

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19261

研究課題名（和文）着床前胚の新規選抜技術の開発

研究課題名（英文）Development of selection technology for preimplantation embryos

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、着床前胚でモザイク回避しつつ変異導入し、目的の変異パターンの胚のみを選抜できる新たな実験系の開発を行った。Anti-CRISPRによる失活ツールについて検討し、受精卵で有効なツールの開発に至った。また、受精卵内で、Cas9変異体についてスクリーニングし、標的認識の拡張にSpCas9-NGが、また、1塩基レベルで正確な標的認識にHypaCas9がそれぞれ有効であることが明らかとなった。更に、着床前発生を人為的に停止できる因子として、ジェノトキシン関連因子が有効であることが明らかとなった。今後、これらの知見を統合することで、着床前胚を選抜するスキームを構築できると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究計画内で、有効なツールの確立には至らなかったが、得られた知見を統合することで、塩基配列に依存した着床前胚の選抜技術が確立できると期待される。また、派生技術として、得られた受精卵内で精密なゲノム編集が可能なツールに関しては、今後、受精卵を介したゲノム編集による遺伝子改変動物の作製系に有用であると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study attempted to develop new selection technology for preimplantation embryos, which has the desired mutation while avoiding mosaicism. We have established a useful Anti-CRISPR inactivation tool usable in zygotes. Besides, we screened for Cas9 mutants in zygotes and found that SpCas9-NG and HypaCas9 are usable for the expansion of targetable loci and accurate target recognition at the single-base level, respectively. Also, we found that genotoxin-related factors were effective in stopping preimplantation development artificially. It is expected that a scheme for selecting preimplantation embryos can be constructed by integrating these findings.

研究分野：動物発生工学

キーワード：発生工学 ゲノム編集

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム編集技術の発展により、従来のジーンターゲットング技術と比較してはるかに効率的に個体レベルの遺伝子ノックアウトやノックインが実施可能となった。特に、受精卵を介してゲノム編集を行う方法によって、極めて短期間に目的のゲノム改変個体を作製することができるようになった。しかし、その一方で、受精卵を介したゲノム改変技術は、未だ多くの課題を抱えている。第一に、産子のうち目的の改変パターンを持つ個体は限られているという点である。ゲノム編集によるノックアウトは、ランダムな変異の導入に依存するため、必ずしも目的とする遺伝子破壊パターンが導入されるわけではない。また、ノックインの場合は、受精卵を介した場合、極めて限られた胚でしか正確に導入されないことが明らかとなっている。更に、受精卵を介したゲノム改変は、各割球で異なる変異が導入されうるため、得られる第一世代がモザイク変異個体となり、直接解析に供することができないという問題がある。これらの課題を回避するためには、大規模に受精卵移植を行い、大量の産子を得たうえで目的の変異個体を獲得し、そのうえで交配を介して次世代個体を得ることで、ようやく確実なゲノム改変個体を得ることができる。マウスやラットなどの実験動物では多産でありかつ生殖サイクルの短いために大規模な実験が可能であり、現状の実験系によってゲノム改変個体を作製することができる。しかし、3Rの観点からは解決しなければならない課題であり、更には産子数の限られた動物種や生殖サイクルの長い産業動物などでの応用を阻害する大きな要因となっている。産業動物では主に、上記の問題があるため、受精卵を介したゲノム改変は行わず、確実なゲノム改変が行われた培養細胞を樹立し、体細胞核移植を介してゲノム改変個体を作製するのが一般的である。この方法では、受精卵とは異なり得られる産子は目的の変異を持つが、体細胞核移植は産子率が極めて低く、得られた産子の出生第一世代はエピジェネティクス異常による形質の異常を伴うことがあり、結果的に世代を超えた個体による表現型解析が求められ、受精卵を介したゲノム編集と同様にコストや時間を要する。このような点が産業動物でゲノム改変個体を作製する上での最大の律速となっている。従って、極めて限られた研究施設でしかゲノム改変家畜の研究は実施されておらず、そのために産業動物におけるゲノム配列情報の逆遺伝学的理解は進んでいない。

### 2. 研究の目的

上記の課題を解決するために、本研究計画では、第一世代で逆遺伝学的研究が可能となる、確定的にゲノム改変が可能な技術を検討した。具体的には、モザイク変異を回避した受精卵でのゲノム編集系の開発、および着床前の段階で目的の配列改変が行われた胚を選抜し、“当たり”のもののみを移植に供することができる技術の開発を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) モザイク回避技術の検討

受精卵を介したゲノム編集においてモザイクを回避するためには、1-細胞期のDNA合成期以前に変異導入を達成し、その後は人工ヌクレアーゼが失活すればよいと考えた。我々はこれまでに、受精卵の早期や未受精卵でもCRISPR/Casによって変異導入が可能であることを報告している(Onumaら、J Reprod Dev., 2017)。そこで、受精卵内で、人工ヌクレアーゼの活性を停止するツールの開発を行った。

#### (2) 胚選抜技術の開発

任意のDNA配列を持つ胚のみを、胚を非破壊で選抜できる技術を確認するためには、標的配列を正確に認識し、配列依存的に遺伝子機能を活性化し、活性化された遺伝子機能によって胚発生を停止させることで達成できると考えた。そこで、受精卵において正確にDNA配列を識別できる技術の開発、胚発生を迅速に停止できる遺伝子の探索、配列依存的に遺伝子機能を活性化するツールの開発、に取り組んだ。

### 4. 研究成果

(1) CRISPR/Casの機能阻害を誘導するAnti-CRISPRタンパク質が多数報告されており、我々は、このうち*Listeria monocytogenes*のプロファージに由来するAcrIIA2およびAcrIIA4を利用したツール開発に取り組んだ。はじめに、培養細胞においてこれらの阻害能を比較したところ、AcrIIA4がより高いCRISPR/Cas活性阻害能を示した。一方、受精卵では活性阻害能を示さなかった。そこで、AcrIIA4に核移行シグナルを付加したところ、CRISPR/Casによる変異導入が阻害され、受精卵内でCRISPR/Casを失活させるツールの開発に成功した。続いて、薬剤誘導による任意のタイミングで失活を誘導するために、ERT2を付加したAcrIIA4を用いて、タモキシフェン依存的にCRISPR/Casの失活を誘導できるか検討した。培養細胞における検討では、タモキシフェンによってCRISPR/Casによる変異導入の阻害が誘導された。一方、受精卵で同様に検討したところ、阻害能は認められず、NLSの付加や配置について検討しても、同じく阻害能が認められなかった。以上より、AcrIIA4の薬剤誘導による活性制御は可能であるものの、受精卵での利用には更なる検討が必要であることが示唆された。

(2) 着床前胚を利用したスクリーニングによって、Cas9変異体の機能評価を行った。CRISPR/CasはPAMと呼ばれる決まった塩基配列がgRNA認識配列に隣接している必要があり、一般的に利用される*S. pyogenes*由来のCas9はNGG配列をPAMとして認識する。そこで、よ

り幅広い座位を標的配列として識別できるようにするために、Cas9 変異体である SpCas9-NG の受精卵への利用可能性について検討した。その結果、SpCas9-NG は従来の Cas9 と比較して若干活性は落ちるものの、NGG のほかに NGA、NGT、NGC を PAM とした場合でも受精卵において高効率に変異導入できることが分かった。Tyr を標的とした gRNA と SpCas9-NG を注入した C57BL/6N 受精卵を胚移植したところ、Tyr ノックアウトの表現型である白色毛を呈した産子が得られた。更に、NGG 配列が標的周辺に存在しないために従来型 Cas9 の利用ができなかった、Nr6a1 停止コドンへのノックインについて、SpCas9 を利用して実施したところ、高効率にノックインマウスの作製が認められた。更に、eSp 型の高親和性変異を組み合わせた eSpCas9-NG を利用した結果、同等の効率でかつオフターゲット変異を回避したノックインマウスの作製が認められた。以上の結果より、SpCas9-NG は受精卵において NGN 配列を PAM として利用することができ、標的設計を拡張できることが明らかとなり、異常の結果は Scientific Reports 誌に報告した。

続いて、受精卵において、標的配列を正確に認識できる Cas9 変異体について検討した。我々はこれまでに Cas9 ニッカーゼを利用したオフセットニックング法が受精卵を介したゲノム編集におけるオフターゲットリスクの回避に利用できることを報告している (Fujii ら、BBRC、2014) が、この方法は標的に対して 2 つの gRNA を設計する必要がある。そこで、単独の gRNA でもオフターゲット変異を回避することができる Cas9 変異体の利用可能性について検討することとした。培養細胞でいくつか報告されているもののうち、本研究では、HypaCas9 について検討した。初めに、既報 (Fujii ら、NAR、2013) で野生型 Cas9 によってオフターゲット変異が誘導されることが明らかとなっている gRNA を利用して、野生型 Cas9 と HypaCas9 の比較を行った。その結果、いずれの Cas9 も標的配列に対して高効率に変異を導入したのに対して、オフターゲット座位に対する変異導入は、野生型 Cas9 では高効率に認められたものの、HypaCas9 ではすべての胚でオフターゲット変異が認められなかった。続いて、標的認識配列の各 1 塩基にミスマッチを持つ gRNA を利用して、受精卵において変異導入効率を、評価したところ、野生型 Cas9 は 1 塩基のミスマッチが存在しても標的に対して高効率に変異を導入したのに対して、HypaCas9 ではこれらの変異が抑制された。以上の結果から、HypaCas9 は受精卵において 1 塩基レベルで正確に識別できることが明らかとなった。さらに、この正確性を利用して、C57BL/6N と DBA/2 の雑種受精卵において、SNP を介して片方のアレルのみの変異導入が可能か検討した結果、HypaCas9 によってアレル選択的に変異導入が可能であり、従来は両アレル変異で致死となり生存産子が得られなかった必須遺伝子を対象とした場合もヘテロ変異の生存個体の作製が可能であることを明らかにした。以上の結果は Communications Biology 誌に報告した。

以前の検討において、ATM を起点とする DNA 損傷修復系の誘導が受精卵の卵割停止を誘導することを見出していた (永島ら、日本畜産学会大会第 119 回大会、2015)。ATM は分子量が大きく、取り扱いが難しいため、下流の因子である Chk2、p53 および Chk1 を受精卵で過剰発現させ、発生能を観察した。その結果、p53 および Chk1 の過剰発現は着床前発生に影響を及ぼさず、p53 過剰発現胚は胚移植後に正常に産子に発生した。一方、Chk2 過剰発現胚は、すべて 2-細胞期までで発生を停止した。以上の結果から、Chk2 の遺伝子活性を利用することで、選択的に胚発生を停止できることが示唆された。

DNA 配列の配列依存的に遺伝子活性を制御するツールとして、既報を参考とした (Slomovic と Collins、Nat Methods、2015)。すなわち、DNA 結合タンパク質とインテインを介したスプリット遺伝子の融合遺伝子を利用し、決まった配列に融合遺伝子が結合し、インテインのスプライシング反応によってスプリット遺伝子が再構築して結果的に遺伝子が機能することができる。そこで、DNA 結合配列として CRISPR/Cas を利用したツールが機能するか検討した。ヌクレアーゼ活性失活型の dCas9 にインテインを介してスプリット GFP を結合した融合遺伝子を構築した。これらと共に、gRNA および 3~24 塩基の距離で離れて + & + 向き、+ & - 向き、- & + 向きに gRNA 認識配列をコードしたプラスミド DNA を HEK293 に遺伝子導入したが、いずれの条件でも GFP の再構築は認められなかった。そのため、既報に従って ZF を利用することを考慮し、そのうえで、ZF の薬剤誘導による活性制御によりより厳密な制御が可能であると考えた。そこで、ZFN に ERT2 を付加し、タモキシフェン依存的に活性制御が可能か検討した。既報 (Fujii ら、J Reprod Dev、2015) で高い活性が明らかとなっている Aqpep に対する ZFN に ERT2 を付加してタモキシフェンによる影響を検討したところ、Left-ZF にのみ ERT2 を付加することで、タモキシフェン依存的に活性制御できることが明らかとなった。今後、この ZF ツールを利用して前述の融合遺伝子を構築し、受精卵における利用可能性を検討することで、DNA 配列依存的な遺伝子活性制御ツールの確立につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikeda Arisa, Fujii Wataru, Sugiura Koji, Naito Kunihiko	4. 巻 2
2. 論文標題 High-fidelity endonuclease variant HypaCas9 facilitates accurate allele-specific gene modification in mouse zygotes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1038/s42003-019-0627-8">https://doi.org/10.1038/s42003-019-0627-8</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Wataru, Ito Haruka, Kanke Takuya, Ikeda Arisa, Sugiura Koji, Naito Kunihiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Generation of genetically modified mice using SpCas9-NG engineered nuclease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12878
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-49394-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井 渉
2. 発表標題 受精卵を介したゲノム編集技術の現状と展望
3. 学会等名 岡山大学学術研究拠点形成事業「世界を先導するリプロダクションコアの形成」研究交流会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田 有沙, 藤井 渉, 杉浦 幸二, 内藤 邦彦
2. 発表標題 マウス受精卵のゲノム編集におけるHypaCas9の利用可能性の検討
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井 渉, 伊藤 遥, 菅家 卓哉, 池田 有沙, 杉浦 幸二, 内藤 邦彦
2. 発表標題 SpCas9-NGを利用した遺伝子改変マウスの作製
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 編：日本繁殖生物学会	4. 発行年 2020年
2. 出版社 インターズー	5. 総ページ数 368
3. 書名 繁殖生物学 改訂版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

応用遺伝学研究室ホームページ <a href="http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/iden/mokuji.htm">http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/iden/mokuji.htm</a> 個人ホームページ <a href="http://wtrfujii.com/">http://wtrfujii.com/</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	種村 健太郎  (Tanemura Kentaro)  (20332322)	東北大学・農学研究科・教授    (11301)	