

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26712025

研究課題名(和文) ゲノム領域置換マウスを利用した非モデル哺乳動物のゲノム機能解析法の確立

研究課題名(英文) Development versatile zygote-mediated genome-editing technologies in mice

研究代表者

藤井 渉 (Fujii, Wataru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：40708161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：高効率なゲノム領域置換マウス作製系の確立と非モデル動物由来配列に置換したマウスの機能解析を試みた。改変可能な座位を拡張するために、ST1およびCj由来CRISPRを受精卵へ応用し、高効率なKO/KIマウスの作製に成功した。ノックインに使用する外来DNAについて、高濃度2本鎖DNAはATM経路を活性化し発生停止を引き起こすことが示唆された。培養細胞等で報告されたSCR7, BreferdinA, L755507は申請者の実験環境では受精卵を介したノックインの効率上昇は認められなかった。確立したノックイン系を利用し、非モデル動物特異的な配列に置換したマウスの作製に成功し、現在解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：We attempted to establish more versatile system to generate genetically-modified mice by using zygote-mediated engineered endonucleases. We were successfully applied *S. thermophiles* 1- and *C. jejuni*-derived CRISPR/Cas to zygote-mediated generation of knockout/knock-in mice. We found that exogenous dsDNA-injection activates ooplasmic ATM signaling pathway and inhibits preimplantation development. By using the established method, we generated several mouse strains which replaced the orthologous locus/loci to porcine or giraffe gene sequence.

研究分野：発生工学

キーワード：発生工学 人工ヌクレアーゼ

1. 研究開始当初の背景

家畜や野生動物などの非モデル哺乳動物は、マウスには無い特徴的な形態や生理機能を持ち、これを司るゲノム情報が明らかになれば家畜改良に有用な情報となる上、それぞれの動物の特徴をゲノム配列という具体的な情報で議論できるようになる。しかし、これらの動物は逆遺伝学的手法の利用は困難であり、本当にそのゲノム配列が表現型に關与しているのか確定は出来ず、そのゲノム領域が具体的にどのような機能を発揮するのかについても検討できないことが多い。そこで、マウスのオーソログゲノム領域に解析したいゲノム配列を導入し、マウス個体内で機能解析を行うことで、これらのゲノム配列情報を解析できるのではないかと考えた。近年の人工ヌクレアーゼを利用したゲノム改変技術の進展は著しく、従来のジーンターゲット法と比較して簡便にゲノム改変細胞を得ることが可能となってきている。従って、受精卵を介して人工ヌクレアーゼを利用してゲノム改変を行うことで、効率的にゲノム領域置換マウスの作製が可能であると期待される。

2. 研究の目的

効率よく任意のゲノム領域を置換したマウスの作製系を確立し、これによって非モデル動物のゲノム配列に置換したマウスの機能解析を試みる。

3. 研究の方法

人工ヌクレアーゼによる受精卵を介したゲノム領域置換マウスの作製のためには、幅広い座位に有効な人工ヌクレアーゼの開発、外来 DNA による受精卵への影響、を検証する必要がある。また、上記技術によって非モデル動物に特異的なゲノム改変マウスの作製と解析を行う。

については、従来用いられている *S. pyogenes* 由来の CRISPR/Cas は、標的配列として 5' -NGG という塩基配列が存在する座位のみを認識するため、より広範な座位を標的とした CRISPR/Cas が本研究で利用可能か検討するため、*S. thermophiles* および *C. jejuni* 由来の CRISPR/Cas が受精卵を介したゲノム改変に利用可能か検討した。また、従来の Cas9 は標的配列と類似の配列も切断しうる、いわゆるオフターゲット効果を持つことが知られている。そこで、培養細胞においてより正確な標的選択性が報告された Cas9 変異体を受精卵に応用し、オフターゲット効果への影響を検討した。加えて、受精卵とは異なる時期の卵母細胞におけるゲノム改変効果を評価するために、ブタ由来の卵核胞期未成熟卵母細胞を用いて検討を行った。

については、外来 DNA の配列や形状が受精卵の発生およびノックイン効率に及ぼす影響について検討した。加えて、DNA 修復関連遺伝子や小分子化合物による受精卵を介し

たノックイン効率への影響を検討した。

については、後述するように当初に計画した長鎖配列の置換について検討するのが困難になったため、ORF 内のアミノ酸置換を中心に検討を行った。

4. 研究成果

S. thermophiles 由来の Cas9 について、ヒトコドン最適化した ORF を Addgene より入手し、受精卵内で高発現するコンストラクトを作製した。この mRNA と Tyr を標的としたガイド RNA を受精卵に顕微注入し、胚移植によって産子を得たところ、従来の CRISPR/Cas と同等の効率でノックアウト個体の作出が認められた。続いて、従来の CRISPR/Cas では設計が困難な座位に対するノックインについて、*S. thermophiles* 由来 CRISPR/Cas を利用することで高効率にノックインが可能であることを確認した。

C. jejuni 由来の Cas9 については、マウスコドン最適化したコンストラクトを合成し、受精卵で高発現するコンストラクトを構築した。*S. thermophiles* 由来 CRISPR/Cas と同様に、Tyr に対してターゲティングを試みたところ、既報の PAM の一部では変異導入効果が認められず、新規の PAM として 5' -NNNRYAC で効果が認められた。しかし、Tyr 座位における評価に留まっており、クロマチンの状態が影響している可能性もあるため、今後、幅広い座位での追試が必要である。また、Chk2 座位に対して、従来型 CRISPR/Cas では設計が困難な終止コドン周辺に対して変異導入が可能であり、外来配列として Flag 配列のノックインが可能であることが示された。以上より、オーソログ CRISPR/Cas を受精卵に応用することで、従来法では標的とするのが困難な座位に対しても改変できることを明らかにした。

また、培養細胞においてオフターゲット効果の低減が認められた Cas9 変異体について、受精卵を介した変異導入における効果を評価した。野生型 *S. pyogenes* 由来 Cas9 を利用した際に受精卵においてオフターゲット変異が認められた Rosa26 座位に対する gRNA を eSpCas9, Cas9HF1, HypaCas9 変異体とともに導入した結果、全ての変異体において野生型に対して有意に低いオフターゲット変異が認められ、特に HypaCas9 は 1 塩基の違いも区別できる高い標的認識能が認められた。これまではオフターゲット効果が懸念される座位に対しては、オフセットニックング法などの 2 つの gRNA を必要とする方法で回避できたが、本研究で検討した Cas9 変異体を利用することで、標的に対する 1 つの gRNA のみでオフターゲットを回避して正確な変異導入した個体が作製できると期待される。

また、卵核胞期、成熟後、前核形成期のブタ卵母細胞に CRISPR/Cas を導入し、ゲノム改変効率を評価したところ、未成熟である卵核胞期では著しく効率が低いことが明らか

となった。導入した Cas9 の卵母細胞内局在を観察したところ、卵核胞内への局在が低いことが明らかとなった。小分子化合物を利用して核移行シグナルを制御したところ、卵核胞内への局在が上昇し、それに伴いゲノム改変効率が上昇した。以上の結果から、人工ヌクレアーゼによる未成熟卵母細胞での低い改変効率は核内移行の効率によることが示唆されたとともに、本研究によって未成熟卵母細胞でもゲノム改変が可能な新たな系の確率に成功した。

ノックインを行う場合、数百 nt 程度の短鎖 1 本鎖 DNA を利用した場合、200 ng/ μ L のような高濃度で受精卵に導入した場合でも発生能に影響は認められず、高いノックイン効率を示した。一方、トランスジェニックマウス作製などで利用される直鎖プラスミド DNA は、同程度の濃度で導入した場合、極めて初期で発生が停止する。また、環状プラスミド DNA で導入した場合も、直鎖よりは発生が進むものの、着床までに多くの卵は発生を停止する。そこで、導入する DNA の形態に着目し、同じ配列を持つ 1 本鎖および 2 本鎖 DNA を受精卵に導入したところ、これまでの検討通り、2 本鎖 DNA は著しい発生阻害を引き起こし、大部分は卵割が阻害された。導入後の受精卵について免疫染色を行ったところ、2 本鎖を導入した受精卵の前核内で γ H2A.X のシグナル上昇が認められた。そこで、 γ H2A.X 誘導キナーゼの一つである ATM の阻害を行うために、2 本鎖 DNA 導入卵を caffeine で処理したところ、2 本鎖による発生阻害が改善された。また、導入する 2 本鎖 DNA の末端のみを 1 本鎖とした DNA を導入した結果、平滑末端の 2 本鎖と比較して発生が改善した。以上の結果から、2 本鎖 DNA を受精卵に導入した場合、平滑 2 本鎖末端を ATM 経路が認識し、結果的に発生停止を誘導するという機構の存在が示唆された。1 本鎖 DNA 導入の場合は上記の経路の活性化は認められず、発生への影響も認められなかったことから、本研究計画で提案したような領域置換について、長鎖の 1 本鎖 DNA を利用することで数 kb 程度の置換は可能であると考えられた。しかし、短鎖 1 本鎖 DNA と比較して、1kb を超える塩基長の 1 本鎖 DNA を利用した場合、導入濃度依存的に発生阻害能が認められたため、そのような場合に受精卵内でどのような分子機構が関わっているかを今後検討していく必要がある。

続いて、長鎖配列のノックインを行う際に従来用いられている低濃度 2 本鎖 DNA によるノックイン効率の向上を目指し、受精卵における DNA 修復経路の制御による影響を検討した。はじめに、培養細胞および受精卵でノックイン効率の向上が報告された、Ligase IV 阻害剤である SCR7 による影響を検討したが、ノックイン効率の向上は認められず、既報の再現は出来なかった。既報では対象区のノックイン効率がそもそも著しく低いため、実験

条件の違いが影響したと推察される。また、ES 細胞においてノックイン効率の向上が報告された BreferdinA および L755507 についても検討したが、受精卵でのノックイン効率に対する影響は認められなかった。受精卵における DNA 修復経路そのものは十分に理解されておらず、そのような状況において培養細胞で示唆された方法の応用は有効な探索が困難であると考え、今後は、受精卵における DNA 修復経路そのものについて、遺伝子の影響を検討する予定である。そのためのツールとして、MRN 複合体形成遺伝子、RPA1-3、BRCA1、PolQ、53BP1、CYREN、Cdk2、Lig4、Blm、Exo1、Rad51、Rad52 の受精卵用発現コンストラクトを構築した。今後は、これらを利用した検討を進めていく予定である。

短鎖 1 本鎖 DNA による高効率なノックイン系を利用して、非モデル動物特異的な配列情報の置換マウスの作製と評価を実施した。ブタでは NR6A1 の 192 番目のアミノ酸残基の多型によって椎骨数が変化することが報告されている。そこで、マウスオーソログ座位に多型導入を行い、表現型への影響について検討を試みた。受精卵を介したノックインを行ったところ、標的座位の塩基置換が起こった胚の作製に成功し、胚盤胞期までの発生が認められた。一方、胚移植後の数日で発生停止し、満期発生は認められなかった。塩基置換胚から ES 細胞を樹立し、キメラ個体を作製したところ、寄与率の高い個体が得られたが、椎骨数への影響は認められなかった。以上の結果から、NR6A1 はマウスでは発生初期に重要な機能を持つことが予想され、標的塩基の置換はブタとは異なる影響を引き起こすことが示唆された。今度、マウスにおける内在性 NR6A1 機能探索を行うとともに、変異による遺伝子機能への影響を検討する予定である。

また、キリンにおいて Fgfr11 の複数のアミノ酸が近縁種のオカピをはじめとした幅広い哺乳動物と独立の置換を持つことが報告され、キリン特有の形質である首長との関連性が示唆された。そこで、マウスにおいてオーソログ座位の置換を行った。D257G/F258S/F262L/K265R/K271R/E281D 置換を導入したマウスの作出に成功した。しかし、形態や繁殖能などに目立った表現型は認められなかった。今後、遺伝子機能についての解析を進めるとともに、キリン培養細胞を入手したため、キリンゲノム背景において標的アミノ酸置換による Fgfr11 と関連遺伝子の発現・機能への影響を検証する予定である。

以上の結果より、本研究によって、標的座位に対して効率よく配列置換したマウスの作製を行うための方法の拡張に成功した。一方、外来 DNA の形態によって受精卵内で発生停止機構が活性化することから、長鎖配列のノックインを効率化するためには、受精卵における関連シグナルの抑制方法を考案する必要がある。2 本鎖 DNA による ATM シグナル

活性化に関する本研究の発見は今後の検討の一助になると期待される。

また、実証実験として非モデル動物における多型情報の再現を検討し、マウスにおける有効性と課題を新たに見出した。非モデル動物において期待された表現型が認められなかった場合は、標的配列が期待する表現型との関連を持たなかった結果であるか、それともマウスゲノム背景で実施したためかを見極める必要が生じる。従って、異種間キメラやオルガノイド培養系など、対象とした非モデル動物の遺伝背景で簡便に評価できる実験系を開発し、これらと複合的に検討を進めることで、オーソログ配列の機能評価についてより正確な検討が可能となると期待される。

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 19 件)

Yang Q, Fujii W, Kaji N, Kakuta S, Kada K, Kuwahara M, Tsubone H, Ozaki H, Hori M., The essential role of phospho-T38 CPI-17 in the maintenance of physiological blood pressure using genetically modified mice., FASEB J, 32巻、2095-2109、2018、doi:

10.1096/fj.201700794R

Mizobuchi H, Fujii W, Ishizuka K, Wang Y, Watanabe S, Sanjoba C, Matsumoto Y, Goto Y., MRP14 is dispensable for LPS-induced shock in BALB/c mice., Immunol Lett., 194巻、13-20、doi: 10.1016/j.imlet.2017.12.003.

Fujii W, Ikeda A, Sugiura K, Naito K., Efficient generation of genome-modified mice using Campylobacter jejuni-derived CRISPR/Cas., Int J Mol Sci., 18巻、2286、2017

Omachi S, Fujii W, Azuma N, Morimoto A, Sanjoba C, Matsumoto Y, Goto Y., B-cell activating factor deficiency suppresses splenomegaly during Leishmania donovani infection., Biochem Biophys Res Commun, 489巻、

528-533、2017、doi:

10.1016/j.bbrc.2017.06.005.

藤井 渉、非モデル動物の分子遺伝学研究に資する最近の発生工学ツール., 動物遺伝育種研究., 45巻、19-30., 2017

Onuma A, Fujii W, Sugiura K, Naito K, Efficient mutagenesis by CRISPR/Cas system during meiotic maturation of porcine oocytes, J Reprod Dev, 査読有、63巻、2017、45-50、

DOI:10.1262/jrd.2016-094

藤井 渉、非モデル動物の分子遺伝学研究に資する最近の発生工学ツール、動物遺伝育種研究、査読有、45巻、2017、19-30

Fujii W, Kakuta S, Yoshioka S, Kyuwa S, Sugiura K, Naito K, Zygote-mediated generation of genome-modified mice using Streptococcus thermophiles 1-derived CRISPR/Cas system, Biochem Biophys Res Commun, 査読有、477巻、2016、473-476、

DOI:10.1016/j.bbrc.2016.06.070

Imai H, Fujii W, Kusakabe KT, Kiso Y, Kano K., Effects of whole genome duplication on cell size and gene expression in mouse embryonic stem cells., J Reprod Dev, 62巻、571-576、2016.

藤井 渉、農学的利用に向けたゲノム編集の現状・将来の展望、化学と生物、査読有、54巻、568-574、2016

Fujii W, Onuma A, Yoshioka S, Nagashima K, Sugiura K, Naito K, Finding of a highly efficient ZFN pair for Aqep gene functioning in murine zygotes, J Reprod Dev, 査読有、61巻、2015、589-593、DOI:10.1262/jrd.2015-087

Yoshioka S, Fujii W, Ogawa T, Sugiura K, Naito K, Development of a mono-promoter-driven CRISPR/Cas9

system in mammalian cells, Scientific Reports, 査読有、5巻、2015、18341、DOI:10.1038/srep18341

藤井 渉、マウス個体でのゲノム編集(1)

効率よく正確なゲノム改変を施すには、医学のあゆみ、査読有、252巻、2015、159-163

Fujii W, Onuma A, Sugiura K, Naito K., One-step generation of phenotype-expressing triple-knockout mice with heritable mutated alleles by the CRISPR/Cas9 system., J Reprod Dev, 60巻、324-327、2014

Nakamura K, Fujii W, Tsuboi M, Tanihata J, Teramoto N, Takeuchi S, Naito K, Yamanouchi K, Nishihara M., Scientific Reports, 4巻、5635、2014

藤井 渉、CRISPR/Cas RNA注入によるゲノム改変マウスの作製、JSI Newsletter, 22巻、29、2014

角田 茂、藤井 渉、ノックアウトマウスの基礎と応用、小児外科、46巻、567-570、2014

角田 茂、藤井 渉、遺伝子改変動物の最新事情、LAB1021、57巻、16-19、2014

藤井 渉、ゲノム編集へのいざない-培養細胞・マウス個体でのゲノム編集入門、JSICR Newsletter、査読なし、38巻、36-42、2014

[学会発表](計 19 件)

藤井 渉、ゲノム編集技術の最前線と応用、第 9 回生殖補助医療胚培養士セミナー、2017 年 9 月 17 日、TFT ビル東館(東京都)

藤井 渉、ゲノム編集技術の現状と疾患モデル動物作製への応用、2017 年 9 月 15 日、Basic Biology Seminar In Okayama (岡山県)

藤井 渉、ゲノム編集技術の基礎と応用 実践に必要な知識や注意点および応用技術の現状、2017 年 6 月 22 日、滝野川会館(東京都)

藤井 渉、ゲノム編集による 遺伝子組換え動物作製の基礎と応用、第 381 回川崎医学会講演会、2017 年 2 月 9 日、川崎医

科大学(岡山県)

Fujii W, Generation of genome-modified animals using engineered endonucleases, Insulin-like Signaling and Nutrient Signaling: universal signaling for extension of healthy lifeplan and improvement of quality for human and animals, 2017 年 1 月 26 日、東京大学(東京都)

藤井 渉、ゲノム編集による遺伝子組換え動物作製の基礎と応用、第 63 回日本実験動物学会総会、2016 年 5 月 18 日、ミューザ川崎(神奈川県)

藤井 渉、動物ゲノム編集研究の現状と展望、第 91 回実験動物コンファレンス、2015 年 12 月 12 日、日本獣医生命科学大学(東京都)

藤井 渉、ゲノム編集技術による遺伝子組換え動物作出の現状と展望、京都大学霊長類研究所&中部幹細胞クラブ 研究会 第二回「霊長類への展開に向けた幹細胞・発生・エピゲノム研究」、2015 年 9 月 1 日、京都大学霊長類研究所(愛知県)

藤井 渉、CRISPR/CAS システムを利用した遺伝子改変マウス作製の実際、2015 年 7 月 31 日、東京大学(東京大学)

藤井 渉、人工ヌクレアーゼによるゲノム改変動物作製法の現状と展望、2015 年 6 月 26 日、名古屋大学(愛知県)

藤井 渉、ゲノム編集による遺伝子組換え動物作製の現状と課題、第 62 回日本実験動物学会総会、2015 年 5 月 29 日、京都テルサ(京都府)

藤井 渉、ゲノム編集による遺伝子組換え動物作製の現状と課題、第 62 回日本実験動物学会総会、2015 年 5 月 29 日、京都テルサ(京都府)

藤井 渉、人工ヌクレアーゼによるゲノム改変動物の作製、細胞センサーの分子機構・相互関連・ネットワーク研究会、2014 年 12 月 4 日、生理学研究所(愛知県)

藤井 渉、CRISPR/Cas システムを利用したゲノム編集、「細胞を創る」研究会 7.0、2014 年 11 月 14 日、東京大学(東京都)

藤井 渉、人工ヌクレアーゼによるゲノム改変動物の作製、2014 年 7 月 15 日、農業生物資源研究所(茨城県)

藤井 渉、人工ヌクレアーゼによるゲノム改変動物の作製、2014 年 6 月 3 日、東北大学 農学部(宮城県)

Fujii W, Generation of genome-modified animals using CRISPR/Cas system, 2014 年 5 月 28 日、Tzu Chi University (Taiwan)

Fujii W, How to Generate the genome-modified animals using CRISPR/Cas system, 2014 年 5 月 27 日、Institute of Molecular Biology, Academia Sinica (Taiwan)

Fujii W, Generation of genome-modified

animals using CRISPR/Cas system、2014
年5月27日、Institute of Molecular
Biology, Academia Sinica (Taiwan)

〔図書〕(計 2 件)

Fujii W、Generation of Knock-in Mouse
by Genome Editing、Methods Mol Biol、
1630 卷、91-100、2017

藤井 渉 他、エヌ・ティー・エス出版、
進化するゲノム編集技術、2015、386
(133-141)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/iden/>

<http://wtrfujii.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 渉 (FUJII, Wataru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：40708161