

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640064

研究課題名(和文)モデル脊椎動物における新規発生工学解析技術の開発

研究課題名(英文)Development of novel genome editing technologies using a model vertebrate

研究代表者

川原 敦雄(KAWAHARA, Atsuo)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：10362518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR/Cas9はゼブラフィッシュのゲノム改変に有用であるが、外来遺伝子を標的遺伝子座に精巧に挿入する手法は十分には開発されていない。本研究では、標的ゲノム部位に対する短い相同配列を付加したレポーター遺伝子を用いることで標的遺伝子座にEGFP遺伝子を精巧に挿入することに成功した。さらに、このゲノム改変が生殖系列に移行することを示し新規ノックイン法として機能することを明らかにした。加えて、化学合成したcrRNA、tracrRNAとCas9タンパク質で構成される即効型CRISPR/Cas9を開発し、EGFP遺伝子を標的遺伝子座に挿入できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：CRISPR/Cas9 system provides a powerful genetic tool for genome editing in zebrafish. However, it is still difficult to manipulate precise integration of exogenous DNA at the targeted genomic locus. We developed CRISPR/Cas9-mediated integration of the EGFP reporter containing short homologous sequences flanking the target locus. We succeeded in the efficient genomic integration of EGFP gene into the target site and the genome modification was heritable, presenting a simple CRISPR/Cas9-mediated knock-in system.

We tried to develop a ready-to-used CRISPR/Cas9 that composed of synthetic crRNA and tracrRNA with recombinant Cas9 protein. We found that the injection of crRNAs, tracrRNA and Cas9 protein rapidly induced genome modifications compared with the injection of sgRNAs and Cas9 mRNA. Furthermore, we demonstrated that this ready-to-used CRISPR/Cas9 is acceptable for the visualization of endogenous target gene expression using the EGFP reporter in zebrafish.

研究分野：発生生物学

キーワード：ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 ノックイン法 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

マウスは、形態形成過程がヒトとよく保存されているため、ヒト疾患の病態解明や治療薬の開発に利用されている。加えて、マウスでは胚性幹 (ES: embryonic stem) 細胞を用いた逆遺伝学的解析手法が確立しており、標的遺伝子を破壊した個体 (ノックアウトマウス) を作成し、その表現型解析から生体での分子機能を解析することができる。これに対し、マウス以外のモデル生物は ES 細胞が樹立できておらず、新しい発生工学解析技術の開発が望まれていた。

ゼブラフィッシュは、初期胚が透明で胚操作が容易なため形態形成機構の解析に適したモデル脊椎動物として注目されている。しかしながら、ゼブラフィッシュは、他のモデル生物と同じように ES 細胞が確立されておらず逆遺伝学的解析を遂行することが非常に困難であったが、最近、TALEN (transcription activator-like effector nuclease) や CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) Cas9 といったゲノム編集技術が開発され、受精卵において直接ゲノムを改変できるようになった。現時点では、それぞれのモデル生物に対するゲノム編集技術の最適化は完了しておらず、また、外来遺伝子の挿入を可能とする新しいゲノム編集技術の開発が切望されているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでゼブラフィッシュにおいて困難であった遺伝子破壊や外来遺伝子の標的ゲノム部位への挿入 (ノックイン) を簡便に行うことができる新しい発生工学解析技術を開発することである。CRISPR/Cas9 は、標的ゲノム配列を認識する CRISPR RNA (crRNA: 42 塩基) と *trans*-activating crRNA (tracrRNA: 69 塩基) がヌクレアーゼ Cas9 と複合体を形成することで標的ゲノム部位に DNA 二本鎖切断 (DSB: DNA double strand break) を誘導する。近年、crRNA と tracrRNA を融合した single guide RNA (sgRNA: 102 塩基) を簡単に構築できる発現ベクターシステムが開発され、sgRNA と Cas9 mRNA を受精卵に注入するだけでゲノム編集が可能となってきている。例えば、標的遺伝子のコード領域内に sgRNA の標的部位を設計した場合、標的ゲノム部位に生じた DSB は、主に非相同末端結合修復 (NHEJ: non-homologous end joining) で修復されるが、このプロセスは高頻度でエラーが生じるため遺伝子破壊を誘導することができる。また、標的ゲノム部位に対し長い相同配列を持つドナーベクターと一緒に注入した場合、相同組換え (HR: homologous recombination) と呼ばれる修復機構で外来遺伝子のノックインが可能となる。さらに、最近、標的ゲノム部

位の近傍に 3-25 塩基の相同配列 (マイクロホモロジー配列) が存在する場合、センス鎖とアンチセンス鎖のマイクロホモロジー配列がアニールすることでゲノムが修復されることが明らかとなってきている (マイクロホモロジー修復, MMEJ: microhomology-mediated end joining)。つまり、ゲノム編集技術と上記のゲノム修復機構を巧く組み合わせることにより新しい発生工学解析技術を開発することが可能であると考えられた。本研究では、ゼブラフィッシュにおける標的遺伝子の破壊や外来遺伝子の標的ゲノム部位へのノックインを簡便に行うことが可能な CRISPR/Cas9 を用いた新しいゲノム編集技術を開発する。

3. 研究の方法

本研究では、従来の CRISPR/Cas9 を改良することで、ゼブラフィッシュにおいて効率よく標的遺伝子を破壊する手法ならび標的ゲノム部位に外来遺伝子をノックインする手法を開発する。以下の 3 つのプロジェクトを遂行する。

(1) Cas9 ヌクレアーゼを基盤としたゲノム編集技術の開発

野生型 Cas9 ヌクレアーゼを 2A ペプチド配列ならび赤色蛍光タンパク質 (mCherry) に接続したレポーター遺伝子を構築する。このコンストラクトは、生体内で Cas9-2A ペプチド-mCherry のキメラタンパク質として合成された後に内在性の分解酵素で 2A ペプチド配列が切断されることで Cas9 ヌクレアーゼが生成される。つまり、Cas9 を発現する細胞は、mCherry の発現で同時にモニターできる。このコンストラクトをゼブラフィッシュ胚に注入することで、Cas9 遺伝子を胚発生過程で発現するトランスジェニック (Tg) 系統を樹立する。上記の Tg 系統由来の受精卵に sgRNA を注入することで標的ゲノム配列にゲノム編集が可能であるかを検証する。

(2) マイクロホモロジー修復を利用した新規ノックイン法の開発

ドナーベクターとして標的ゲノム部位前後の相同配列 (40 塩基) を緑色蛍光タンパク質遺伝子の読み枠に配慮しながら両側に挿入する。その両端に高い切断活性を有する sgRNA 標的配列を付加したコンストラクトをドナーベクターとする。このドナーベクターと複数の sgRNA (標的ゲノム部位とドナーベクターを切断する sgRNA) を注入することで、ドナーベクターが標的ゲノム部位に短い相同配列に依存してノックインされるかを検討する。ゲノム編集時に標的ゲノム部位で露出される配列とドナーベクターの切断面に剥き出しになる配列が丁度マイクロホモロジー配列と同じようにアニールすることで精巧なノックインを誘導できると考え

ている。本研究では、表皮細胞に高発現するケラチン遺伝子に EGFP 遺伝子を精巧に接続できるかで検証する。

(3) 即効型 CRISPR/Cas9 の開発

従来の sgRNA と Cas9 mRNA をゼブラフィッシュ受精卵に注入する代わりに、crRNA と tracrRNA を化学合成しリコンビナント Cas9 タンパク質と一緒にゼブラフィッシュ胚に注入することで、ゲノム編集が可能であるかを検討する。Cas9 タンパク質を使用するので、従来法の Cas9 mRNA から Cas9 タンパク質への翻訳の過程が必要ないので、胚発生過程の初期段階でゲノム編集が引き起こることが予想される。そこで、従来法と新規法でゲノム編集を誘導した胚を胚期、原腸胚期、24 時間胚の発生過程でゲノム編集効率や Cas9 タンパク質の挙動を解析する。

4. 研究成果

本研究では、3 つのプロジェクトを遂行し、以下の研究成果が得られた。

(1) Cas9 ヌクレアーゼを基盤としたゲノム編集技の開発

我々が確立した CRISPR/Cas9 を用いて Cas9-2A ペプチド-mCherry を発現するトランスジェニック系統の樹立に成功した。この Tg 系統から受精卵を採取し、チロシナーゼ (tyrosinase: tyr) に対する sgRNA (tyr-sgRNA) を注入したが、チロシナーゼが破壊された表現型である色素細胞の形成異常は観察されなかった。tyr-sgRNA と Cas9 mRNA を受精卵に注入する実験を行った場合は色素形成異常が誘導されるので、Tg 系統由来の胚での Cas9 タンパク質の発現量がゲノム編集を行うのに十分ではないと結論した。

(2) マイクロホモロジー修復を利用した新規ノックイン法の開発

ケラチン遺伝子 (*krt11c19e*) は、表皮細胞で高い発現を示すことが報告されている。そこで、ケラチン遺伝子の終止コドン付近に EGFP 遺伝子をインフレームで精巧に接続しうるか否かをケラチン-EGFP キメラタンパク質が表皮細胞で観察されるかで検証した (図 1)。まず、ドナーベクターを構築するために、EGFP 遺伝子の前後にケラチン遺伝子の標的ゲノム部位近傍の相同配列 (40 塩基) を EGFP 遺伝子の読み枠に配慮しながら付加した。さらに、その前後に高い切断活性を有する sgRNA の結合部位を挿入した。つまり、ゲノム編集が誘導された場合、ドナーベクター内に標的ゲノム部位と相同なマイクロホモロジー配列 (短い相同配列) が露出されると想定した。ゼブラフィッシュ受精卵に複数の sgRNA (ケラチン遺伝子座とドナーベクターを標的としている sgRNA) および Cas9 mRNA

とドナーベクターを一緒に注入した場合、高い効率で表皮細胞において EGFP の発現が観察された (約 40% の F0 胚) (図 2)。相同配列がないドナーベクターを用いた同様の実験を行っても表皮細胞における EGFP の発現が認められないことから、この表皮細胞での EGFP の発現はマイクロホモロジー配列に依存したノックインに起因すると考えられた。次に、EGFP 陽性の胚からゲノム DNA を抽出した後にシーケンス解析により EGFP のゲノム挿入部位における塩基配列を解析した。その結果、ゲノムに挿入された EGFP の大部分が計画した通りのインフレームでの精巧なノックインであることが明らかとなった。さらに、このノックインが次世代へ受け継がれうるかを調べた結果、F0 胚で観察されたゲノム改変が生殖系列へ移行しうることを確認された。特に、ゲノム編集を行った F0 胚を EGFP の発現の強弱で比較した場合、強い EGFP 発現が認められる F0 胚において生殖系列移行の効率が高いことが明らかとなった。これは、最初にゲノム編集を行った際に EGFP の発現が高い胚を集めるプレスクリーニングを行うことがノックイン系統の樹立に有用であることを示している。また、上記の結果は、ゼブラフィッシュ胚においてマイクロホモロジー修復が機能していることを示唆している。なお、このマイクロホモロジー修復を用いた新規ノックイン法の開発は、広島大学の山本研究室との共同研究である。

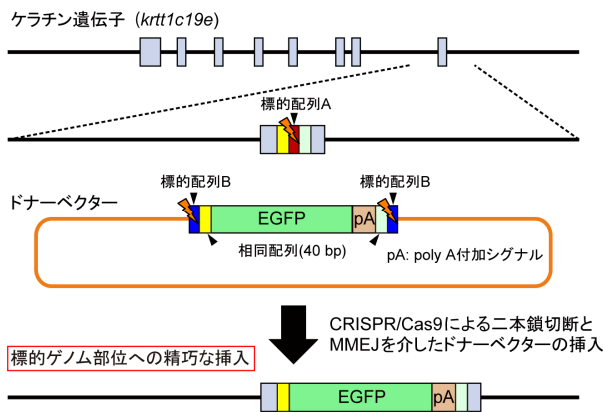


図 1 マイクロホモロジー修復を利用した新規ノックイン法

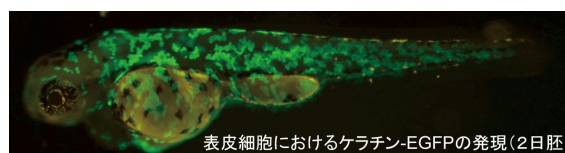


図 2 表皮細胞におけるケラチン-EGFP の発現

(3) 即効型 CRISPR/Cas9 の開発

本研究では、化学合成した crRNA と tracrRNA が sgRNA と同じように機能するかどうかとリコンビナント Cas9 タンパク質が Cas9 mRNA と比較して発生初期段階からゲノム編集を誘導しうるかを調べた。標的遺伝子は、スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) 輸送体である *spns2* とメラニン合成を制御するチロシナーゼ (*tyrosinase: tyr*) を選んだ。*spns2* の遺伝子破壊は、二又心臓の表現型を誘導し、また、*tyr* の遺伝子破壊は、色素合成異常を誘導する。*spns2*-sgRNA, *tyr*-sgRNA と Cas9 mRNA をゼブラフィッシュ受精卵に注入した場合、1 日胚において高い効率で二又心臓 (72%) と色素合成異常 (83%) を誘導するが、化学合成した *spns2*-crRNA, *tyr*-crRNA, tracrRNA と Cas9 タンパク質によりゲノム編集を誘導した場合も高い効率で二又心臓 (94%) と色素合成異常 (80%) を誘導することが明らかとなった (図 3)。次に、ゲノム編集を行った胚を胞胚期と原腸胚期でゲノム DNA を調整し、ゲノム編集効率を両方で検討した。その結果、*spns2*-crRNA, *tyr*-crRNA, tracrRNA と Cas9 タンパク質の複合体の方が *spns2*-sgRNA, *tyr*-sgRNA と Cas9 mRNA の複合体よりも早い発生段階 (胞胚期) からゲノム編集が進行していることが明らかとなった (図 4: ヘテロ二本鎖 DNA の形成で判断)。これは、新規法においては Cas9 mRNA から Cas9 タンパク質へと翻訳が進むプロセスが必要ないため早い発生段階からゲノム編集が誘導できたと考えられた。その可能性を検証するため Cas9 抗体を用いたウエスタンブロッティング法で解析を行った結果、従来法の Cas9 mRNA を注入した場合、注入直後は Cas9 タンパク質が全く検出されないが、24 時間胚では高い Cas9 タンパク質の発現量となることが明らかとなった (図 5)。一方、Cas9 タンパク質を注入する新規法は、注入後は高い Cas9 タンパク質量が認められるが、24 時間胚では分解を受けるためか全く検出されないことが明らかとなった。これらの結果は、化学合成した crRNA, tracrRNA と Cas9 タンパク質の複合体が即効型 CRISPR/Cas9 として機能することを示している。

最後に、本研究で開発した即効型 CRISPR/Cas9 が外来遺伝子のノックインに応用できうるかを検討した。標的遺伝子として未解析遺伝子である *epdr1* (*ependymin related 1*) を選定した。ドナーベクターとして、高い切断活性を有する crRNA 結合部位を付加し、その下流にヒートショックタンパク質 (*hsp*) のプロモーター領域と *EGFP* 遺伝子を接続した。次に、*epdr1* の開始コドン付近に crRNA の標的部位を選定した。複数の crRNA, tracrRNA, Cas9 タンパク質と上記のドナーベクターをゼブラフィッシュ受精卵に注入し、F0 胚で EGFP の発現を調べた。*epdr1* アンチセンス・プローブを用いた *in situ* hybridization

の実験から *epdr1* は、頭部の中樞神経系と体幹部の神経管に発現することが分かったが、上記のゲノム編集を行った F0 胚においても頭部で広く EGFP の発現が観察された (図 6)。そこで、EGFP の発現が見られる F0 胚からゲノム DNA を調整しシーケンス解析を行った結果、*EGFP* 遺伝子が *epdr1* 遺伝子座に挿入されていることを確認した。次に、ドナーベクターのゲノム挿入部位における塩基配列を解析した結果、ドナーベクターが *epdr1* 遺伝子座に挿入されていることが明らかとなった。つまり、我々が開発した即効型 CRISPR/Cas9 により外来遺伝子を標的ゲノム部位へ効率よく挿入できることが明らかになった。

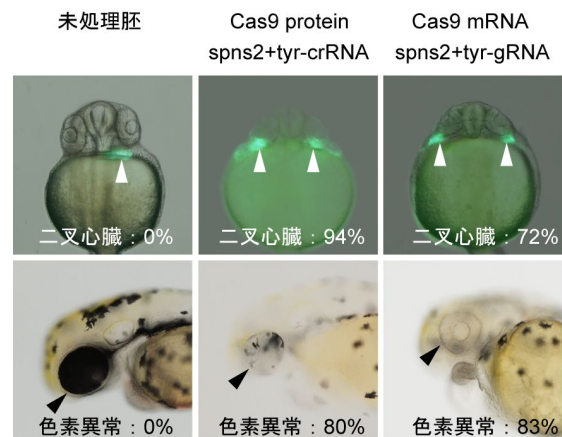


図 3 crRNA-tracrRNA-Cas9 タンパク質を用いた即効型 CRISPR/Cas9

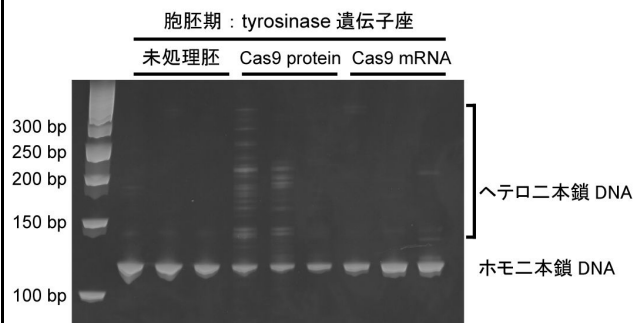


図 4 即効型 CRISPR/Cas9 による胞胚期におけるゲノム編集効率

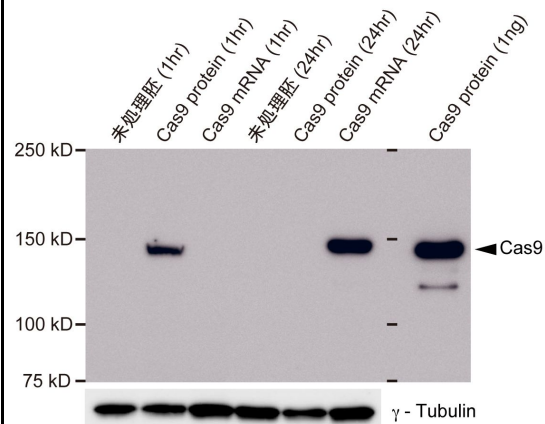


図 5 即効型 CRISPR/Cas9 における Cas9 タンパク質の発現量

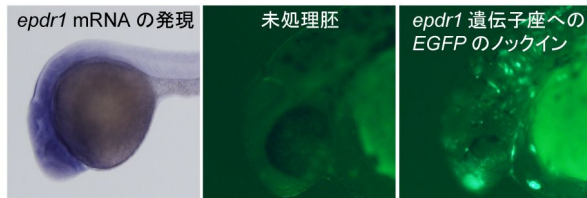


図 6 *epdr1* 遺伝子座におけるレポーター遺伝子の挿入

[考察]

本研究では、ゼブラフィッシュにおける遺伝子破壊ならび外来遺伝子の標的ゲノム部位へのノックインを可能とする発生工学解析技術の開発を行った。当初は、Cas9 遺伝子をゼブラフィッシュ・ゲノムに組み込んだ Tg 系統を樹立し、その Tg 系統由来の受精卵に sgRNA を注入することでゲノム編集を誘導することを試みたが、残念ながら作成した Cas9 系統は、ゼブラフィッシュの胚発生過程でゲノム編集を誘導できる Cas9 タンパク質の発現量ではないことが判明した。

上記の問題を克服するために、マイクロホモロジー修復機構を利用した新しいノックイン法の開発に着手した。これは、ゲノム編集時に誘導される DSB の近傍に 3-25 塩基程のマイクロホモロジー配列が存在する場合、センス鎖とアンチセンス鎖のマイクロホモロジー配列がアニールすることでゲノムが修復されることを利用している。この手法は、EGFP 遺伝子の前後にゲノム切断部位の短い相同配列を付加するだけなので、簡単にドナーベクターを構築することができる。ケラチン遺伝子 (*krt11c19e*) の終止コドン付近に EGFP 遺伝子を精巧にノックインできるか否かで検証した結果、高い効率で EGFP が表皮細胞に発現することが分かった。また、ゲノム解析の結果、上記のノックインは、マイクロホモロジー配列に依存した精巧なゲノム改変であることが明らかとなった。本研究で開発したマイクロホモロジー修復を利用したノックイン法は、蛍光タンパク質などのレポーター遺伝子を標的遺伝子と精巧につなげることで生体内での分子動態解析を行う場合に大変有用であると考えている。

効率的な遺伝子破壊や外来遺伝子を標的ゲノム部位に挿入するためには、早い発生段階から効率よくゲノム編集を行うことが必要不可欠である。本研究において、crRNA, tracrRNA と Cas9 タンパク質を用いた即効型 CRISPR/Cas9 を開発した。この新規法は従来法と比較して、胞胚期という極めて早い発生段階でゲノム編集が観察され、かつ、Cas9 タンパク質が胚発生過程で分解されることから、オフターゲット効果を抑えられるゲノム編集技術であると考えられた。次に、この即効型 CRISPR/Cas9 を用いた未解析遺伝子 *epdr1* の遺伝子座に EGFP レポーター遺伝子をノックインすることを試みた。その結果、内在性 *epdr1* の発現ドメインにおいて、EGFP の発現

が認められること、かつ、*epdr1* 遺伝子座に EGFP 遺伝子が挿入されていることを明らかにした。つまり、本研究で開発した即効型 CRISPR/Cas9 は、未解析遺伝子の分子動態解析に威力を発揮すると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)(全て査読有り)

1. Mikami S, Nakaura M, Kawahara A, Mizoguchi T, Itoh M Mindbomb 2 is dispensable for embryonic development and Notch signalling in zebrafish ***Biology Open*** 4, 1576-1582 (2015), doi: 10.1242/bio.014225.
2. Hisano Y, Inoue A, Okudaira M, Taimatsu K, Matsumoto H, Kotani H, Ohga R, Aoki J, Kawahara A Maternal and Zygotic Sphingosine Kinase 2 Are Indispensable for Cardiac Development in Zebrafish ***J Biol. Chem.*** 290, 14841-14851 (2015), doi: 10.1074/jbc.M114.634717.
3. Hisano Y, Inoue A, Taimatsu K, Ota S, Ohga R, Kotani H, Muraki M, Aoki J, Kawahara A Comprehensive analysis of sphingosine-1-phosphate receptor mutants during zebrafish embryogenesis ***Genes to Cells*** 20, 647-658 (2015), doi: 10.1111/gtc.12259.
4. Kotani H, Taimatsu K, Ohga R, Ota S, Kawahara A Efficient Multiple Genome Modifications Induced by the crRNAs, tracrRNA and Cas9 Protein Complex in Zebrafish ***PLoS One*** 10, e0128319 (2015), doi: 10.1371/journal.pone.0128319.
5. Hisano Y, Sakuma T, Nakade S, Ohga R, Ota S, Okamoto H, Yamamoto T, Kawahara A Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish ***Scientific Reports*** 5, 8841 (2015), doi: 10.1038/srep08841.
6. Kimura Y, Hisano Y, Kawahara A, Higashijima S Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering ***Scientific Reports*** 4, 6545 (2014), doi: 10.1038/srep06545.
7. Ota S, Hisano Y, Ikawa Y, Kawahara A Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish ***Genes to Cells*** 19, 555-565 (2014), doi: 10.1111/gtc.12154.
8. Nakanaga K, Hama K, Kano K, Sato T, Yukiura H, Inoue A, Saigusa D, Tokuyama H, Tomioka Y, Nishina H, Kawahara A, Aoki J Overexpression of autotaxin, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, enhances cardia bifida induced by hypo-sphingosine-1-phosphate signaling in

zebrafish embryo *J. Biochem.* 155, 235-241
(2014), doi: 10.1093/jb/mvt114.

〔学会発表〕(計6件)

1. 川原敦雄 Efficient multiple genome modifications induced by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish Conference on Transposition and Genome Engineering 2015 2015年11月18日 奈良県奈良市 国際フォーラム 麓
2. 川原敦雄, 安齋賢, 大道裕 小型魚類におけるゲノム編集技術の現状 第21回 小型魚類研究会 2015年9月20日 大阪府吹田市 大阪大学
3. 川原敦雄 CRISPRによる効率的なゲノム改変 第88回日本薬理学会年会 2015年3月18日 愛知県名古屋市 国際会議場
4. 川原敦雄 Maternally- and zygotically-supplied SIP is essential for the cardiac development in zebrafish 6th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediator 2015年2月10日 東京都新宿区 京王プラザホテル
5. 川原敦雄 ゲノム編集技術を活用した生命科学研究 第32回内分泌代謝学サマーセミナー 2014年7月12日 山梨県富士吉田市 富士レークホテル
6. 川原敦雄 CRISPR/Cas9-mediated genome modifications 第47回日本発生物学会大会 2014年5月28日 愛知県名古屋市 ウイング愛知

〔図書〕(計4件)

1. 川原敦雄, 他 57名 進化するゲノム編集技術-ゼブラフィッシュにおけるゲノム編集 株式会社エヌ・ティー・エス刊, 2015
2. 川原敦雄, 木下政人 ゲノム編集成功の秘訣 Q&A-小型魚類におけるゲノム編集 実験医学, 156-174, 2015
3. 太田聡, 川原敦雄 ゼブラフィッシュにおけるゲノム編集と生命科学への応用 実験医学 vol.32, No.11, 1721-1725, 2014
4. 川原敦雄 スフィンゴシン-1-リン酸 (SIP) 輸送体とその生理機能 山梨大学医科学雑誌 vol.30, No.1, 1-5, 2014

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/lifescience/kouza/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川原敦雄 (KAWAHARA Atsuo)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号: 10362518