

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14884

研究課題名(和文)生殖細胞を利用しないノックアウト動物作製法の開発

研究課題名(英文)Development of generation method of knockout animal without using germ cells

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生殖細胞を体外に取り出すことなく遺伝子組換え動物を作製する方法を開発するために、分子送達に適した人工ヌクレアーゼの開発と、細胞移植を介した送達の可能性を検討した。はじめに、CRISPR/Casの構成要素であるCas9およびガイドRNAを単一のプロモーターで発現可能なシステムを開発した。また、極めて高効率に機能するZFNや従来とは異なるPAMを認識するオーソログCRISPR/Casについて受精卵を介したゲノム改変に利用できることを報告した。一方、移植細胞を介した個体への分子送達は極めて困難であり、人工ヌクレアーゼの送達によるゲノム改変は困難であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a method for preparing a transgenic animal without taking the germ cells out of the body, we studied the development of engineered endonucleases suitable for molecular delivery and the possibility of delivery via cell transplantation. First, we developed a system capable of expressing Cas9 and guide RNA with a single promoter. Besides, we developed a ZFN that functions efficiently, and also reported that *S. thermophiles*-derived orthologous CRISPR/Cas can be used for genome modification via zygotes. On the other hand, molecular delivery to recipient body and germ cell via transplanted cells was extremely limited, suggesting that it is hard to generate the genome-modified germ cells by delivery of engineered endonucleases.

研究分野：発生工学

キーワード：ゲノム改変動物

1. 研究開始当初の背景

ノックアウト動物などの個体レベルでゲノム DNA 配列が改変されたゲノム改変動物は、遺伝子情報と形質の関係を検証する上で非常に有用なツールである。ゲノム改変動物の作製には、相同組換えによって標的遺伝子を破壊した ES 細胞や体細胞を用意し、キメラ作製や体細胞核移植を介して作製を行うが、多大なコストや労力を要する上、利用できる動物種が限定されていた。近年従来法に代わる新たな方法として、人工的な制限酵素を導入し、標的座位への 2 本鎖切断と修復エラーを介して直接ゲノム改変を行う方法が注目を集めている。しかし、従来法も人工制限酵素による方法も共通して、受精卵や未受精卵などの卵細胞を大量に採取し試験管内で発生能を維持したまま操作する必要があることから、現行のゲノム改変動物作製法は、大量の卵細胞を回収し体外で操作できる動物に限られている。そのため、モデル動物や家畜のうち限定された品種を除き、多くの動物種では未だ応用できないのが現状である。ある動物個体に細胞や組織を移植した際、母体と移植細胞は血液やサイトカインなどの物質の交流を行っている。本研究開始前に、移植細胞からエキソソームと呼ばれる脂質二重膜で形成された小胞が分泌され、タンパク質や RNA の伝播を行っていることが報告された (Cossetti et al., PLoS ONE, 2014)。この報告では驚くべきことに母体の生殖細胞にも外来遺伝子の発現が認められた。申請者は、この細胞移植を介した生殖細胞への外来遺伝子導入現象を利用することで、卵母細胞を体外に取り出すことなく人工制限酵素を送達し、遺伝子組換え動物の作出が可能なのではないかと考えた。そこで、本研究では、争奪に適した人工制限酵素の開発を行うとともに、細胞移植を介して母体へ外来遺伝子の送達が可能か、またそれによる人工制限酵素の送達と遺伝子組換え動物作製が可能であるか検討を行うことにした。

2. 研究の目的

前述の通り、本研究は多様な動物種でノックアウト動物の作製を可能とすることを目指し、人工制限酵素によるゲノム改変法を利用し、標的個体への細胞移植を介して標的動物の生殖細胞へ施し、卵細胞を体外で操作することなくノックアウト動物の作製が可能であるか検証することを目的とした。具体的には、送達に適した人工ヌクレアーゼの開発、送達方法の検証、を検討した。

3. 研究の方法

上記について、CRISPR/Cas を用いる場合、構成要素である Cas9 タンパク質とガイド RNA は、通常は異なる 2 種類のプロモーターで発現誘導する必要があるため、別々の分子として独立に細胞内に存在するため、本研究での送達効率に影響を及ぼすと予想された。そこで、

(1) 単一のプロモーターによって CRISPR/Cas 構成要素を発現する、新たなツールの開発を試みた。(2) また、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* 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。(3) CRISPR/Cas とは異なるタンパク質型の人工制限酵素として、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) が古くから検討されている。これは他の人工制限酵素と比較しても分子量が極めて小さく、タンパク質として機能するために CRISPR/Cas とは異なる性状で利用可能であると予想された。しかし、これまでの報告では ZFN は CRISPR/Cas と比較してゲノム改変の効率が低いことが知られていた。そこで、マウス受精卵で利用可能な高効率なゲノム改変機能を発揮する ZFN セットの探索を行った。(4) また、これまでの検討では受精卵がゲノム改変の主な対象であったが、生体内での改変を考えた場合、未授精・未成熟の卵母細胞がより多く存在するため、これらを標的として利用できればより効率よく実施可能であると予想される。しかし、未成熟卵母細胞において人工制限酵素によるゲノム改変が可能かは十分に検討されていなかった。そこで、ブタの卵成熟系を利用し、未成熟・成熟・前核形成の各期の卵母細胞について、CRISPR/Cas によるゲノム改変効率の比較を行った。2- については、前述の報告結果を追試するため、蛍光マーカーを発現する ES 細胞をオスヌードマウスに皮下移植し、精巣内における蛍光マーカーの発現を観察した。

4. 研究成果

(1) 従来の CRISPR/Cas では、Cas9 は RNAPol 型プロモーターで発現させる一方で、ガイド RNA は RNAPol 型プロモーターで発現させ必要があるとされていた。我々ははじめに Cas9 とともに RNAPol 型プロモーターでガイド RNA の発現を行ったところ、人工ヌクレアーゼとしての機能は認められなかった。これは、RNAPol 型プロモーターの特性として、ガイド RNA の 5' , 3' にキャップ構造などの余計な構造を付加することが原因であると予想された。そこで、ガイド RNA の両端に Ribozyme を付加し、Cas9 とともに RNAPol 型プロモーターで発現させたところ、人工ヌクレアーゼとしての機能が認められた。続いて、単一のプロモーター下で、Ires 配列で Cas9 配列と Ribozyme 付加ガイド RNA を発現させるコンストラクトを作製し細胞に導入したところ、人工ヌクレアーゼとしての機能が認められた。驚くべきことに、IRES 配列を利用せず、Cas9 配列と Ribozyme 付加ガイド RNA を連結したコンストラクトについても、人工ヌクレアーゼとしての機能が認め

られた。また、異なる2種類の座位を標的とした Ribozyme 付加ガイド RNA を Cas9 とともに単一プロモーターで発現誘導したところ、複数座位のゲノム改変が認められた。以上より、単独のプロモーターから CRISPR/Cas の構成要素を同時に発現することが可能な新たなツールの開発に成功した。

(2) *S. thermophiles* 由来の Cas9 について、ヒトコドン最適化したものを受精卵内で高発現するコンストラクトを作製し、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 を利用し、高効率にノックインが可能であることを確認し、本ツールの汎用性を報告した。

(3) これまでの検討では、ZFN による受精卵を介したゲノム改変個体の作製では、およそ1-2割の産子で標的ゲノムの改変が認められていた。本検討において、Aqpep 遺伝子のC末端付近に対してZFNを設計し、受精卵に顕微注入し、胚移植後に産子を得たところ、驚くべきことに、得られた個体すべてで標的座位のゲノム改変が認められた。受精卵のみで高効率にゲノム改変が可能であるのかを検証するために、標的配列をコードしたレポーターコンストラクトとともに HEK293 細胞に導入し、効率を評価したところ、対象区として利用した過去に報告したZFNと比較して有意に高いゲノム改変効率を示した。以上より、汎用的に利用可能な高効率ZFNの作製に成功した。

(4) 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。卵巣内の卵母細胞の大半は未成熟卵母細胞であるため、本研究の目的の達成には、未成熟卵母細胞でのゲノム改変効率を向上させる必要がある。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。

過去の報告 (Cossetti et al., PLoS ONE, 2014) を追試するために、EGFP を発現する ES 細胞を KSN ノードマウスの皮下に移植し、テラトーマ形成後に精巣を回収し、組織観察、ウェスタンブロット、RT-PCR によって EGFP 分子の送達を観察したが、非移植個体と同様に分子は検出されなかった。本法による分子

の送達は実質的なツールとして利用することは困難であることが示唆された。細胞移植に代わる新たな検討として、細胞膜透過シグナルペプチド配列を付加した人工ヌクレアーゼを利用する方法を考案した。蛍光レポーター配列について、シグナルペプチド (MASIWWGHRG) をコードしたプライマーを利用して PCR 法で増幅し、Neuro2A 細胞に導入することで、蛍光タンパク質を調製した。しかし、別細胞に対する得られたタンパク質の導入能は認められなかったため、人工制限酵素の新たな送達方法として利用可能であるが、その検討までは至れなかった。

以上の結果より、本研究によって、分子送達に適した新たな人工制限酵素ツールの確率に成功した。しかし、本研究計画で提案した送達方法は利用が困難であることが示唆された。本計画の遂行中に、東海大学の塚らによって、卵管内に存在する受精卵に対してエレクトロポレーションによって人工ヌクレアーゼを導入し、ゲノム改変個体を得るという優れた方法は報告された (Takahashi ら、Sci Rep, 2015)。今後は、このような方法と本研究で確立した新たなツールとを組み合わせることによって、様々な動物種に利用可能なゲノム改変個体の作製が可能になると期待される。

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 7 件)

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

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、2016、568-574

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

〔学会発表〕(計 8 件)

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)

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)

〔図書〕(計 1 件)

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