

令和元年5月28日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07093

研究課題名(和文) ゲノム編集において予期せぬリアレンジを抑制し確実に相同組換えを起こす手法の開発

研究課題名(英文) Efforts toward precise and efficient homologous recombination in genome editing.

研究代表者

荒木 喜美 (Araki, Kimi)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授

研究者番号：90211705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR/Casを用いたゲノム編集は、遺伝子改変マウス作製において必要不可欠なツールである。しかし、マウスES細胞を用いた場合、2本鎖切断(DSB)を行なって相同組み換え(HR)を誘発した場合、HRによる変異導入率は劇的に上がるものの、対立アレルでは、大きなリアレンジが高い頻度で生じてしまう。我々は、ES細胞において、HRによる正確な組換えとリアレンジが起こった場合を区別できる系を開発した。リアレンジを起こしにくいCas9 D10A nickaseの利用を検討したところ、DSBより効率は落ちるものの、2箇所以上同じストランドにnickを加えることが効果的であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集は、DNAを目的の場所で2本鎖切断(DSB)することで遺伝子の改変を効率よく行う技術で、遺伝子改変マウス作製効率は飛躍的に上昇した。しかし、DSBを加えると、2つある対立アレルのうち、目的通りの遺伝子改変が起こらなかった対立アレルでは、大きなリアレンジが高い頻度で生じてしまう。そのような細胞やマウスは解析に適さないため、リアレンジを抑える技術の開発は解析効率を上げるために重要である。1本鎖切断を起こすCas9 D10A nickaseを効果的に利用できることがわかったので、マウスES細胞を用いた遺伝子改変を安全かつ迅速に進めることができるようになった。

研究成果の概要(英文)：Genome editing using CRISPR / Cas9 is an essential tool for producing genetically modified mice. However, when double strand breaks (DSBs) are introduced on the genome DNA to induce homologous recombination (HR) in mouse ES cells, although the rate of successful HR is dramatically increased, alleles in which HR have not occurred frequently show gross rearrangement. We developed a system that can distinguish between accurate gene targeting by HR and gene targeting with rearrangement in ES cells. We examined the use of Cas9 D10A nickase, which rarely induce rearrangement, and found that multiple nicks on the same strand is effective, although the efficient of HR was lower than that of DSB.

研究分野：発生工学

キーワード：ゲノム編集 相同組換え ES細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集とは、目的の部位に2本鎖切断(Double strand break, DSB)を加えることで、非同末端結合修復(NHEJ)または相同組換え(HR)を引き起こし、ゲノム上に変異を導入する技術である。特に、CRISPR/Casはその発表以来、手軽さから非常に速いスピードで普及している。

我々は、CRISPR/Casを用いた受精卵やマウスES細胞を用いた変異作出を数多く行ってきた。しかしながら、ES細胞においてCRISPR/Casを併用した相同組み換えでは、その効率は劇的に上昇するものの、サザンブロットによるゲノム解析を行ったところ、相同組み換えの起こっていない対立アレルでは、サザンブロットでバンドの移動度に変化が起きるほどの大きな予期しないリアレンジがかなりの頻度で起こっていることがわかった。ホモで相同組換えアレルが得られることはほとんどなく、検出バンドが1本でホモと思われたクローンでは、プローブ領域まで欠損していた。

マウス個体においても、CRISPR/CasによるNHEJで容易にホモ個体を得られることになっているが、実際には、PCRで欠損を検出したアレルの対立アレルでは、PCRもかからないほどの大きなリアレンジが起こっているケースも多く、この状態では観察された表現型が本当に破壊された遺伝子の影響によるものか断言できなくなる。マウスを用いてCRISPR/Casによるゲノム編集を行った論文はすでに数多く発表されているが、ほとんどPCR解析しかされておらず、リアレンジについて検討されていない。対立アレルにどのようなリアレンジが起ころうとも、野生型マウスと交配して目的のアレルを持つ個体のみ継代していけば大きな問題にはならないが、継代に時間を要することになり、ゲノム編集の利点が半減する。望まないリアレンジを抑制するシステムの開発が必要である。

2. 研究の目的

2本鎖切断後の修復反応では、NHEJとHRが起こるとされおり、HRは非常に正確に修復できるが、NHEJは不正確であり、そのために変異が生じるとされている。NHEJにはAlternative-NHEJまたはBackup-NHEJと言われる経路も存在することが明らかになってきた。この経路は数塩基のマイクロホモロジーを利用した反応で、Microhomology-mediated end Joining (MMEJ)とも呼ばれる。哺乳類のゲノムでは多くの繰り返し配列が存在するため、DSBにより誘導されたMMEJで大きなリアレンジが起こると予想される。マウス受精卵やES細胞において、予期できない大きなリアレンジを引き起こす原因と考えられるMMEJも起こさないようなシステムを構築できれば、相同組換えのみを効率的に誘導できると期待される。

3. 研究の方法

ES細胞を用いた場合にリアレンジの頻度が非常に高いので、ES細胞を用いて検討を行う。図1のようなES細胞を用いた挿入型相同組換えの系を構築する。この系では、相同組換えによりLacZ遺伝子が発現するようになるが、NHEJ/MMEJが起こればLacZ遺伝子が破壊されるので、X-galで簡単かつ定量的にスクリーニング出来る。エレクトロポレーション後にNHEJやMMEJのインヒビターを加え、リアレンジ抑制に効果を示すものがあるかどうか検討する。また、野生型のCas9ではなく、DSBを引き起こさないnickaseの利用も検討する。

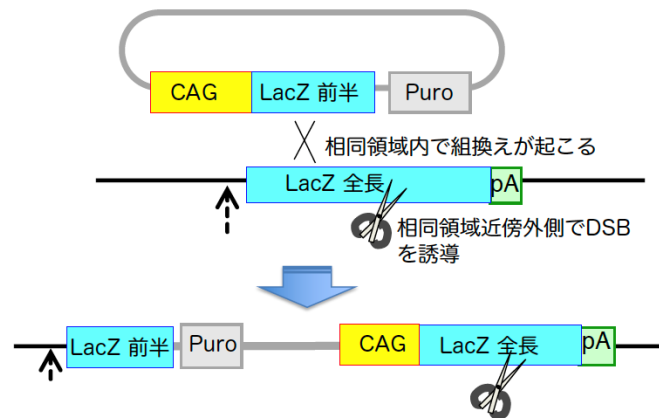


図1 : X-gal染色によるHR後のリアレンジ検出系
ゲノム上のDSBをLacZ coding領域内に起こすと、組換え反応後の産物も切断を続けるので、NHEJ/MMEJによるリアレンジが起こり、X-gal染色陰性となる。X-gal陽性率が高くなるようなシステムの構築を目指す。

4. 研究成果

(1) システムの構築

ゲノム上にプロモーターのないLacZ全長を1コピー導入したES細胞株、ES-20を樹立した。このES-20に、図1の点線で示した場所にDSBを加えるCRISPR-Cas9発現プラスミドとターゲティングベクターをエレクトロポレーションで導入、ピュロマイシン選択後のコロニーをX-gal染色すると、約6割のコロニーが青染され、高率に相同組換えが起きることが確認できた。一方、図1のハサミの絵で示した位置にDSBを加えるCRISPR-Cas9発現プラスミドとターゲティングベクターを導入したところ、非常に多くのコロニーが出現したにもかかわらず、染色されるコロニーは1個あるかないかであった。DSBを加えなければ、コロニーは少数しか出現しないので、相同組換えで挿入効率が上昇したものの、その後のリアレンジによりLacZのORFが破壊され、X-gal染色陰性となったと考えられ、検出システムは期待通りに動いていると判断した。

(2) NHEJやMMEJのインヒビターの検討

NHEJ 及び MMEJ に関与する分子はかなり明らかになってきており、また、それらの分子に対するインヒビターも同定されている。そこで、NHEJ 経路に働く分子を阻害するインヒビター 2 種類、MMEJ 経路に働く分子を阻害するインヒビター 3 種類を用い、検討を行った。上述のエレクトロポレーションを行い、dish に細胞を播く時から 3 日間、インヒビターを加え、青染されるコロニーの割合が増えるかどうか調べた。薬剤の濃度を上げると毒性を示すものが多く、ES 細胞の生存に影響のない濃度では、効果を示すものは得られなかった。また、相同組み換えの頻度を上昇させるといったエンハンサーの検討も行ったが、効率を上げる効果は得られなかった。

(3) Cas9 nickase の検討

片方の鎖のみを切断する Cas9 D10A nickase は、相同組み換えを誘発する効率は低いものの、リアレンジを引き起こしにくいという利点がある。そこで、この利用法を工夫することで、効率を上げることができないかを検討した。その結果、図 2 に示すように、ニックを加える場所を 3 箇所と増やすこと、矩形波を用いたエレクトロポレーションの条件を検討することで、効率を上げることが成功した。

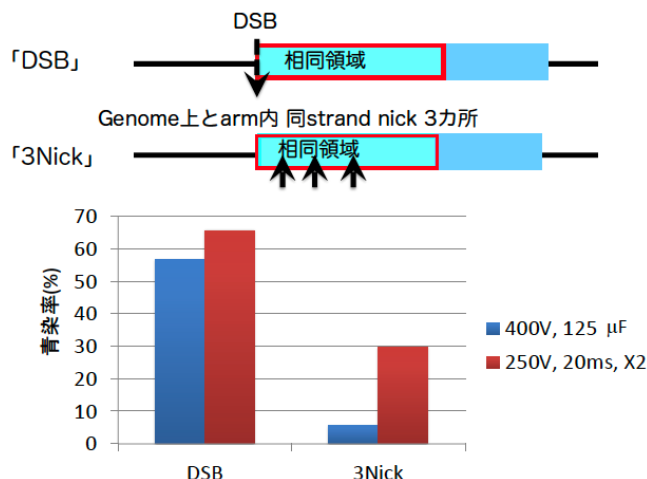


図2 Nickaseを用いる場合のエレクトロポレーションの条件検討
相同領域の同じストランドに3箇所のニックを加え、さらに、導入条件を工夫することで、DSBの効率には及ばないものの、30%台と、実用可能なレベルにまで相同組み換えの効率を上昇させることができた。

(4) 受精卵での条件検討

受精卵における相同組み換えの系では、多くの受精卵を一度に扱うことのできるエレクトロポレーションの条件検討を行い、高い発生率で産仔を得ることができ、野生型 Cas9 を用いた場合には 9 割以上の効率で変異体を得ることができる条件を決定した。しかし、Cas9 D10A nickase を用いた場合には効率よく相同組み換えを起こすことは難しかった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

- (1) Arima, K., Ohmuraya, M., Miyake, K., Koiwa, M., Uchihara, T., Izumi, D., Gao, F., Yonemura, A., Bu, L., Okabe, H., Imai, K., Hashimoto, D., Baba, Y., Chikamoto, A., Yamashita, Y. I., Furukawa, T., Araki, K., Baba, H. and Ishimoto, T. Inhibition of 15-PGDH causes Kras-driven tumor expansion through prostaglandin E2-ALDH1 signaling in the pancreas. *Oncogene* 38: 1211-1224, 2019. doi:10.1038/s41388-018-0510-y
- (2) Ikeda, N., Asano, K., Kikuchi, K., Uchida, Y., Ikegami, H., Takagi, R., Yotsumoto, S., Shibuya, T., Makino-Okamura, C., Fukuyama, H., Watanabe, T., Ohmuraya, M., Araki, K., Nishitai, G. and Tanaka, M. Emergence of immunoregulatory Ym1+Ly6Chi monocytes during recovery phase of tissue injury. *Sci Immunol.* 3: eaat0207, 2018. doi: 10.1126/sciimmunol.aat0207.
- (3) Deguchi, Y., Nishina, T., Asano, K., Ohmuraya, M., Nakagawa, Y., Nakagata, N., Sakuma, T., Yamamoto, T., Araki, K., Mikami, T., Tanaka, M. and Nakano, H. Generation of and characterization of anti-IL-11 antibodies using newly established IL11-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 505: 453-459, 2018. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.09.128
- (4) Miura, Y., Matsui, S., Miyata, N., Harada, K., Kikkawa, Y., Ohmuraya, M., Araki, K., Tsurusaki, S., Okochi, H., Goda, N., Miyajima, A. and Tanaka, M. Differential expression of Lutheran/BCAM regulates biliary tissue remodeling in ductular reaction during liver regeneration. *eLife* 7: e36572, 2018. doi:10.7554/eLife.36572
- (5) Eto, T., Miyake, K., Noshio, K., Ohmuraya, M., Imamura, Y., Arima, K., Kanno, S., Fu, L., Kiyozumi, Y., Izumi, D., Sugihara, H., Hiyoshi, Y., Miyamoto, Y., Sawayama, H., Iwatsuki, M., Baba, Y., Yoshida, N., Furukawa, T., Araki, K., Baba, H. and Ishimoto, T. Impact of loss-of-function mutations at the RNF43 locus on colorectal cancer development and progression. *J Pathol.* 245: 445-455, 2018. doi:10.1002/path.5098

- (6) Honda, I., Araki, K., Honda, S., Soeda, F., Shin, M. C., Misumi, S., Yamamura, K. I. and Takahama, K. Deletion of GIRK2 subunit containing GIRK channels of neurons expressing dopamine transporter decrease immobility time on forced swimming in mice. *Neurosci. Lett.* 665: 140-146, 2018. doi: 10.1016/j.neulet.2017.11.028
- (7) Tanaka, K., Kim, S. E., Yano, H., Matsumoto, G., Ohuchida, R., Ishikura, Y., Araki, M., Araki, K., Park, S., Komatsu, T., Hayashi, H., Ikematsu, K., Hirano, A., Martin, P., Shimokawa, I. and Mori, R. MiR-142 Is Required for Staphylococcus aureus Clearance at Skin Wound Sites via Small GTPase-Mediated Regulation of the Neutrophil Actin Cytoskeleton. *J. Invest. Dermatol.* 137: 931-940, 2017. doi: 10.1016/j.jid.2016.11.018.
- (8) Irie, A., Imamura, T., Michibata, Y., Kubo, T., Takeda, N., Shibuya, I., Sogo, S., Araki, K. and Nishimura, Y. Accumulation of HLA-DR4 in Colonic Epithelial Cells Causes Severe Colitis in Homozygous HLA-DR4 Transgenic Mice. *Inflamm. Bowel. Dis.* 23: 2121-2133, 2017. doi:10.1097/MIB.0000000000001282
- (9) Shindo, R., Yamazaki, S., Ohmuraya, M., Araki, K. and Nakano, H. Short form FLICE-inhibitory protein promotes TNF α -induced necroptosis in fibroblasts derived from CFLARs transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 480: 23-28, 2016. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.015. Epub 2016 Oct 6.
- (10) Ishikawa, E., Kosako, H., Yasuda, T., Ohmuraya, M., Araki, K., Kurosaki, T., Saito, T. and Yamasaki, S. Protein kinase D regulates positive selection of CD4⁺ thymocytes through phosphorylation of SHP-1. *Nat. Commun.* 7: 12756, 2016. doi: 10.1038/ncomms12756.

[学会発表](計 14 件)

- (1) 赤星彰也、宮村優里、石原慶一、竹尾透、村松昌、荒木喜美、南敬 「ゲノム編集技術を用いた領域指定型新規ダウン症モデルマウス作成法の開発」平成 30 年度 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会 2019/1/30-31 琵琶湖ホテル
- (2) 竹田直樹、小林千余子、荒木喜美 「プロタミン 2 遺伝子改変マウスの作製と解析」第 41 回日本分子生物学会年会 2018/11/28-30 パシフィコ横浜
- (3) Kazuhiro Okumura, Megumi Saito, Eriko Isogai, Kimi Araki, Yuichi Wakabayashi “Identification of responsible genes for Stmm 1 a locus conferring resistance to early-stage chemically induced skin tumors” 第 77 回日本癌学会学術総会 2018/9/27-29 大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル大阪
- (4) 荒木喜美 「遺伝子改変マウスを使って研究する時、手を抜いてはいけないこと」先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会、2018/9/6-8、長野県茅野市(蓼科グランドホテル滝の湯)
- (5) 荒木正健、武田伊世、山口友輔、高田幸基、今坂舞、吉信公美子、荒木喜美、「染色体特異的にクラスターを形成しているトラップ領域：CSCT13 は、マウス初期発生過程において重要な役割を演じていることが示唆された」2017 年度生命科学系学会合同年次大会・第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会、2017 年 12 月 6 日-9 日、神戸ポートアイランド
- (6) 久保 英実香、有安 大典、芝田 晋介、荒木 喜美 「常染色体優性遺伝性 GH1 遺伝子異常症の発症機序に関する検討 - 遺伝子置換システムを用いたヒト化 GH マウスの作出と解析 -」2017 年度生命科学系学会合同年次大会・第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会、2017 年 12 月 6 日-9 日、神戸ポートアイランド
- (7) 杉本道彦、有安大典、石黒啓一郎、伊藤慎悟、荒木喜美 「エレクトロポレーション法による CRISPR/Cas9 ゲノム編集マウス作製時における高効率化と生存率向上の試み」、2017 年度生命科学系学会合同年次大会・第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会、2017 年 12 月 6 日-9 日、神戸ポートアイランド
- (8) 杉本道彦、有安大典、石黒啓一郎、伊藤慎悟、荒木喜美 「エレクトロポレーションを用いた簡便・高効率マウスゲノム操作技術/An easy and high efficient technique for mouse

genome manipulation by electroporation」, 日本遺伝学会第 89 回大会、2017 年 9 月 13 日-15 日、岡山 (岡山大学)

- (9) 荒木喜美「遺伝子改変マウス作製の落とし穴 ～落ちて後悔しないために～」平成 29 年度先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会、2017 年 9 月 7 日-9 日、蓼科 (蓼科グランドホテル滝の湯)
- (10) Michihiko Sugimoto, Daisuke Ariyasu, Kei-ichiro Ishiguro, Shingo Ito, Kimi Araki. "An easy and high efficient technique for mouse genome manipulation by electroporation" 2017 AMMRA & AMPC meeting. Aug. 26-27, 2017. Incheon, Korea.
- (11) 荒木喜美: CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子改変マウス作製, 第 48 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 2016.9.23-9.24, 熊本県 (くまもと県民交流館パレア)
- (12) 仙波圭, 大場隆, 片淵秀隆, 飯田有俊, 池川志郎, 荒木正健, 荒木喜美: CRISPR-Cas9 とゲノム編集で解き明かす尾部退行症候群の発症メカニズム, 第 48 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 2016.9.23-9.24, 熊本県 (くまもと県民交流館パレア)
- (13) 大賀俊範, 武田伊世, 江藤聡, 中原舞, 吉信公美子, 荒木喜美, 荒木正健: CSCT2 領域 (3.1Mbp) 欠損マウスラインの樹立, 日本遺伝学会第 88 回大会, 2016.9.7-9.10, 静岡県 (日本大学)
- (14) 荒木正健, 武田伊世, 大賀俊範, 江藤 , 中原舞, 吉信公美子, 荒木喜美: 染色体特異的にクラスターを形成しているトラップ領域 (CSCT13) の解析, 日本遺伝学会第 88 回大会, 2016.9.7-9.10, 静岡県 (日本大学)

[その他]

ホームページ等

<http://irda-genetics.kuma-u.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 荒木 正健

ローマ字氏名: (ARAKI, Masatake)

所属研究機関名: 熊本大学

部局名: 生命資源研究・支援センター

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 80271609

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 竹田 直樹

ローマ字氏名: (TAKEDA, Naoki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。