

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14366

研究課題名(和文) ゲノム編集ツールを用いたオンデマンド変異動物作製法の開発

研究課題名(英文) Development of method for CRISPR/Cas9 mediated genome editing in mice

研究代表者

藤原 祥高 (Fujihara, Yoshitaka)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：70578848

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)：新たなゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9システムは、簡便かつ高効率に遺伝子改変動物を作製することができる。本課題では、単純な遺伝子破壊ではなく、点変異やノックインなどのより高度なゲノム編集を試みた。

まず、受精卵注入法で試みたところ、0.1kb以下のノックインは効率良く導入できたが、それ以上のノックインはうまくいかなかった。つまり、受精卵注入法でのノックイン効率は、導入カセットの大きさに依存して低下することが分かった。次に、相同組換え効率が高いマウスES細胞を用いたところ、一本鎖オリゴDNAよりも二本鎖DNAの方がはるかに効率良く、そして両アリルへ目的変異を導入できた。

研究成果の概要(英文)：The new genome editing CRISPR/Cas9 system can produce genetically modified (GM) animals simply and efficiently. In this project, I attempted more advanced genome editing such as point mutations and knockins using CRISPR/Cas9 in mice.

At first, I tried to introduce knockins using the zygote injection method we established (Sci Rep. 2013, DGD. 2014, Methods Enzymol. 2014). As a result, I found that the knockin-efficiency decreased depending on the size of the knockin cassettes (less than 0.1 kb). Next, when I used the technique in mouse embryonic stem (ES) cells, double-stranded DNA-mediated mutations were more efficient than single-stranded oligonucleotide-mediated mutations. Moreover, ES cell-mediated genome editing was more likely to introduce mutations in both alleles compared to the zygote injection method. The combination of biallelic mutations in ES cells and subsequent chimeric analysis provides an efficient method for rapid phenotypic analysis in GM animals.

研究分野：実験動物学、発生工学

キーワード：ゲノム編集 CRISPR/Cas9 マウスES細胞 ノックイン

1. 研究開始当初の背景

生命科学の発展において、個体レベルでの遺伝子機能解析が果たしてきた役割は大きい。1989年に胚性幹(ES)細胞を用いた相同組換え法によりノックアウト(KO)マウスが誕生してから、およそ四半世紀が過ぎた2013年初めに遺伝子改変技術の新時代が到来した。

従来のES細胞を用いた方法(従来法)は、ターゲティングベクターの構築やES細胞の培養、そしてキメラマウスの作製など効率・時間・コストに加えて高度な技術を要した。そのため、KOマウスを用いた解析を行える研究者は限られていた。

ところが、次世代のゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9システムは、従来法と比べて、非常に簡便かつ高効率に遺伝子改変動物を作製できることから、上記の問題点をほとんどクリアできてしまう。

我々は、これまでにsgRNA/CAS9共発現プラスミドDNAを環状のまま受精卵へ注入することで、効率良くKOマウスを作製できることを報告してきた(*Sci Rep.* 2013, *Dev Growth Differ.* 2014, *Methods Enzymol.* 2014)。この方法を用いて、すでに100系統以上のKOマウス作製に成功している。

2. 研究の目的

本研究では、単純な遺伝子破壊だけでなく、点変異導入やノックインなどのより高度なゲノム編集を試み、CRISPR/Cas9システムを使ったオンデマンド変異動物作製法の構築を目的とした。

3. 研究の方法

まず始めに、我々が構築した受精卵注入法を用いて、点変異及びノックインマウスの作製を試みた。導入するリファレンスとして、点変異では一本鎖オリゴヌクレオチド(ssODN)、ノックインでは二本鎖DNA(dsDNA)を用いて、いくつかの条件検討を行った。

次に、組換え効率が高いという利点を生かして、マウスES細胞を用いて、上記と同じリファレンスにおける変異導入効率を検討した。ES細胞への導入方法については、トランスフェクション法によりsgRNA/CAS9共発現プラスミド(pX330+pPGK-PuroもしくはpX459)とリファレンス(ssODNもしくはdsDNA)を同時導入した。その際の濃度は、ES細胞 1×10^5 個当たりsgRNA/CAS9共発現プラスミドとdsDNAをそれぞれ $1 \mu\text{g}$ ずつ用いた。Puromycinによる薬剤選択を48時間行い、トランスフェクション後約一週間でコロニーをピックアップし、拡大培養の後にPCR法によりスクリーニングした。そして、目的の相同組換えクローンを樹立後、核型解析を経てキメラマウスを作製した。今回は、各方法における変異導入効率に着目して解析を行った。

4. 研究成果

(1) 受精卵注入法による点変異及びノックインマウスの作製

まずは受精卵注入法による点変異やタグ導入を試みた(6遺伝子)。その結果、平均すると得られた産仔の約半数に挿入・欠失変異(indel)を導入できたにも関わらず、目的の点変異やタグ導入は得られた産仔の約5分の1以下だった。また、条件検討の結果、現在は全長130塩基のssODNを最終濃度100 ng/uLで受精卵へ注入している。一例として、FLAGタグ配列(24塩基)を持つssODNにより作製したFLAGタグ導入マウスの結果を示す(図1)。

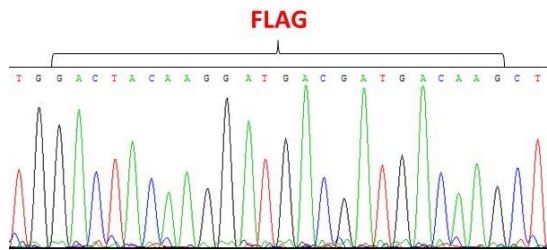


図1. ssODNを用いた受精卵注入法で作製したFLAGタグ導入マウスのシーケンス波形図。

一方で、ノックインカセットとしてdsDNAを受精卵へ同時導入した場合(4遺伝子) indelは導入できたが目的のノックイン個体は得られなかった。つまり、受精卵注入法ではdsDNAよりssODNの方が変異マウスを効率良く作製できることが分かった。dsDNAを用いた受精卵注入法でのノックインマウス作製の効率化は、今後の課題である。

リファレンスを設計する際に気を付ける点として、ゲノムDNAへの目的変異導入後に、CAS9による再切断を防止しなければならない。具体的には、PAM配列(5'-NGG-3')やsgRNAのシード配列部分(PAM配列直上の12塩基)に同義コドンなどの塩基置換を行う必要がある。また、変異マウス作製後の繁殖を考慮して、目的変異周辺に制限酵素サイトを設けることで、シーケンス解析無しにジェノタイピングを行える。

(2) ES細胞を用いた点変異及びノックインマウスの作製

次に、相同組換え効率の高いES細胞を用いて点変異及びノックインを試みた。前項と同じく、ssODNによる点変異導入とdsDNAによるノックインについて比較検討を行った。

5遺伝子について同じsgRNAを用いてssODNとdsDNAのリファレンスを比較したところ、ssODN導入では3遺伝子しか変異クローンを樹立できなかったが、dsDNA導入では5遺伝子全てで変異クローンを樹立できた。また、変異導入効率(相同組換え率)についてもssODNよりdsDNAの方が格段に高かった(ssODN: 5.1% vs. dsDNA: 39.6%)。これらの結果から、ES細胞へは

dsDNA をリファレンスとして用いたノックインが最適である。その一例を示す(図2)。

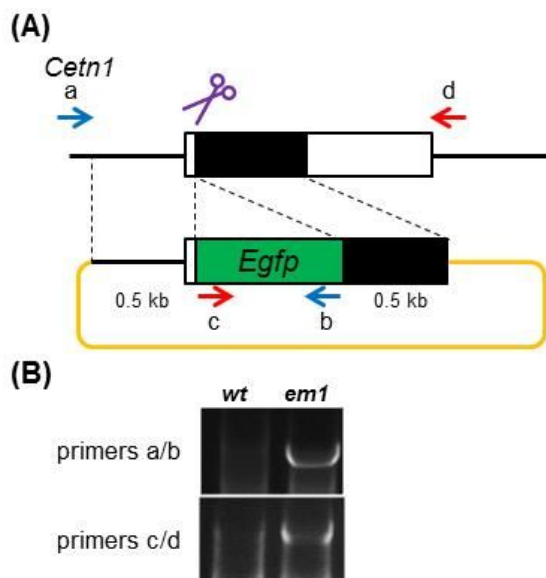


図2. 環状 dsDNA を用いた ES 細胞でのゲノム編集。(A) *Cetn1* 遺伝子座に EGFP カセットをノックインした。導入した dsDNA の相同領域は、各 0.5kb で行った。(B) プライマー a/b と c/d を用いた PCR 法により、相同組換えを確認した。

従来法での相同組換えでは、ターゲティングベクター内の相同領域は両腕にそれぞれ 5kb 程度用いるのが一般的であった (*Transgenic Res.* 2013)。しかし、今回用いた dsDNA の相同領域は、両腕それぞれ 0.5 ~ 1.0kb で必要十分であった。これは、ベクター構築の簡易化だけでなく、PCR 法によるスクリーニングの時短・簡略化に大きく貢献した。また、従来法ではターゲティングベクターを直鎖状にして導入するが、今回は環状のまま導入すれば良いことも検討結果から分かった。

以上の結果から、点変異やタグ導入などの小規模なゲノム編集には、ssODN を用いた受精卵注入法が、0.1kb 以上のノックインなどには dsDNA を用いた ES 細胞導入法が良いことが分かった。同様に、コンディショナル KO も、ES 細胞を用いた方が効率良く目的変異を導入できる。また、ES 細胞へのゲノム編集では、両アリル変異導入効率が非常に高いことから、KO-ES 細胞の樹立やキメラマウスでの表現型解析も難しくない。

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5件)

Muto M*, Fujihara Y*, Tobita T, Kiyozumi D, Ikawa M. Lentiviral Vector-Mediated Complementation Restored Fetal Viability but Not

Placental Hyperplasia in Plac1-Deficient Mice. *Biol Reprod.* 査読有、94、2015、6. doi:

10.1095/biolreprod.115.133454.

Miyata H, Satouh Y, Mashiko D, Muto M, Nozawa K, Shiba K, Fujihara Y, Isotani A, Inaba K, Ikawa M. Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive. *Science.* 査読有、350、2015、442-5. doi:

10.1126/science.aad0836.

Tokuhiro K, Satouh Y, Nozawa K, Isotani A, Fujihara Y, Hirashima Y, Matsumura H, Takumi K, Miyano T, Okabe M, Benham AM, Ikawa M. Calreticulin is required for development of the cumulus oocyte complex and female fertility. *Sci Rep.* 査読有、5、2015、14254. doi: 10.1038/srep14254.

Ono R, Ishii M, Fujihara Y, Kitazawa M, Usami T, Kaneko-Ishino T, Kanno J, Ikawa M, Ishino F. Double strand break repair by capture of retrotransposon sequences and reverse-transcribed spliced mRNA sequences in mouse zygotes. *Sci Rep.* 査読有、5、2015、12281. doi: 10.1038/srep12281.

藤原 祥高, 伊川 正人, 第 3 章マウスでのゲノム編集、ゲノム編集成功の秘訣 Q&A、査読無、1、2015、106-123.

[学会発表](計4件)

Yoshitaka Fujihara, Masaru Okabe, Masahito Ikawa, GPI-anchored protein complex, TEX101 and LY6K, is required for sperm fertilizing ability in mice. 国際シンポジウム生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御、2016年2月17日、京都大学百周年時計台記念館 藤原祥高, 伊川正人, 雄性生殖細胞特異的 GPI アンカータンパク質の機能解析と新規遺伝子改変マウス作製法の開発、神戸大学重点研究チーム「資源動物のシグナル伝達に関する研究」ワークショップ「生殖細胞研究の最先端技術」、2015年9月11日、神戸大学農学研究科

Yoshitaka Fujihara, Masaru Okabe, Masahito Ikawa, GPI-anchored protein complex, LY6K/TEX101, is required for sperm fertilizing ability in mice. 第10回研究所ネットワーク国際シンポジウム、2015年7月23-24日、北海道大学遺伝子病制御研究所

藤原祥高, 岡部勝, 伊川正人, 雄性生殖細胞特異的な発現を示す GPI アンカータンパク質複合体 LY6K/TEX101 の精子受精能における役割、第62回日本実験動物学会総会、2015年5月28-29日、京都テルサ

〔その他〕

大阪大学研究者総覧

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=6639>

研究室ホームページ

http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/yoshitaka_fujihara.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 祥高 (FUJIHARA YOSHITAKA)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：70578848

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

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