

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870845

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9システムによる時期および組織特異的遺伝子機能解析法の開発

研究課題名(英文) Development of a new method for spatiotemporal gene function by the CRISPR/Cas9 system

研究代表者

太田 聡 (OTA, Satoshi)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号：60553310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では時期及び組織特異的に遺伝子機能を解析するために、Gal-UASシステムによりCas9を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製した。しかしながら、Cas9を発現するトランスジェニック系統において効率的なゲノムの改変は認められなかった。おそらく、Cas9が機能的なレベルまで発現していなかったと考えられる。

また、CRISPR/Cas9を用いた新たな遺伝子の解析手法を開発した。具体的には標的遺伝子座の開始コドンの直前にGFP遺伝子を挿入することで、遺伝子発現の可視化と機能阻害を同時に行うことに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated transgenic zebrafish that expresses nuclease Cas9 under control of the UAS promoter. However, guide RNA injection in transgenic embryos that express GFP did not induce insertion or deletion mutations at the target locus.

We also developed a new method for analyzing gene function and expression using CRISPR/Cas9. We inserted the donor vector containing a heat-shock promoter and GFP into the 5'-untranslated region of the pax2a locus. These embryos expressed GFP at the region where endogenous pax2a expresses. We found that homozygous transgenic embryos presented the pax2a mutant phenotype. Thus, targeted insertion of the reporter gene at the endogenous gene is useful for analyzing gene expression and function.

研究分野：発生生物学

キーワード：CRISPR/Cas9 ゼブラフィッシュ ノックイン トランスジェニック 遺伝子破壊 ノックアウト Gal4-UAS

1. 研究開始当初の背景

ゼブラフィッシュは発生が速い、多産、体外受精、初期胚が透明、遺伝子導入が容易であるといった特徴から発生生物学において優れたモデル生物であったが、ES 細胞が樹立されていないため逆遺伝学的手法は利用できなかった。近年、TALEN や CRISPR/Cas9 といったゲノム編集技術が発展してきたため、ゼブラフィッシュを含む多数のモデル生物でも逆遺伝学的手法によって遺伝子機能を解析できるようになった。

私たちが国内でいち早くゼブラフィッシュにおけるゲノム編集の適用に着手し、TALEN および CRISPR/Cas9 によるゼブラフィッシュゲノムの改変に成功していた。CRISPR/Cas9 は TALEN と異なり標的遺伝子座を指定する guide RNA (gRNA) とヌクレアーゼ Cas9 が独立したシステムとなっている。TALEN や CRISPR/Cas9 による標的遺伝子座の 2 本鎖切断は生物細胞が持つ DNA 修復機構により修復される。2 本鎖切断を直接つなぎ合わせる非同末端結合はエラーが生じやすく結果として 2 本鎖切断カ所に塩基の挿入・欠失変異が誘導される。2 本鎖切断カ所の周囲と相同な DNA が存在する場合にはこの DNA を利用した相同組み換え修復も行われる。これを利用して外来 DNA の挿入(ノックイン)も可能となる。最近、相同組み換えによらないノックインも報告されており、東島博士らはこれを利用したトランスジェニックゼブラフィッシュの作製法を樹立した。

Gal4-UAS システムは酵母の転写因子 Gal4 とその標的配列 UAS を利用し目的の遺伝子を組織特異的に発現させる方法である。ゼブラフィッシュにおける Gal4-UAS システムの開発は遺伝学研究所の川上博士らにより進められ、様々な領域で Gal4 を発現する遺伝子トラップシステムが作製されている。

研究開始当初、ゼブラフィッシュにおけるゲノム編集は個体丸ごとで行われていた。機能を調べたい遺伝子が発生初期に特に重要だった場合、その変異体は初期に重篤な異常をきたし、発生後期や成体での機能が調べにくい可能性がある。これを克服するためには時期や組織特異的に遺伝子機能を阻害すれば良いと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では CRISPR/Cas9 と Gal4-UAS システムを組み合わせることで、新たな時期および組織特異的遺伝子機能解析法を開発することを目的とした。

また、後述するように残念ながら特定の組織において効率良くゲノム編集を行うことができなかったため、CRISPR/Cas9 を用いた蛍光タンパク質遺伝子のノックインによる遺伝子発現の可視化と遺伝子機能阻害を同時に行う方法を樹立することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 野生型および変異体型 Cas9 を発現するトランスジェニックシステムの作製

Cas9-mCherry 融合型

Cas9 は活性ドメインを 2 つ保持しており、その内 1 カ所に変異を導入すると一本鎖を切断するニッケースになり、2 カ所に変異を導入すると酵素活性を持たない不活性型となることが知られている。本研究においてもニッケース Cas9 (Cas9-D10A 変異体)、不活性型 Cas9 (Cas9-D10A/H840A 変異体) を作製し、野生型 Cas9、ニッケース Cas9、不活性型 Cas9 について、UAS プロモーターの制御下で発現するような遺伝子コンストラクトを作製した。このとき、コンストラクトの導入が蛍光顕微鏡下で判別できるように、Cas9 の下流には mCherry が連結してある。さらに、Cas9 と mCherry は 2A ペプチドで連結してあり、翻訳後に両者が分離するように工夫した。このコンストラクトをゼブラフィッシュ受精卵に注入し、*Tg(UAS:Cas9-2A-mCherry)* を作製した。

Cas9、mCherry 独立型

このコンストラクトでも最終的に Cas9 と mCherry は分離するはずだが、mCherry や 2A ペプチドが Cas9 の活性に影響を与える可能性がある。したがって、Cas9 と mCherry が独立して転写されるコンストラクトについてもその後作製した。このコンストラクトは UAS-Cas9-polyA 配列の下流に *cmlc2* プロモーター-mCherry-polyA 配列が逆向きに連結してある。このコンストラクトをゼブラフィッシュ受精卵に注入し、*Tg(UAS:Cas9;cmlc2:mCherry)* を作製した。

(2) CRISPR/Cas9 による GFP のノックイン
本研究ではラット *Mcr4* 遺伝子由来の CRISPR/Cas9 標的配列である Mbait、ヒートショックプロモーター-hsp70、GFP を持つ Mbait-hs-GFP (東島博士より供与) をドナーとして使用した。このドナー DNA を *pax2a*-gRNA、Mbait-gRNA、Cas9 mRNA とともにゼブラフィッシュ受精卵へと注入した。

4. 研究成果

(1) *Tg(UAS:Cas9-2A-mCherry)* の作製

時期および組織特異的なゲノム編集を実現するために UAS プロモーターの制御下で Cas9 を発現するトランスジェニックシステムを作製した。まず、UAS-Cas9-2A-mCherry 遺伝子コンストラクトを作製した。Cas9-mCherry の融合タンパク質は翻訳後に 2A 自己開裂ペプチドの箇所切断されて分離する。このコンストラクトをゼブラフィッシュ受精卵へ注入し、成魚へと成長させた。これらのポテンシャルファウンダーを野生型と掛け合わせ

Tg(UAS:Cas9-WT-2A-mCherry)、*Tg(UAS:Cas9-D10A-2A-mCherry)*、*Tg(UAS:Cas9-D10A/H840A-mCherry)* それぞれについて mCherry 陽性の子孫を残すファウンダーを同定した。初めて *Tg(UAS:Cas9-WT-2A-mCherry)* において、Cas9 mRNA を注入しなくても自身が発現する Cas9 によって標的遺伝子座の 2 本鎖切断を引き起こせるか検討した。様々な領域で Gal4 を発現するトランスジェニック系統がすでに作製されているが、本研究では全身で Gal4 を発現する *Tg(SAGFF(LF)73A)* を使用した。SAGFF(LF)73A 遺伝子と UAS:Cas9-WT-2A-mCherry 遺伝子を持っている個体は gRNA を注入するだけで 2 本鎖切断を誘導できると考えられる。標的遺伝子として色素形成に必要なチロシナーゼ遺伝子 (*tyrosinase*) および *golden* 遺伝子、心臓前駆細胞の移動に必要なスフィンゴ酸-1-リン酸受容体遺伝子 (*s1pr2*) および *spns2* 遺伝子を選択し、5 種類の gRNA 作製した (*spns2* 遺伝子については 2 つ)。 *Tg(SAGFF(LF)73A)* と *Tg(UAS:Cas9-WT-2A-mCherry)* の掛け合わせから得られた受精卵に 5 gRNAs を注入したが色素形成の異常や心臓形成の異常は観察されなかった。PCR ジェノタイピングの結果でもこれらの 5 か所の遺伝子座に挿入・欠失変異は検出されなかった。おそらく、Cas9 の発現が機能的なレベルまで達していなかったと考えられる。

(2) *Tg(UAS:Cas9; cmlc2:mCherry)* の作製

Tg(UAS:Cas9-2A-mCherry) は一時的には Cas9 と mCherry の融合タンパク質になるため、Cas9 が効率良く発現しなかった可能性がある。したがって、これを改善するために、Cas9 と mCherry が別々の転写産物として生成されるコンストラクト UAS:Cas9; *cmlc2:mCherry* を作製した。 *cmlc2* は心臓特異的なプロモーターであり、UAS:Cas9 が挿入されたゼブラフィッシュ個体は心臓での mCherry の発現により判断できる。UAS:Cas9; *cmlc2:mCherry* をゼブラフィッシュ受精卵へ注入し成魚へと成長させた。これらのファウンダーを野生型と掛け合わせ、心臓で mCherry を発現する F1 を得た。 *Tg(SAGFF(LF)73A)* と *Tg(UAS:Cas9;*

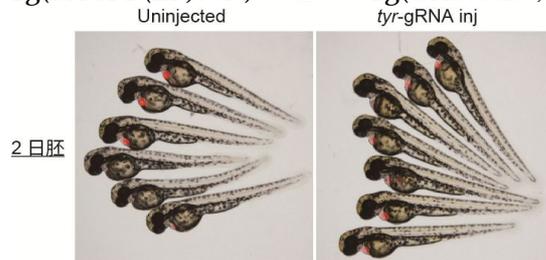


図 1. *Tg(UAS:Cas9; cmlc2:mCherry)* *Tg(SAGFF(LF)73A)* と *Tg(UAS:Cas9; cmlc2:mCherry)* との掛け合わせから得られた受精卵に *tyr-gRNA* を注入したが、色素形成の異常は観察されなかった。心臓が赤く光っている個体は UAS:Cas9; *cmlc2:mCherry* を持っている。

cmlc2:mCherry) の掛け合わせから得られた胚に *tyr-gRNA* を注入したが、色素形成の異常は認められなかった。PCR ジェノタイピングの結果、*tyrosinase* 遺伝子座に挿入・欠失変異は認められなかった。 *Tg(UAS:Cas9; cmlc2:mCherry)* も Cas9 の発現が低いいため標的ゲノムを切断することができなかったと考えられる。

(3) Mbat-hs:GFP の *pax2a* 遺伝子座への挿入

最近、東島博士らにより CRISPR/Cas9 を用いたノックインによる効率的なトランスジェニック動物の作製法が報告された。しかしながら、この方法で遺伝子機能を阻害できるかどうかは調べられていなかった。本研究では CRISPR/Cas9 を用いたノックインにより、遺伝子発現の可視化と遺伝子機能阻害が同時に行えるか検討した。

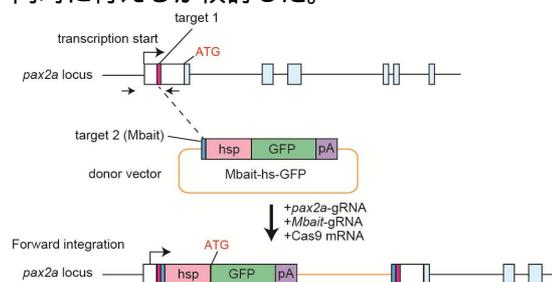


図 2. CRISPR/Cas9 によるレポーター遺伝子の挿入 (ノックイン) gRNA/Cas9 によりゲノムとドナーベクターの切断が同時に起きると一定の確率で相同組み換え非依存的な DNA 修復によりドナーベクターがゲノムの標的領域へ挿入される。

標的遺伝子としてはその発現と機能がよく知られている *pax2a* 遺伝子を選択した。 *pax2a* は paired-box 型の転写因子をコードしており、眼柄、中脳後脳境界 (MHB)、耳胞、後脳および脊髄神経細胞、前腎で発現する。ゼブラフィッシュ *pax2a* 変異体は *no isthmus (noi)* として知られているが、この変異体では局所オーガナイザーの MHB が消失する。本研究では非相同末端結合による挿入・欠失変異とドナーベクターの挿入による遺伝子破壊を区別するために *pax2a* の 5' 側非翻訳領域を標的とした。

ドナーは CRISPR/Cas9 によって切断を受ける Mbat、ヒートショックプロモーター *hsp70*、GFP を含む Mbat-hs-GFP を使用した。この Mbat-hs-GFP を Mbat-gRNA、*pax2a-gRNA*、Cas9 mRNA とともにゼブラフィッシュ受精卵へ共注入したところ、受精後 1 日胚において眼柄、MHB、耳胞、後脳神経細胞、前腎での GFP の発現が観察された。Mbat-hs-GFP が挿入された *pax2a* 対立遺伝子は *pax2a* の機能を失っていると考えられるが、GFP 陽性個体においても MHB は正常に形成されていた。おそらく F0 胚では *pax2a* 遺伝子座に Mbat-hs-GFP が挿入されている割合は少なく、変異体の表現型を示すまでは至らなかったと考えられる。GFP 陽性個体からゲノム DNA を抽出し、PCR およびシーケンス解析により実際に *pax2a* 遺伝子座に Mbat-hs-GFP が挿入されていること

を確認した。

(4) *Tg(pax2a-hs:GFP)*の樹立と表現型の解析
ドナー、gRNA、Cas9 mRNAの共注入胚から GFP 陽性個体を成魚へと成長させた。これらポテンシャルファウンダーを野生型と掛け合わせたところ、20匹のポテンシャルファウンダーの内1匹が次世代(F1)へと挿入遺伝子 *pax2a-hs:GFP* をのこすことが明らかになった(transmission rate: 46/142, 32%)。その後 F1 世代の中から *pax2a-hs:GFP* を持つ魚を同定し、*Tg(pax2a-hs:GFP)*を樹立した。*Tg(pax2a-hs:GFP)*胚では眼柄、MHB、耳胞、後脳および脊髄神経細胞、前腎での GFP の発現が観察された。異所的な GFP 発現は検出されておらず、*Tg(pax2a-hs:GFP)*はほぼ完全に内在 *pax2a* の発現を再現していると考えられる。

続いてヘテロ *Tg(pax2a-hs:GFP)*個体を掛け合わせることでホモ *Tg(pax2a-hs:GFP)*個体の解析を行った。ホモ *Tg(pax2a-hs:GFP)*胚では *pax2a* 変異体と同様に MHB の消失が観察された。PCR ジェノタイピングおよびシーケンス解析の結果、調べた中で MHB の消失を示した個体はすべてホモ *Tg(pax2a-hs:GFP)*であった。以上の結果から、CRISPR/Cas9 を用いたレポーター遺伝子のノックインにより標的遺伝子発現の可視化と機能阻害が同時に行えることが明らかになった。この方法はスクリーニングが容易である。変異体において異常が起きている器官を GFP により追跡できる。といった利点があり、変異体の作製法として有用だと考えられる。

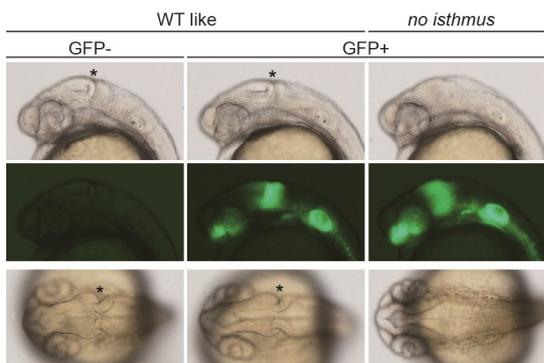


図3. *Tg(pax2a-hs:GFP)*
*Tg(pax2a-hs:GFP)*の F1 ヘテロ個体同士の掛け合わせから得た F2 において表現型の解析を行った。その結果、約 21%の胚で *no isthmus* と同じ MHB 消失の表現型が観察された。★は MHB を示す。

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 6 件)

Kawahara A, Hisano Y, Ota S, Taimatsu K. Site-specific integration of exogenous genes using genome editing technologies in zebrafish.

International Journal of Molecular Sciences 17, 727. 2016. 査読有
DOI: 10.3390/ijms17050727

Hisano Y, Inoue A, Taimatsu K, Ota S, Ohga R, Kotani H, Muraki M, Aoki J, Kawahara A. Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish. Genes to cells 20, 647-658. 2015. 査読有
DOI: 10.1038/srep08841

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. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0128319

Ota S, Hisano Y, Ikawa Y, Kawahara A. Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish. Genes to cells 19, 555-564. 2014. 査読有
DOI: 10.1111/gtc.12154

Ota S, Kawahara A. Zebrafish: a model vertebrate suitable for the analysis of human genetic disorders. Congenital anomalies 54, 8-11. 2014. 査読有
DOI: 10.1111/cga.12040

Hisano Y, Ota S, Kawahara A. Genome editing using artificial site-specific nucleases in zebrafish. Development, growth & differentiation 56, 26-33. 2014. 査読有
DOI: 10.1111/dgd.12094

〔学会発表〕(計 9 件)

Satoshi Ota, Kiyohito Taimatsu, Rie Ohga, Atsuo Kawahara. Targeted insertion of a reporter construct using CRISPR/Cas9. 第 21 回小型魚類研究会、2015 年 9 月 19 日-20 日、大阪大学(大阪府吹田市)

Rie Ohga, Kiyohito Taimatsu, Hirohito Kotani, Satoshi Ota, Atsuo Kawahara. Multiple genome modifications induced by a ready-to-use CRISPR/Cas9 system in zebrafish. 第 21 回小型魚類研究会、2015 年 9 月 19

日-20日、大阪大学（大阪府吹田市）

Satoshi Anai, Satoshi Ota, Shizuka Ishitani, Tohru Ishitani. Spatially restricted Rel/NF-kappaB activation directs dorsal-ventral patterning of the zebrafish embryo. 第21回小型魚類研究会、2015年9月19日-20日、大阪大学（大阪府吹田市）

Kiyohito Taimatsu, Hirohito Kotani, Rie Ohga, Satoshi Ota, Atsuo Kawahara. Multiple genome modifications induced by crRNAs, tracrRNA and Cas9 protein in zebrafish. 第48回日本発生物学会大会、2015年6月2日-5日、つくば国際会議場（茨城県つくば市）

Satoshi Anai, Satoshi Ota, Shizuka Ishitani, Tohru Ishitani. The NFkappaB transcription factor Rel fine-tunes dorsal-ventral pattern of zebrafish early embryos. 第48回日本発生物学会大会、2015年6月2日-5日、つくば国際会議場（茨城県つくば市）

穴井 諭、太田 聡、石谷 太、NFkappaB ファミリーの転写因子 c-Rel は Admp の発現制御を介して脊椎動物初期胚の背腹軸形成を制御する、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日-27日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

久野 悠、佐久間哲史、太田 聡、王賀理恵、岡本 仁、山本 卓、川原敦雄、CRISPR/Cas9 システムを用いた精巧な遺伝子導入技術の開発、第4回ゲノム編集研究会、2014年10月6日-7日、広島国際会議場（広島県広島市）

Yu Hisano, Satoshi Ota, Hitoshi Okamoto, Atsuo Kawahara. Precise genome-editing using CRISPR/Cas9 system. 第20回小型魚類研究会、2014年9月20日-21日、慶応義塾大学薬学部（東京都）

Satoshi Anai, Satoshi Ota, Tohru Ishitani. The NF-kappaB transcription factor c-Rel regulates Zebrafish dorsal-ventral patterning. 第20回小型魚類研究会、2014年9月20日-21日、慶應義塾大学薬学部（東京都）

〔図書〕(計 2 件)

太田 聡、川原敦雄 他、エヌ・ティー・エス、進化するゲノム編集技術、担当分第2編 第2章 第3節「ゼブラフィッシュにおけるゲノム編集」2015年10月、p.191-199

太田 聡、川原敦雄 他、羊土社、実験医学 2014年7月号 Vol.32 No.11 ゲノム編集法の新常識！CRISPR/Cas が生命科学を加速する、担当分「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」2014年7月、p.1721-1725

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 聡 (OTA Satoshi)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号：60553310