

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670165

研究課題名(和文)次世代染色体工学の確立

研究課題名(英文)Establishment of next generation chromosome engineering

研究代表者

内匠 透 (Takumi, Toru)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・シニアチームリーダー

研究者番号：00222092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：コピー数多型(CNV)は、ゲノム上の重複、欠失などを表し、癌や精神疾患などの様々な疾患の原因と考えられている。それら疾患の病態解明、治療法の開発のためにはCNVモデルの開発が必須である。本研究では、最新のゲノム編集技術を用いて、簡便、高速、高効率を兼ね備えた「次世代」染色体工学の確立を目指した。実際にゲノム編集技術と相同組み替え用遺伝子を用いて、長い(Mbオーダー)ゲノムの欠損を作製することに成功した。ゲノム編集技術による「次世代」染色体工学の開発により、CNVの作製は革新的に早くなり、網羅的ヒトCNVモデルの構築が可能になり、また将来のゲノム治療の基盤的技術となりうる。

研究成果の概要(英文)：In the CRISPR-Cas9 system, a single guide RNA (sgRNA) directs the endonuclease Cas9 to a targeted DNA sequence for site-specific manipulation. The sgRNA has also been shown to play a role in activating the endonuclease activity of Cas9. This dual function of the sgRNA likely underlies observations that different sgRNAs have varying on-target activities. We evaluated the cleavage activities of 218 sgRNAs using in vitro Surveyor assays. We found that nucleotides at both PAM-distal and PAM-proximal region of the sgRNA are significantly correlated with on-target efficiency. Furthermore, we demonstrated that the genomic contexts of the targeted DNA, the GC percentage, and the secondary structure of sgRNA are critical factors contributing to cleavage efficiency.

研究分野：病態医化学

キーワード：コピー数多型 染色体工学 ゲノム編集技術 自閉症

### 1. 研究開始当初の背景

ZFN (zinc-finger nucleases)は約15年以上前に発見されたにもかかわらず、デザインの難しさや特許を含めたコストの高さもあり、ゲノム編集技術としての応用が広まらなかったが、過去数年でZFN同様DNAを認識するTALEN (transcription activator-like effector nuclease)が非常に早いスピードで、ゲノム編集技術として広まった。さらに、RNAを認識するCRISPR/Cas (clustered regulatory interspaced short palindromic/CRISPR-associated)系が、TALENを上回る速度で、ゲノム編集の注目される技術として、世界中で研究が進んでいる。

内匠は、これまでにCre-loxP系を組み込んだ胚性幹細胞の相同組み替え技術を利用した染色体工学的手法を用いて、世界に先駆けて自閉症ヒト型モデルマウスの作製に成功した(Nakatani et al., *Cell*, 2009)。本マウスは自閉症のコピー数多型(CNV, copy number variation)モデルマウスとして最初のものであるが、最近のゲノム科学の成果の結果、ヒトゲノムには沢山のCNVがあり、ヒトの多様性のみならず、癌や自閉症を含む精神疾患等の原因となっていることがわかってきた。従来の染色体工学では、一つのCNVマウスモデルを作製するのに数年を要するため、網羅的解析には、「次世代」染色体工学とでも呼ぶべき方法論のブレークスルーが必要であった。

### 2. 研究の目的

TALENによる染色体工学法のさらなる検証とともに、CRISPR/Cas系の問題点であるoff-targetの改善を含めたCRISPR/Cas系を用いた新規染色体工学法の確立を目指す。将来の霊長類モデルの作製を視野にいれ、一連のゲノム編集技術による「次世代」染色体工学の開発を行う。

### 3. 研究の方法

(1) TALENを用いた「次世代」染色体工学の検証:

内匠らはこれまでに従来のCre-loxP系を利用した染色体工学的手法を用いて、あらたにヒト染色体15q25.2-25.3欠失のES細胞モデルを構築し、GTを経たキメラマウスの作製に成功している。また、TALENと相同組み替え用セレクションマーカを組み合わせることで、染色体改変を試みる。Cell1アッセイ(ヌクレオチドミスマッチアッセイ)を用いて本法を検証する。

(2) CRISPR/Casを用いた「次世代」染色体工学の開発:

CRISPR/Casは、細菌の適応免疫システムで、その構成因子は、Casヌクレアーゼ及びCRISPR-RNA(crRNA)、trans-activating crRNA(trancrRNAs)と

よばれるnon-coding RNAsである。標的DNA領域に相補的なcrRNAが標的DNAに結合し、それを目印としたCasヌクレアーゼが標的領域を破壊する。CRISPR/Casは、非常に高効率に二重鎖切断を導入でき、また複数の変異を一度に導入できる。ベクターにCNV両末端をターゲットとして組み込む事で「large deletion」を試みる。CRISPRベクターと相同組み替え用セレクションマーカを組み合わせたものを用いて、フィーダーを必要としないmES細胞株(EBRTcH3)で効率を確認する。5'アーム、3'アームそれぞれで複数の候補を選び、ES細胞に導入して、surveyorアッセイで調べる。二本鎖切断の確認できたもの、かつoff-targetの可能性が少ないものの組み合わせを用いて、ES細胞に導入し、欠失をPCRでスクリーニングし、サザンブロット法で確認する。

### 4. 研究成果

(1) TALENを用いた「次世代」染色体工学的手法を用いて、ヒト染色体15q25.2-25.3欠失のES細胞モデルの作製に成功した。

TALENベクターと相同組み替え様のターゲットベクターを組み合わせることで、「one-step」で長い領域(480Kb)の欠失という染色体改変に成功した。本欠失作製に用いたベクターのホモロジーアームの長さは1Kbにまで短くしても、高効率に欠失変異体をえることができた。

(2) 上記のTALEN同様、CRISPRベクターにCNV両末端をターゲットとして組み込む事で、CNVを作製することに成功した。従来の染色体工学より高効率かつ迅速にCNVを作製することが可能な「次世代」染色体工学法を確立した。

### 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13件)すべて査読有

1. Liu X, Homma A, Sayadi J, Yang S, Ohashi J, Takumi T. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*. 2016 Jan 27; 6: 19675. doi: 10.1038/srep19675.

2. Liu X, Tamada K, Kishimoto R, Okubo H, Ise S, Ohta H, Ruf S, Nakatani J, Kohno N, Spitz F, Takumi T. Transcriptome profiling of white adipose tissue in a mouse model for 15q duplication syndrome. *Genom Data*. 2015 Jul 10; 5: 394-6. doi: 10.1016/j.gdata.2015.06.035.

3. Nakai N, Otsuka S, Myung J, Takumi T. Autism spectrum disorder model mice:

Focus on copy number variation and epigenetics. *Sci China Life Sci.* 2015 Oct; 58(10): 976-84. doi: 10.1007/s11427-015-4891-7.

4. Kishimoto R, Tamada K, Liu X, Okubo H, Ise S, Ohta H, Ruf S, Nakatani J, Kohno N, Spitz F, Takumi T. Model mice for 15q11-13 duplication syndrome exhibit late-onset obesity and altered lipid metabolism. *Hum Mol Genet.* 2015 Aug 15; 24(16): 4559-72. doi: 10.1093/hmg/ddv187.

5. Liu X, Takumi T. Genomic and genetic aspects of autism spectrum disorder. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Sep 19; 452(2): 244-53. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.108.

〔学会発表〕(計 31 件)

1. Toru Takumi. Modeling neurodevelopmental disorders. EMBO Conference on Neural Development-Function and Dysfunction, Dec 4-8, 2015 (Taipei, Taiwan)

2. Toru Takumi. Modeling Autism. Asia Pacific Regional IMFAR: Shanghai 2015, Nov 6-8, 2015 (Shanghai, China)

3. Toru Takumi. Modeling Autism. 第 5 8 回日本神経化学学会大会 2015 年 9 月 11-13 日、大宮ソニックシティ(さいたま)

4. Toru Takumi. Modeling Autism. ISN Satellite Meeting 2015, The Frontiers in Neurodevelopmental Disorders (FiND), Aug 21, 2015 (Sydney, Australia)

5. 内匠透. 自閉症病態生理の理解を目指した 15q 重複モデルマウスの解析. 第 120 回日本解剖学会全国学術集会、第 92 回日本生理学回大会合同大会 2015 年 3 月 21-23 日、神戸国際会議場(神戸)

6. Keita Fukumoto, Shinji Tanaka, Shigeo Okabe, Toru Takumi. Molecular mechanisms for altered spine dynamics among ASD model mice. 第 120 回日本解剖学会全国学術集会、第 92 回日本生理学回大会合同大会 2015 年 3 月 21-23 日、神戸国際会議場(神戸)

7. Toru Takumi. Autism and epigenetics. 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 18-20 日、名古屋国際会議場(名古屋)

8. Toru Takumi. Copy number variation model of autism. Symposium "Advances in Brain Science", Jan 21-22, 2015, (Rehovot,

Israel)

9. 内匠透. 自閉症ヒト型モデルマウスの開発. 第 4 回日本情動学会 2014 年 11 月 29 日、名古屋市立大学医学部(名古屋)

10. Toru Takumi. Molecular approaches towards understanding the pathophysiology of mental disorders. 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25-27 日、パシフィコ横浜(横浜)

11. 野村淳、佐久間哲史、神田暁史、岸本恵子、前田知花、外丸祐介、山本卓、内匠透. ゲノム編集技術による簡便迅速かつ高効率な次世代染色体工学の開発. 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25-27 日、パシフィコ横浜(横浜)

12. Toru Takumi. A mouse model for 15q duplication towards understanding the pathophysiology of autism. 1<sup>st</sup> IBRO/APRC Chandigarh Neuroscience School, Nov 2-8, 2014, (Chandigarh, India)

13. 内匠透. 次世代染色体工学. 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 15-18 日、京都国際会館(京都)

14. 内匠透. 自閉症ヒト型マウスモデルの開発. 第 36 回日本生物学的精神医学会、第 57 回日本神経化学大会合同年会 2014 年 9 月 29 日—10 月 1 日、奈良県文化会館(奈良)

15. Toru Takumi. CNV models for autism spectrum disorder. Cold Spring Harbor Asia Conferences, August 25-29, 2014, (Suzhou, China)

16. Toru Takumi. A mouse model of 15q duplication towards understanding the pathophysiology of autistic behaviors. Gordon Research Conferences "Molecular & Cellular Neurobiology" June 29-July 4, 2014, (Hong Kong, China)

〔図書〕(計 6 件)

1. 野村 淳、内匠透、TALEN および CRISPR/Cas9 を用いた染色体改変法、山本卓 編、実験医学別冊、今すぐ始めるゲノム編集、羊土社、東京：pp73-80, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

内匠 透 (Takumi Toru)  
理化学研究所・脳科学総合研究センター・シ  
ニアチームリーダー  
研究者番号：00222092

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：