遺伝子を有するものを利用した。

作製した発現ベクターとPITChドナーベクターをヒトHEK293細胞へ形質転換し、蛍光が観察されるかどうかを確認した。さらに、蛍光が観察された細胞を増殖させ、ノックインの正確性をシーケンス解析によって調べた。

2) 動物個体におけるMMEJを介した遺伝子ノックイン法の確立...HEK293細胞においてレポーター遺伝子のノックインが観察された条件に従ってドナーベクターを構築し、Platinum TALEN mRNAおよびCRISPR-Cas9

の sgRNA および Cas9 mRNA を合成し、ウニおよびカエル、マウスの受精卵にこれらを共導入することによって動物個体での遺伝子ノックインが可能かどうかを調べた。さらに、ウニでは原腸胚期、カエルでは幼生、マウスの初期胚からゲノム DNA を抽出し、標的遺伝子座へレポーター遺伝子が挿入されているかどうかを、シーケンス解析を行うことによって確認した。

3) MMEJ 促進因子のスクリーニングと培養細胞と個体での効果...MMEJ によるノックインの効率を上昇させるため、MMEJ の促進因子のスクリーニングを行った。スクリーニングに利用するレポーターベクター (DSB が MMEJ によって修復されるとレポーター遺伝子の機能が回復する) を構築した。このレポーターシステムを利用して、DSB 修復に関連する候補の遺伝子の発現ベクターを構築し、培養細胞での MMEJ 促進効果を調べた。さらに、効果の見られた因子について、マウス受精卵にこの因子の mRNA を共導入することによる促進効果の有無を調べた。

4. 研究成果

1) TALEN および CRISPR-Cas9 を利用した培養細胞での効率的なノックイン法(PITCh 法)の確立

Platinum TALEN を用いてベータアクチン遺伝子座およびフィブリリン遺伝子座へのレポーター-mNeonGreen 遺伝子の導入が確認され、それぞれの遺伝子産物の局在に一致したレポーター蛍光が観察された。これらの細胞をクローン化し、正確にノックインできているかどうかを塩基配列レベルの解析によって確認したところ、5'の連結部分では正確につながっている一方で、3'の連結部分で予期せぬ欠失がいくつかのクローンで確認された。また、これまで一般的に使われている HR 経路でのノックインとの効率を比較したところ、MMEJ 経路を利用した本方法ではおよそ 2.5 倍のノックイン効率の上昇が見られた。これらの結果から、MMEJ を介した本方法は培養細胞での簡便かつ高効率な新規の遺伝子ノックイン法であることから、Precise Integration into Target Chromosome (PITCh)法と命名した。この PITCh 法と CRISPR-Cas9 を組み合わせて、レポーター発現カセットのみのノックインする実験を行ったところ、FBL 遺伝子座に高効率に挿入されることが明らかになった。特にマイクロホモロジーを 40bp にすることによって正確なノックインが確認された。

2) PITCh 法を用いた動物個体での遺伝子ノックイン

ウニ胚においてナノス遺伝子を標的とした Platinum TALEN を設計し、培養細胞でのレポーターアッセイとウニ胚への変異導入によって調べたところ、高い活性と変異導

入が確認された。そこで Platinum TALEN と Nanos 遺伝子座への蛍光遺伝子挿入用ドナーベクターをウニ受精卵へ導入し、原腸胚において正しく挿入されているかどうかをゲノムDNAのPCRおよびシーケンス解析によって調べた。その結果、ノックインを示す PCR 産物が検出され、予想される正確な挿入を示すアレルが検出された。しかしながら、ウニ胚において挿入した蛍光遺伝子から作られる蛍光タンパク質を検出することはできなかった。この原因としては、ナノス遺伝子が発現する細胞が細胞数の非常に少ない系譜 (小小割球) に限定されており、小小割球でのノックイン効率が低いことが考えられた。そのため、胞胚や原腸胚で反口側外胚葉で広く発現するアシルスルファターゼ遺伝子を標的とした Platinum TALEN および PITCh ドナーベクターを作製し、ノックイン実験を行った。その結果、ナノス遺伝子と同様に、正確なノックインアレルが検出されたが、蛍光タンパク質の発現は観察されなかった。一部の胚で蛍光が見られたものの、外胚葉の一部の細胞のみの発現であることから、ノックインの時期は胞胚以降であることが予想された。

カエルにおいては、チロシナーゼ遺伝子を標的とした Platinum TALEN あるいは CRISPR-Cas9 システム (sgRNA と Cas9 タンパク質) とドナーベクターを受精卵へ導入したところ、高い効率でのチロシナーゼ遺伝子破壊によるアルビノ表現型が観察された。同時に挿入された蛍光遺伝子の発現も観察されたことから、カエル胚では MMEJ 経路による遺伝子ノックインが有効であることが示された (Nakade et al., 2014)。

マウスにおいては、アクチン遺伝子座を標的とした dual RNA (crRNA と tracrRNA) CRISPR システムと PITCh ドナーベクターを受精卵に導入したところ、ノックインアレルが検出された (Aida et al., 2016)。

以上の結果から、カエルやマウスにおいて、PITCh 法は、簡便かつ正確性の高い遺伝子ノックイン法であることが示された。一方ウニ胚においては、MMEJ の経路を促進する工夫が必要と考えられた。

3) Exonuclease I による PITCh 法を用いた遺伝子ノックインの効率化

PITCh 法による遺伝子ノックインの効率を上昇されるため、MMEJ による DSB 修復経路に関わる因子の共発現を試みた。MMEJ による修復を定量的に検出するためのレポーターベクター (CRISPR 標的配列中にタンデムリピートのマイクロホモロジーを含む) を作成し、MMEJ 修復が起こることによって蛍光遺伝子の蛍光が回復することを指標として、MMEJ 促進因子のスクリーニングを行った。

DSB の修復に関与する 12 の候補因子遺伝子を共発現させたところ、Exonuclease

I(ExoI)および NHEJ 因子のドミナントネガティブ変異体の発現によって MMEJ が促進されることがわかった。そこで、培養細胞の標的遺伝子への遺伝子ノックインにおいて、ExoI の発現が効果的かどうかを調べ。その結果、ノックイン効率の 2.5 倍程度の上昇が見られた。

さらに、マウス受精卵において ExoI の効果を調べるため、アクチン遺伝子座を標的とする CRISPR システムと PITCh ドナーベクター、ExoI mRNA をマウス受精卵へ顕微注入したところ、胚の 35%においてノックインアレルが検出された。ExoI を導入しない場合は、15%程度の効率であったことから 2 倍以上の効率上昇が確認された。

以上の結果から、ExoI の過剰発現による PITCh 法ノックインの効率化は、培養細胞およびマウスにおいて有効であることが確認された (Aida et al., 2016)。今後は、ウニを含む様々な動物で ExoI の発現による PITCh 法の促進が見られるかどうかを検討して行く必要がある。

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 7 件)

1. Aida T, Nakade S, Sakuma T, Izu Y, Oishi A, Mochida K, Ishikubo H, Usami T, Aizawa H, Yamamoto T and Tanaka K. Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ *BMC Genomics*, 査読有, 17: 979, 2016 (DOI: 10.1186/s12864-016-3338-9)
2. Nakagawa Y, Sakuma T, Nishimichi N, Yokosaki Y, Yanaka N, Takeo T, Nakagata N, and Yamamoto T. Ultra-superovulation for the CRISPR-Cas9-mediated production of gene-knockout, single-amino-acid-substituted, and floxed mice. *Biol Open*, 査読有, 5: 1142-1148, 2016 (DOI: 10.1242/bio.019349)
3. Shigeta M, Sakane Y, Iida M, Suzuki M, Kashiwagi K, Kashiwagi A, Fujii S, Yamamoto T and Suzuki KT. Rapid and efficient analysis of gene function using CRISPR-Cas9 in *Xenopus tropicalis* founders. *Genes to Cells*, 査読有, 21: 755-771, 2016 (DOI: 10.1111/gtc.12379)
4. Sakuma T, Nakade S, Sakane Y, Suzuki KT and Yamamoto T. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nature Protocols*, 査読有, 11: 118-133, 2016 (DOI: 10.1038/nprot.2015.140)
5. Miyamoto K, Suzuki K, Suzuki M, Sakane Y, Sakuma T, Herberg S, Simeone A, Simpson D, Jullien J, Yamamoto T and Gurdon JB. The Expression of TALEN before Fertilization Provides a Rapid Knock-out Phenotype in *Xenopus laevis* Founder Embryos. *PLoS One*, 査読有, 10: e0142946, 2015 (DOI: 10.1371/journal.pone.0142946)

6. Sakuma T, Takenaga M, Kawabe Y, Nakamura T, Kamihira M and Yamamoto T. Homologous recombination-independent large gene cassette knock-in in CHO cells using TALEN and MMEJ-directed donor plasmid. *International Journal of Molecular Sciences*, 査読有, 16: 23849-23866, 2015 (DOI: 10.3390/ijms161023849)

7. Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, Yamamoto T, Sakuma T and Suzuki K. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nature Communications*, 査読有, 5: 5560, 2014 (DOI: 10.1038/ncomms6560)

[学会発表](計 8 件)

1. 山本 卓, ゲノム編集の基本原則と医学研究での利用, 第 16 回日本再生医療学会, 2017 年 10 月 10 日~13 日, 福岡
2. 山本 卓, ゲノム編集の基本原則と医学分野での利用, 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 2016 年 3 月 7 日~9 日, 仙台
3. 山本 卓, ゲノム編集の基本原則と最近の研究動向, 日本学術会議公開学術講演会「ゲノム編集技術の将来と展望」, 2016 年 8 月 9 日, 東京
4. 山本 卓, ゲノム編集の基本原則と研究動向, JBA セミナー「ゲノム編集技術の最近の動向と規制・特許について」, 2016 年 3 月 17 日, 東京
5. 山本 卓, ゲノム編集の基本原則と医学分野での可能性, 日本人類遺伝学会第 60 回大会, 2015 年 10 月 16 日~17 日, 東京
6. 山本 卓, ゲノム編集が生命科学に革命をおこす, 読売テクノフォーラム, 2015 年 6 月 22 日, 東京
7. Sakuma T, Suzuki K and Yamamoto T. MMEJ-mediated integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9, Keystone symposia, 11-16 Jan 2014, Big Sky, MT, USA
8. Yamamoto T, The third International Institute for Advanced Studies, Conference of Novel Developments on the Study of Life and Biological Systems Based on Genome Engineering and Imaging Science, 28-29 Oct 2014, Kitsugawa, Japan

[図書](計 1 件)

1. 山本 卓, ゲノム編集入門, 裳華房, 2016, 20 ページ

[その他]

ホームページ等

広島大学大学院理学研究科分子遺伝学研究室:

<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：90244102

(2) 研究分担者

谷口 俊介 (YAGUCHI SHUNSUKE)
筑波大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：00505331

(3) 連携研究者

相田 知海 (AIDA TOMOMI)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号：50540481

(3) 連携研究者

坂本 尚昭 (SAKAMOTO NAOAKI)
広島大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：00332338

(3) 連携研究者

鈴木 賢一 (SUZUKI KENICHI)
広島大学・大学院理学研究科・特任准教授
研究者番号：90363043