

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 14 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21654

研究課題名(和文)ゲノム編集効率に寄与するマウス受精卵のDNA修復機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of DNA repair involved in the genome editing efficiencies in mouse zygotes

研究代表者

原 聡史 (Hara, Satoshi)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・研究員

研究者番号：80739582

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)：CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術は目覚ましい速度で進歩しているが、Cas9によるDNA二重鎖切断後の相同組換え(HDR)を利用した外来配列の挿入効率は未だに高いとはいえない。本研究では、マイクロインジェクションを行うタイミングと受精卵の細胞周期との関連性を明らかにするために、異なる前核期の受精卵にガイドRNAおよびCas9を外来配列とともにインジェクションし、外来配列の挿入効率を求めた。その結果、外来配列の挿入効率は受精卵の前核期のステージによって異なっていたことから、HDRは体細胞と同様、細胞周期依存的な機構により行われることが確かめられた。

研究成果の概要(英文)：Although CRISPR/Cas9-mediated genome editing technology is remarkably progressed, the insertion efficiencies of an exogenous sequence using this technology via the homology directed repair (HDR) are still low. In this study, to assess the relationships between the timing of HDR and cell cycle of zygotes, we microinjected sgRNA/Cas9 with oligomer containing exogenous sequences into mouse zygotes at the different pronucleus stages (PN1-2, PN2-3, PN3-4, PN4-5). The results showed that the highest insertion efficiencies were observed in the zygotes at the PN4-5 stage, whereas the lowest efficiencies in PN1-2 stage zygotes. From these results, HDR in mouse zygotes is also activated by the cell cycle-dependent manner.

研究分野：発生工学

キーワード：ゲノム編集

## 1. 研究開始当初の背景

人工ヌクレアーゼを用いて任意の標的 DNA 配列を人為的に改変する技術はゲノム編集とよばれ、多くの動物種・細胞種において適用することができる。中でも、標的配列に対するガイド RNA(gRNA)と DNA 切断酵素 Cas9 を用いる CRISPR/Cas9 システムは、DNA 切断活性の高さと扱いの簡便さから、2013 年の発表以来目覚ましい進歩を遂げている。特にマウスにおいては、これまでの ES 細胞を介した複雑なゲノム操作が必要であった塩基置換の誘導、loxP 配列や GFP などの外来 DNA 配列の挿入(ノックイン)を行ったマウスについても、相同配列とともに外来の配列を含んだ一本鎖オリゴ DNA(ssOligo)あるいはターゲティングベクターを gRNA および Cas9 と共に受精卵に注入することで作出できることが示された。

研究代表者の所属研究室では、ゲノム編集による遺伝子改変の有用性を世界に先駆けて発信してきた。申請者らは、現在までに 50 種類以上の異なる gRNA を作製し、受精卵へのマイクロインジェクションを介した遺伝子改変マウス作出を行った。その結果、平均で産仔の約 60%に挿入あるいは欠失によるノックアウトを誘導できるが、一方でノックインや塩基置換の効率は 10%程度と低いことを確かめている。こうした結果は他の報告とも一致しており、受精卵への相同組換えを利用したゲノム編集は CRISPR/Cas9 を以ってしても困難と多くの研究者に考えられている。

研究代表者らは体外受精(IVF)の後 3 時間経過した早期の受精卵に gRNA、Cas9 と共に loxP 配列を標的領域に挿入するよう設計した ssOligo をインジェクションした。その結果、産仔において DNA の切断が認められた個体の割合は、自然交配に由来する受精卵と比較して顕著な差はなかったものの、loxP の挿入が認められた個体の割合に大きな差が認められ(24.3% vs 4.1%)、その半数は両アレルに loxP の挿入が認められた。このことから、相同組換えの効率は受精後の時期に依存する可能性が示唆された。受精卵の前核期は、雌雄前核のサイズや距離に応じて PN0~5 の 6 段階に大別される。自然交配で得られる受精卵は、通常の方法で採取した場合多くは PN4 付近であり、インジェクション時間および mRNA が翻訳されて機能を発現するまでに要する時間を考慮に入れた場合、相同組換えに最適な時間および細胞周期を過ぎているために効率が低い可能性が考えられる。これらのことから、相同組換えを利用するゲノム編集は、受精卵の時期あるいは細胞周期に依存して効率が変動する可能性が示唆されるとともに、受精卵の時期および細胞周期という面から手法を最適化する必要があると考えられた。

人工ヌクレアーゼはゲノムの標的配列に DNA 二本鎖切断(double strand break;

DSB)を誘導する。その結果切断された DNA は非相同性末端結合(non-homologous end-joining; NHEJ)によって修復しようとするが、その過程で起こる修復エラーにより塩基の欠失あるいは挿入が導かれ、フレームシフトによるノックアウトを引き起こす。一方で相同な配列が存在すると、相同組換え(homology directed repair; HDR)による修復が行われ、その際に外来性 DNA 配列を鋳型にすることを利用して外来遺伝子のノックインを行う。一般に NHEJ は細胞周期のすべての時期で起こるのに対し、HDR が起こるのは S 期の後期および G2 期に局限されている。しかし、前核期受精卵において DSB を受けた領域が NHEJ あるいは HDR の経路を選択する分子機構は不明であり、この時期の受精卵は NHEJ/HR がランダムに起こりうる状態にあると考えられる。これらのことから、受精卵の NHEJ と HDR のバランスを人為的に変化させ、HDR を起こしやすくすることで、相同組換えを用いたゲノム編集の効率を向上できる可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、相同組換えによるゲノム編集を効率化させる技術を開発することを目的とし、1) 時期および細胞周期とゲノム編集効率との関連性、2) ゲノム修復機構のバランスを人為的に制御した場合のゲノム編集への有用性 以上の 2 点を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1. 前核期受精卵のステージの違いがゲノム編集効率に及ぼす影響の解析

体外受精で得られた受精卵を PN0~5 の各段階に分類し、インジェクションを行う。その後、得られた胚盤胞あるいは産仔の遺伝子型をシーケンシングによって確認し、loxP 導入効率(loxP 挿入個体数/解析した総個体数)を算出し、インジェクションするステージごとに差が生じるかを比較する。また、自然交配由来の受精卵の導入効率とも同時に比較する。

### 2. 既知の DNA 修復遺伝子群の人為的制御による効率化の検討

一般に NHEJ および HDR は、最初にどちらにより修復するか選択され、その後それぞれが特異的な経路によって実行される(図 5)。まず、NHEJ および HDR に関する既知の遺伝子群の受精卵における発現を確認するために、DNA 修復関連遺伝子群の発現を、免疫染色およびウェスタンブロットにより解析する。次いで、これらの経路のうち NHEJ/HDR 選択の初期に関する遺伝子群に着目し、NHEJ 関連因子(53BP1, Ku70/80 および DNA-PKcs)の場合、阻害剤あるいは siRNA によるノックダウンを、HR 関連因子(RPA, Rad51 および BRCA1)の場合 mRNA インジェクションによる過剰発

現を引き起こした場合、HDR を誘導しゲノム編集効率を変動させることが可能か否かを検証する。

### 3. 未知の相同組換え誘導因子の探索及びゲノム編集への応用

HDR は ES 細胞および受精卵で頻度が高く、胎仔線維芽細胞(MEF)などの培養細胞では起こらない。これを利用して、過去に行われたマイクロアレイ解析の発現情報から ES 細胞および受精卵で発現し、培養細胞で発現しない遺伝子群を HDR 誘導候補遺伝子として抽出し、遺伝子の機能により絞り込みを行う。その後、候補遺伝子群に対してルシフェラーゼアッセイに基づくスクリーニングを行う。当研究部では MGC の完全長 cDNA クローンのうち約 6,000 遺伝子の発現ベクターを保有し、特に転写因子は 669 遺伝子について迅速かつ安価に大規模アッセイを行う実験系を既に確立している。

最初に、ナンセンス変異によってルシフェラーゼ遺伝子を持つが発現しないレトロウイルスベクターを感染させた MEF を樹立する。この MEF に対し、ルシフェラーゼ遺伝子に対する gRNA、Cas9、ナンセンス変異を修復するよう設計した ssOligo と共に、候補遺伝子の発現ベクターを導入する。その後導入細胞のルシフェラーゼ活性を測定することにより、ルシフェラーゼが HDR により修復された頻度を観察することができる。これを用いて、発現ベクターを入れない場合に比して高い活性を示した遺伝子を HDR 誘導因子、低い活性を示した遺伝子を HDR 抑制因子として選出する。

## 4. 研究成果

### 1. 前核期受精卵のステージの違いがゲノム編集効率に及ぼす影響の解析

体外受精によって各前核期 (PN1-5) の受精卵を得た。標的配列に対する gRNA および外来配列として loxP を含むよう設計された ssOligo を Cas9 mRNA とともにインジェクションし、胚盤胞期および新生仔における遺伝子型を解析した。その結果、PN4-5 の受精卵において loxP の挿入効率は最大となり、PN1-2 において最も低くなった。この傾向は胚盤胞および新生仔のいずれにおいても同様に認められたことから、受精卵における相同組換えによるゲノム修復は体細胞と同様、細胞周期依存的に誘導されることが確かめられた。

### 2. 既知の DNA 修復遺伝子群の人為的制御による効率化の検討

申請調書作成当初から 1-2 年程度で CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術はさらに進歩し、mRNA の代わりに Cas9 タンパク質を用いることで HDR による組換え効率の改善が報告されたほか、DNA 修復関連因子の阻害剤を用いることにより外来配列の挿

入効率の改善を報告した論文が複数発表された。そこで実験 2 は中断せざるを得ず、実験 3 へ移行することとした。

### 3. 未知の相同組換え誘導因子の探索及びゲノム編集への応用

未知の相同組換え誘導因子を探索するために、相同組換えの効率上昇をルシフェラーゼアッセイにより定量的に検出する系を構築した。当初はウィルスベクターを用いて培養細胞ゲノム中に変異型ルシフェラーゼを取り込ませ、これを CRISPR/Cas9 で修復することにより相同組換えを定量的に検出することを計画していた。しかしながら実際にはデザインした系がワークしなかったために、別の系により検出することとした。具体的には、不活性型ルシフェラーゼ内に標的配列を持つプラスミドを gRNA および Cas9 発現ベクターと共に一過性で発現させ、相同組換えによりルシフェラーゼが修復されると活性が検出される SSA アッセイとよばれるシステムを用いた。実際にルシフェラーゼ活性の変化と相同組換え効率との関連性を確認するために、プラスミドを細胞に導入後 NHEJ 経路に關与する DNA-PKcs 阻害剤である NU7026 で処理した細胞でルシフェラーゼ活性を測定したところ、未処理の細胞に比べて活性が濃度依存的に上昇したことから、NHEJ 経路の阻害により HDR が誘導されていることをモニターできていることが確かめられた。今後、この系を用いてスクリーニングを行っていきたいと考えている。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

原 聡史 (HARA, Satoshi)  
国立成育医療研究センター研究所 シス  
テム発生・再生医学研究部 研究員  
研究者番号：80739582

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )