

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26640056

研究課題名(和文) CRISPR/CASシステムを用いたミトコンドリア遺伝子改変技術の開発

研究課題名(英文) Mitochondrial genome editing using CRISPR/Cas9 system

研究代表者

伊川 正人 (Ikawa, Masahito)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：20304066

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)：エネルギー産生などに重要な細胞内小器官であるミトコンドリアには、細胞核と独立したゲノムDNAが含まれる。また、ミトコンドリアDNAに変異があると、様々な病態を引き起こすことが知られている。今回、我々は最新の標的遺伝子組換え技術であるCRISPR/CAS9システムを活用することで、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の標的遺伝子組換え技術を開発することを試みた。ES細胞でのミトコンドリア遺伝子破壊を試みたが、残念ながら、標的遺伝子が破壊された細胞株を得ることができなかった。今後は、ES細胞を用いて処理数を増やすと同時に、ミトコンドリア移行効率を上げるなどの、戦略変更の必要があると結論した。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrion is an intracellular organelle that produce the energy and regulate cellular metabolism. Its damage and subsequent dysfunction causes a range of diseases, such as neurological disorders. In the present study, we applied the newest gene manipulation technology, CRISPR/Cas9 system, for mitochondrial gene modification. We replaced nuclear localization signal with mitochondrial targeting signal and examined its feasibility for mitochondrial gene targeting but it did not work in ES cells. To increase the number of trials without sacrificing many animal lives, we need to reconsider the strategy.

研究分野：実験動物学

キーワード：CRISPR/Cas 実験動物 ノックアウト 点変異 ノックイン 不妊

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子機能を個体レベルで解析するために、目的遺伝子を破壊したノックアウト (KO) マウスが汎用され、確実に成果を挙げてきた。しかし KO マウスの作製は容易ではなく、ターゲティングベクターの構築や胚性幹 (ES) 細胞を介したキメラマウス作製など、高度な技術や多大な労力・時間・費用がかかる問題点があった。ところが最近になって、人工制限酵素を受精卵に注入することで、標的遺伝子を組換えたマウス個体を直接、作製する方法が開発された。なかでも RNA をガイドに標的配列を認識して切断する CRISPR/CAS システムは、簡便で効率良く標的遺伝子組換えするものであり (Wang et al., Cell 2013)、我々も半年間で 30 を超える遺伝子の KO マウス作製に成功している。

個体レベルでのゲノム DNA の標的遺伝子組換え技術が著しい進展を迎える一方、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の遺伝子組換えは困難な状況のままである。そもそも 1 細胞に数千含まれるミトコンドリアの mtDNA を一つずつ相同組換えすることは不可能であり、変異 mtDNA を含むミトコンドリアを細胞質移植により少しずつ置換するなど古典的な方法に留まっている。

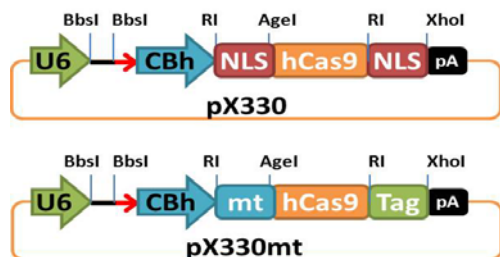
### 2. 研究の目的

本研究では、最新の標的遺伝子組換え技術である CRISPR/CAS システムを活用することで、これまで不可能とされたミトコンドリア DNA (mtDNA) の標的遺伝子組換え技術を開発する。さらに、その応用としてミトコンドリア病の疾患モデル作製を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) ミトコンドリア標的 CAS9 の開発

現在、汎用される CAS9 はゲノム DNA を組換えることを目的に作られているため、N 末と C 末の両端に核移行シグナル (NLS) が付加されている。我々が 30 系統の遺伝子破壊に用いた pX330 プラスミドベクターも例外ではない。そこで pX330 をベースに、ミトコンドリア移行シグナル付き CAS9 (mtCas9) と、標的配列を認識する sgRNA を同時に発現する pX330mt を構築する (図 1)。



【図 1】 pX330 の核移行シグナル (NLS) を、ミトコンドリア移行シグナル (mt) および FLAG や EGFP などのタグと置換した pX330mt を構築する。

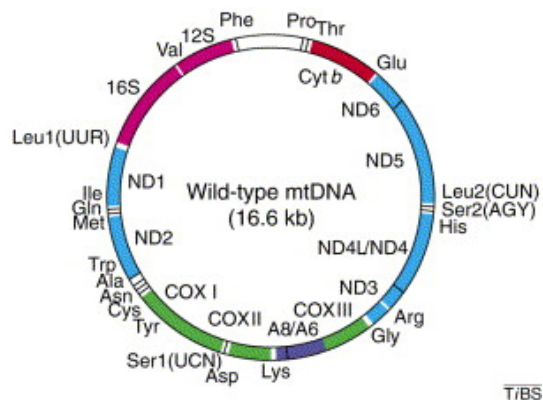
① ミトコンドリア標的シグナルの最適化  
ミトコンドリアは外膜と内膜により細胞質と仕切られており、内腔に CAS9 を局在させるには 2 段階で働くシグナルペプチドが必要となる。我々は DsRed2 蛍光タンパク質をミトコンドリアに局在させた経験があり、スムーズに実験が遂行できる。

② 変異同定とオフターゲット解析  
1 細胞に含まれるゲノム DNA が 2 コピーであるのに対し、mtDNA は数百数千コピーにもなる。そのため細胞をクローン化してもミトコンドリアは混在した状態 (ヘテロプラスミー) となり、変異率が低い場合には同定が難しい。そこで PCR と次世代シーケンサーを組み合わせたアンプリコン解析により、低頻度の変異同定を行う。

また最近、標的でない部分 (オフターゲット) における変異導入が問題視されている。我々の経験では、標的ゲノム遺伝子の変異率が 50% に対し、オフターゲットの変異率は 1% 以下と殆ど無視できるものであった。しかしミトコンドリアに於いてはコピー数が多く、オフターゲット変異を無視することはできない。そこで、必要に応じて、次世代シーケンサーを用いたアンプリコン解析により、mtDNA の全配列を決定し、目的外変異を同定する。

#### (2) II. ミトコンドリア遺伝子組換えシステムの開発

mtDNA のサイズは全長で約 16,500 塩基と小さく、37 遺伝子しかコードされていない (図 2)。本課題では、ヒトとマウスで良く保存されている ND5 (NADH デヒドロゲナーゼ) を標的として mtDNA を組換える。Nd5 は精神障害や糖尿病、心筋症などを伴う MELAS 症候群やリー脳症の原因遺伝子としても知られる。



【図 2】 ヒト mtDNA マップ。13 個の呼吸酵素複合体サブユニットと、22 個の tRNA、2 個の rRNA がコードされている。テストケースとして約 3 時の方向にある Nd5 遺伝子を標的とする。

① 標的配列の選択とベクター構築  
Nd5 遺伝子中の PAM (NGG) 配列を検索し、すぐ上流 20 塩基を sgRNA 配列とする。Bowtie ソフトにより sgRNA の 3' 側 13 塩基と PAM 配列が一致する遺伝子座をオフターゲット候補とし、その数が少ないものを選別する。次に pX330 の BbsI サイトに sgRNA 配列 20 塩基を導入し、我々の開発した核内 DNA 切断アッセイ系により切断効率の良い物を選択する。次に活性の高い sgRNA を 2 つ選別し、pX330mt に載せ換える。

② 個体レベルでのミトコンドリア遺伝子組換え  
活性の高かった pX330mt プラスミドをマウス受精卵に注入する。プラスミドを環状で注入すればゲノムに組み込まれにくい特性を生かし、一過性に発現した sgRNA と mtCAS9 がミトコンドリア遺伝子を切断することが予想される。まずは受精卵を培養して胚盤胞期胚で mtDNA を抽出し、アンプリコン解析により変異率を同定する。残りの受精卵は偽妊娠マウスに移植して発生させ、得られた子供の mtDNA を解析する。

③ バックアッププラン  
環状プラスミドを注入した一過性の発現量では変異率が低い可能性も考えられる。その場合には、直線化した pX330mt を注入することで、トランスジェニック (Tg) マウスを作製し、恒常的に sgRNA と mtCAS9 を供給する。恒常的な標的遺伝子破壊が繰り返されることで、数千コピーであっても変異率が上昇する。また受精卵の注入では上手くいかない場合には、ES 細胞での変異導入を試みる。一過性に高発現させた後にクローン化して変異 mtDNA 含有率の高い株を同定する。目的変異を有する ES 細胞からキメラ動物を介して個体復元が可能であるだけでなく、変異ミトコンドリアを大量調整して受精卵に移植して個体復元することもできる。

#### 4. 研究成果

##### (1) ミトコンドリア標的 CAS9 の開発

現在、汎用される CAS9 はゲノム DNA を組換えることを目的に作られているため、N 末と C 末の両端に核移行シグナルが付加されていた。そこで pX330 をベースに、ミトコンドリア移行シグナル付き CAS9 と、標的配列を認識する sgRNA を同時に発現する pX330mt を構築した。

ミトコンドリア遺伝子組換えシステムの開発：mtDNA のサイズは全長で約 16,500 塩基と小さく、37 遺伝子しかコードされていない。本課題では、ヒトとマウスで良く保存されている ND5 (NADH デヒドロゲナーゼ) を標的として mtDNA を組換えることを試みた。

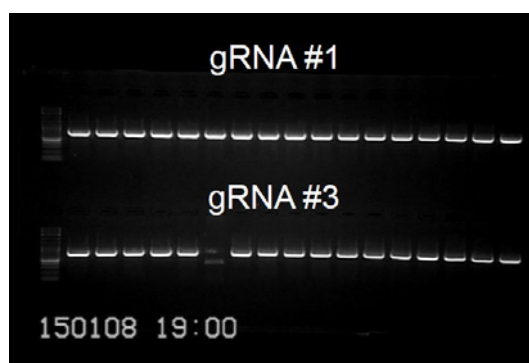
まず sgRNA を 4 つデザインし、我々の構

築した HEK293 細胞を用いた核内 DNA 切断アッセイ系で比較したところ、#1 と #3 が高い活性を示した。

##### (2) II. ミトコンドリア遺伝子組換えシステムの開発

前述の #1, #3 の sgRNA 配列を pX330mt に移し変えた pX330mt-ND5#01, #03 をこうちくした。研究費の減額に伴い、受精卵での実験を断念し、ES 細胞での検討を行った。ES 細胞に pX330mt-ND5#01, #03 をリポフェクタミン試薬により導入し、安定的に遺伝子導入されたクローンを 16 個ずつ単離した。各クローン細胞を増やした後、ミトコンドリア DNA を抽出し、Nd5 標的配列を含む領域を PCR により増幅し、シーケンス確認したが、標的部位が切断された ES クローンが得られなかった (図 3)。

何度か追試したものの、同様の結果が得られたため、mtDNA の切断および編集には、戦略の変更が結論した。



【図 3】 ND5 遺伝子を標的とする 2 種類の gRNA をデザインして pX330mt-ND5 を作製。ES 細胞に導入して標的領域を PCR 増幅しシーケンスしたが、切断は確認されなかった。下段左から 5 つ目も、再実験で野生型と判明。

#### 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 2 件)

Young SA, Aitken RJ, Ikawa M.

Advantages of using the CRISPR/Cas9 system of genome editing to investigate male reproductive mechanisms using mouse models.

Asian J Androl. (in press) 査読有り

doi: 10.4103/1008-682X.153851.

Fujihara Y, Ikawa M.

CRISPR/Cas9-based genome editing in mice by single plasmid injection. 査読有り

Methods Enzymol. 2014;546:319-36.

doi: 10.1016/B978-0-12-801185-0.00015-5.

〔学会発表〕（計 3 件）

Ikawa M.

CRISPR/Cas mediated genome editing in mice  
and its application for the study of reproduction.

BRI International Symposium 2015

2015.03.05

新潟

伊川 正人

CRISPR/Cas システムが開く 遺伝子改変マウ  
スの未来

日本分子生物学会

2014 年 11 月 25 日

横浜

Ikawa M.

CRISPR/Cas mediated genome editing in mice  
and its application for reproductive studies

2014. 08.14

The 12th International Symposium on  
Spermatology

Newcastle, Australia

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊川 正人 (IKAWA, Masahito)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：20304066