

平成30年 5月30日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18821

研究課題名(和文) 一本鎖DNAを用いた高効率ノックイン法とそれによるモデル動物の作製

研究課題名(英文) Easi-CRISPR for creating genetically modified mice using long ssDNA.

研究代表者

三浦 浩美 (MIURA, Hiromi)

東海大学・医学部・特定研究員

研究者番号：90599523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、独自のssDNA合成法(ivTRT法)を用いたノックインマウス作製法の有用性を示すため、これまでよりも長いssDNA(約数千bp)の合成に挑戦し、レポーターノックインマウスやコンディショナルノックアウトマウス作製への応用を目指した。また、より簡便なssDNA合成法やそれを用いたノックイン法の可能性についても検証を行った。最終的に1-2キロ程のssDNA合成に成功し、肝線維化解析に有用なレポーターマウスや、複数のコンディショナルノックアウトマウス作製に活用することができた。本ノックイン手法はEasi-CRISPR法と命名し、本研究結果と方法についてそれぞれ論文として公開した。

研究成果の概要(英文)：CRISPR/Cas9-based genome editing technology allows to disrupt mouse genes with high efficiency, but it was still challenging to create knock-in and conditional knock out models (typically 0-10%). We previously demonstrated that long single-stranded DNA (ssDNA) (up to 500 bases) serve as very efficient donors for knock-in. In this study, we tried to generate much longer ssDNA by using original ivTRT method, and applied it for generation of reporter knock-in and conditional knock-out mouse models. As a result, up to 2000 bases of ssDNA was synthesized with the ivTRT method. By using these ssDNAs, several reporter knock-in and conditional knock-out mice were generated, which insertion efficiency was quite high (typically 30%-60%, and up to 100% in some cases). We call this method Easi-CRISPR (Efficient additions with ssDNA inserts-CRISPR).

研究分野：遺伝子工学

キーワード：CRISPR/Cas9 一本鎖DNA レポーターノックインマウス コンディショナルノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

CRISPR/Cas9 システムは、遺伝子ノックアウト (KO) マウスやノックイン (KI) マウスの作製に幅広く利用されている。特に遺伝子 KO マウスの作製効率は 20-60%以上と非常に高いことが知られていた (Wang ら Cell 2013)。一方、KI を行う場合は、標的 DNA 領域に相異なる塩基配列を両端に付加した二本鎖 DNA (dsDNA) 断片、あるいはそれを有する環状 DNA をリペアーDNA として用いるが、実際にリペアーDNA が挿入された KI マウスの作製効率は、数 10%程度であった (Yang ら Nat Protoc 2014)。

そのような中、申請者は、“dsDNA より一本鎖 DNA (ssDNA) を用いた方が KI 効率が高い” (Ran ら Nat Protoc 2013) という点に着目し、ssDNA を用いた高効率 KI 手法の開発を目指そうとしていた。しかしながら、合成 ssDNA として入手可能なオリゴ DNA の長さが 200 塩基までと短いため、挿入可能な DNA 配列長には上限があり、一定の長さを持つ遺伝子配列を挿入することはできなかった。そこで申請者は、*in vitro* 転写で合成した RNA を鋳型として cDNA を合成するという、古典的な分子生物学的実験手法を応用することで、より長い ssDNA を合成する方法 (*in vitro* Transcription and Reverse Transcription: *ivTRT* 法) (図 1) を確立し、実際に約 500 塩基の長鎖 ssDNA を合成し、それを CRISPR 系に用いることで、高効率 (10-85%: 平均 50%程度) な KI マウス作製に成功した (Miura ら Sci Rep 2015)。しかしながら、500 塩基以上の長さの ssDNA 合成については検討しておらず、また、これまでに数遺伝子座位でしか KI を試していなかった。

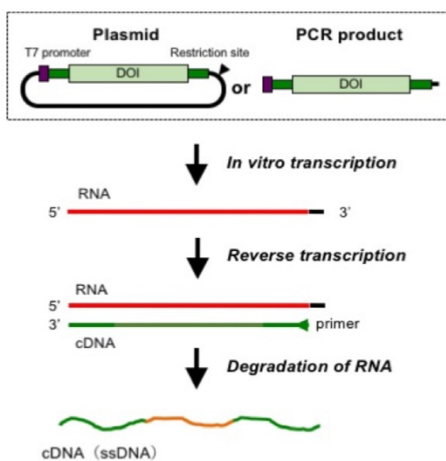


図 1 : *ivTRT* 法 (*in vitro* Transcription and Reverse Transcription)

2. 研究の目的

上述した研究背景のもと、より長い遺伝子配列を複数の遺伝子座位に安定して KI できるようになれば、多種多様な機能的遺伝子配列 (各種レポーター遺伝子や、Cre、FLP、tTA 等) を簡便に作製できるようになり、本手法の有用性はより向上するものと考えられる。そこで本研究では、申請者が独自に開発してきた一本鎖 DNA 合成法 (*ivTRT* 法) を用いて、~数千塩基の一本鎖 DNA 合成に応用し、より長い ssDNA 断片の挿入を試みる。具体的には、レポーター遺伝子挿入による肝線維化可視化モデルマウスの作製と、floxed 配列挿入によるコンディショナルノックアウト (CKO) マウス作製への応用を目指した。また、より簡便な一本鎖 DNA 合成法についても検討し、システムの改善と応用性の拡張を図ることとした。

3. 研究の方法

本研究では、主に以下 3 点について行った。

(1) 500 塩基以上の長鎖 ssDNA の合成と、機能的遺伝子配列の KI への応用

ivTRT 法を用いて我々の既報より長い ssDNA (~数千塩基) の合成を行い、複数種類のレポーターノックインマウスの作製を行った (図 2 参照)。

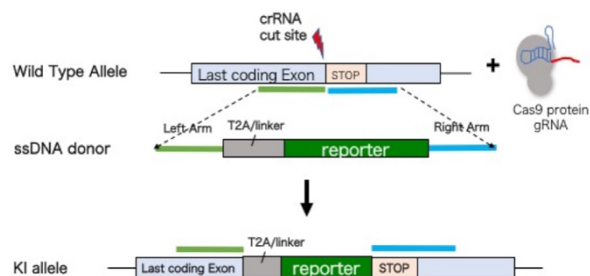


図 2 : レポーター遺伝子ノックインマウスの作製法

そのためにまず、MMP9 と MMP13 (肝線維化に伴い発現が変動する遺伝子)、及びアルブミン (A1b) (肝臓で高発現している遺伝子) に関して、CHOPCHOP サイトを利用して gRNA の標的領域 (停止コドン近傍) を選定した。また CRISPR 関連核酸としては crRNA/tracrRNA と Cas9 タンパク質 (または Cas9 mRNA と sgRNA) を用いた。合成した ssDNA は、“T2A-mCitrine”、“T2A-mCherry”、“T2A-iRFP” 配列に、

各遺伝子の停止コドン付近の配列を相同領域（それぞれの末端に 60~100 塩基ずつ）として付加したものである。これらの配列の上流に T7 プロモーター配列を加えた DNA を、人工遺伝子合成サービスを利用して合成し、それをテンプレートとして mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit で RNA を合成、さらに合成 RNA を用いて SuperScript III Reverse Transcriptase にて cDNA を合成した (*iv*TRT 法)。次に、調製した ssDNA を、Cas9 タンパク質、crRNA/tracrRNA（または Cas9 mRNA と sgRNA）と混合し、C57BL/6N マウスから得た受精卵（約 50 個ずつ）に顕微注入した。得られたマウスに関しては、挿入配列をシーケンス確認し、問題のないファウンダー個体の一部を交配によりライン化した。

(2) floxed 配列の挿入によるコンディショナル KO マウス作製への応用

コンディショナル KO (CKO) マウス作製の需要は多いものの、CRISPR を用いても 2 つの *loxP* 配列を 2 カ所に同時に挿入することは未だ難しいと言うのが、当該分野のコンセンサスであった (図 3A 参照)。そこで今回、“*loxP*-遺伝子(exon)-*loxP*” 配列を 1 本の ssDNA として合成し、これを標的遺伝子に KI することにより CKO マウスの作製を行った (図 3B 参照)。

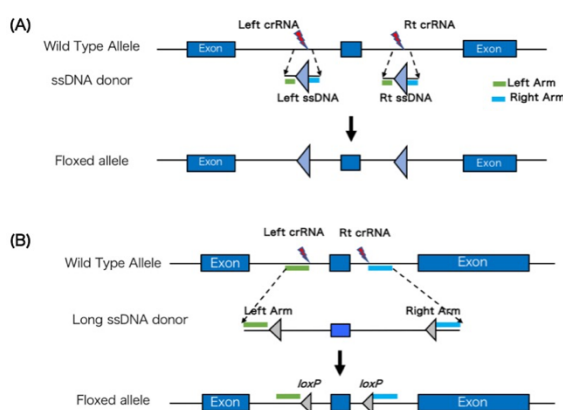


図 3：コンディショナルノックアウトマウスの作製法
従来法(A)と *iv*TRT法で作製した long ssDNA を用いた方法

具体的には、コーデン病原因候補遺伝子など、共同研究者が注目する遺伝子(対象遺伝子は、*Ambra1* と *Pitx1*)に関して、CHOPCHOP サイトを利用して gRNA の標的領域を選定した。イントロン領域を gRNA のターゲット (*loxP* 配列を挿入する部分)とするが、生物種間で保存性の少ない領域を選んだ。また CRISPR 関連

核酸としては crRNA/tracrRNA と Cas9 タンパク質を用いた。合成する ssDNA は、“*loxP*-エクソン-*loxP*” に相同領域を付加した ssDNA である。配列の上流に T7 プロモーター配列を加えた DNA を、人工遺伝子合成サービスを利用して合成し、それをテンプレートとして mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit で RNA を合成、さらに合成 RNA を用いて SuperScript III Reverse Transcriptase にて cDNA を合成した。調製した ssDNA を、Cas9 タンパク質、crRNA/tracrRNA と混合し、C57BL/6N マウスから得た受精卵(約 60-90 個)に顕微注入した。得られたマウスに関しては、挿入配列をシーケンス確認し、問題のないファウンダー個体からライン化した。

(3) *iv*TRT 法以外の ssDNA 合成法の確立

*iv*TRT 法による ssDNA 合成は、その合成長に限界(~5 キロ塩基)があり、且つ合成量に制限があると考えられる。特に *iv*TRT 法による ssDNA 合成量に関しては、顕微注入に用いるには十分であるが、エレクトロポレーションを介した、より簡便な KI 実験(Takahashi ら Sci Rep 2015)に使用するためには、より大量の ssDNA が必要となる。そこで、より長い配列、または大量の ssDNA 合成を可能とする方法として、 ϕ 29 DNA ポリメラーゼ、 λ エキソヌクレース、エキソヌクレース I の 3 種類を用いた方法を検証した。これらに関しては、比較的短い遺伝子発現カセット (CMV プロモーター-eGFP-pA[全長 1.5 キロ塩基]等)の合成が可能であるかを検討した。

4. 研究成果

(1) 500 塩基以上の長鎖 ssDNA の合成と、機能的遺伝子配列の KI への応用

各 T2A-蛍光遺伝子を含む長鎖 ssDNA (900-2000 塩基)を *iv*TRT 法により合成したところ、全ての ssDNA について合成可能であることが分かった。また、合成した ssDNA を用いて、各遺伝子座位(アルブミン、Mmp9、Mmp13)へのノックインを行ったところ、Mmp9 と Mmp13 に関しては、約 40-67% もの高効率でノックイン個体を作製できることが明らかとなった(図 4 参照)。得られたマウスに関して、挿入配列を確認したところ、MMP9 と MMP13 に関しては 8 割以上が正確

な配列として挿入されていた。また、全てのノックインマウスにおいて系統樹立することができた。

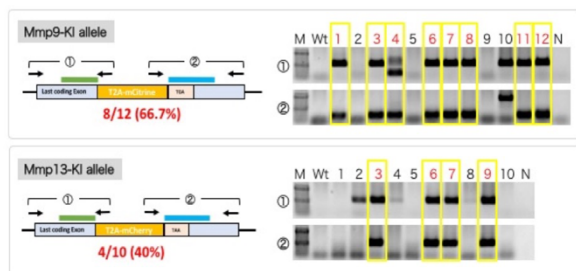


図4：レポーター遺伝子ノックインマウスの作製結果

(2) floxed配列の挿入によるコンディショナルKOマウス作製への応用

ivTRT法により合成したssDNA (800塩基~1000塩基程度)を用いて、*Ambra1*、*Pitx1*のコンディショナルノックアウトマウスの作製を行った。その結果、*Ambra1*は8匹の産仔を得、*Pitx1*は10匹の産仔を得ることができた。産仔の離乳時に遺伝子タイピングを行いシーケンス確認を行った結果、それぞれ40~75%の高効率でfloxed配列を有するマウスを得たことが明らかになった(図5参照)。また既報の方法でコンディショナルノックアウトマウスの作製(loxP配列を単独で2カ所に挿入するといった方法)も試みたものの、目的個体は得られなかった。ivTRT法で作製したマウスにおいては、各floxed配列が次世代に伝搬することを確認でき、系統として樹立することができた。

尚、1)、2)で作製したマウスの解析に関しては、共同研究者らによって現在進行中である。

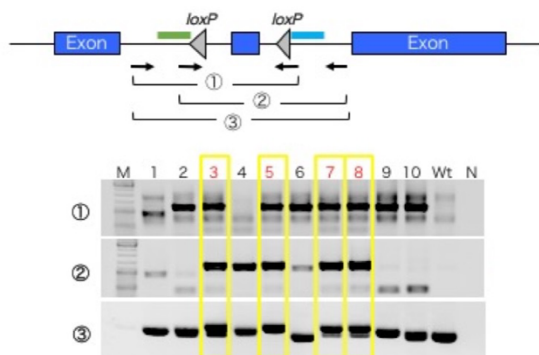


図5：*pitx1*コンディショナルノックアウトマウスの作製結果

(3) ivTRT法以外のssDNA合成法の確立

新たな一本鎖DNA合成法に関しては、 ϕ 29DNAポリメラーゼ、 λ エキソヌクレース、エキソヌクレースIの3種類を用いた方法を試みた。期待通りの一本鎖DNAが得られたのは λ エキソヌクレースを用いた時のみであった。しかしながら、本法では二本鎖を一本鎖にする分解系を用いているため、合成したい一本鎖DNAの長さによってその都度条件検討を行う必要があると考えられる。

本研究により得られた結果は、学術誌への投稿(2報)を行い、研究論文としてGenome Biology誌に、確立した手法の標準化プロトコルとしてNature Protocol誌にて発表することができた。更にEasi-CRISPR法については、2017年9月にユタ大学で開催されたTransgenic Technology meetingでワークショップを開催することができた。

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 3件)

- Ohtsuka M., Sato M., Miura H., Takabayashi S., Matsuyama M., Koyano T., Arifin N., Nakamura S., Wada K. and Gurumurthy CB. i-GONAD: a robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases. **Genome Biol.** 19: 25 (2018) (査読有り)
- Miura H.[†], Quadros RM.[†], Gurumurthy CB.* and Ohtsuka M.* Easi-CRISPR for creating knock-in and conditional knockout mouse models using long ssDNA donors. **Nat Protoc.**, 13: 195-215 (2018) [†]equal contribution, *correspondence (査読有り)
- Quadros RM.[†], Miura H.[†], Harms DW., Akatsuka H., Sato T., Aida T., Redder R., Richardson GP., Inagaki Y., Sakai D., Buckley SM., Seshacharyulu P., Batra SK., Behlke

MA., Zeiner SA., Jacobi AM., Izu Y., Thoreson WB., Urness LD., Mansour SL.*, Ohtsuka M.* and Gurumurthy CB.* *Easi*-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins. **Genome Biol.** 18: 92 (2017) †equal contribution, *correspondence (査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

1. Masato Ohtsuka, HiroMi Miura, Channabasavaiah B Gurumurthy, Masahiro Sato. improved GONAD (i-GONAD) (I) as ex vivo manipulation-free genome-editing system allowing efficient knock-out, large deletion, and knock-in. 14th Transgenic Thecnology Meeting. 2017.Oct. Snowbird, Salt Lake City, USA
2. 三浦 浩美、Gurumurthy Channabasavaiah、相田 知海、稲垣 豊、佐藤 正宏、佐藤 健人、大塚 正人 「Easi-CRISPR:高効率なノックインマウス作製法」 Easi-CRISPR:高効率なノックインマウス作製法 2016年11月 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
3. 三浦 浩美、Channabasavaiah Gurumurthy、稲垣 豊、大塚 正人 「長い一本鎖DNAを用いたノックインマウス作製」平成28年度新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【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 2016年9月 蓼科グランドホテル滝の湯(長野県茅野市)
4. 大塚正人、相田知海、三浦浩美、Channabasavaiah Gurumurth 「Easi-CRISPR:長鎖一本鎖DNAを用いた高効率ノックイン法」日本ゲノム編集学会第1回大会 2016年09月

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: Dna editing using single-stranded dna

発明者: CB GURU, H Miura, M Ohtsuka

権利者: Nebraska Univ., Tokai Univ.

種類: 特許

番号: PCT/US2016/035660

出願年月日: 2016年06月03日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 浩美 (MIURA, HiroMi)

東海大学・医学部・特定研究員

研究者番号: 90599523