

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06472

研究課題名(和文) ゲノム編集における相同組み換え増幅因子の検証

研究課題名(英文) Evaluation of homologous recombination enhancers in genome editing

研究代表者

塩澤 誠司 (Shiozawa, Seiji)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：10447039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集技術において、遺伝子の欠失を目的とした単純ノックアウトと比較して、任意の変異や遺伝子断片を導入しうるノックインは未だ効率が低く、問題となる。本研究課題ではまず、マウスES細胞及びマウス受精卵において、ゲノム編集の際に簡便にノックイン効率を評価しうる系を確立した。この系を用い、強制発現によりマウスES細胞においてノックイン効率の向上が認められる遺伝子及び遺伝子セットを見出した。さらに、マウス受精卵においてはノックイン効率を上昇させる低分子化合物を見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集技術は簡便に遺伝子を改変できる優れた技術であり、生命科学研究のみならず医療や畜産分野などへの応用も期待されている。しかしながら、遺伝子改変の精度や効率の点では未だ改良の余地も多い。本研究課題では、ノックインによる遺伝子改変効率の改善を目的とし、まずその効率を簡便に評価する実験系を構築した。さらにこの実験系を用い、いくつかの遺伝子及び低分子化合物がノックイン効率を改善することを見出した。これにより、ゲノム編集技術の高度化に寄与することが期待される。また、今回確立した実験系を用いることで、さらに高い効果を持つ因子の発見に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Genome editing technology is an excellent technology that allows genetic modification easily. However, compared to simple knockout, homologous recombination-mediated knock-in is still less efficient and remains a major challenge. In this research subject, we have constructed a system that enables us to easily evaluate the knock-in efficiency in mouse ES cells and mouse embryo genome editing. Using this system, we found genes and small molecules that improve the knock-in efficiency.

研究分野：実験動物学

キーワード：ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

近年、CRISPR/Cas9 や TALEN を始めとするゲノム編集技術が急速な発展を遂げ、医学生物学分野において革新的な遺伝子改変ツールとして広く普及している。ゲノム編集技術では、部位特異的 DNA 二本鎖切断により任意の遺伝子座に DNA 損傷を引き起こし、非相同末端結合 (Non-homologous end joining; NHEJ) による修復過程において頻繁に起こる塩基の欠失・挿入等のエラーによるフレームシフトを利用し、遺伝子機能の喪失を起こすことができる。これにより、極めて高効率に遺伝子のノックアウトが可能になった。

この技術では、単純な遺伝子欠失を狙うものであるが、さらに相同組換えを応用したノックインも可能である。この技術では、CRISPR/Cas9 等による部位特異的 DNA 二本鎖切断の際に、標的部位と相同な配列を持つ 1 本鎖オリゴ DNA (ssODN) あるいは二本鎖 DNA 等のドナー DNA を加えることで、相同組換えによって任意の変異あるいは DNA 断片を標的部位に挿入することが可能である。多くの疾患においては、1 塩基置換等の変異により引き起こされることが多いため、ヒト疾患 iPS 細胞や疾患モデルマウスの作成において、ノックイン技術はノックアウトと比較して優位性を持つ。また、時空間特異的なコンディショナル・ノックアウトなど高度な遺伝子改変を行う際にもノックイン技術は欠かせないものとなる。

しかしながら、この際に DNA 修復過程において NHEJ ではなく、もう一つの DNA 修復機構である相同指向性修復 (Homology-directed DNA repair; HDR) を引き起こす必要があるが、NHEJ よりも頻度が非常に低いため、一般にノックインの効率は単純ノックアウトよりもはるかに劣る。そのため、ノックイン効率を上昇させる手法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究課題では、ゲノム編集におけるノックイン効率の上昇を目的とし、まず、ノックイン効率の評価系の構築及びノックイン効率を上昇させる因子の探索を試みた。

我々はこれまで、小型の霊長類であるコモンマーモセットの ES 細胞及び受精卵におけるゲノム編集を用いたノックイン技術の開発を行ってきた。これにより、マーモセット ES 細胞における高効率ノックイン技術を確立するに至った。この開発過程において、意外なことに、マーモセット ES 細胞におけるノックインが、ゲノム編集の有無にかかわらず、極めて高い効率で起こることを見出した。通常、ヒトを含む霊長類多能性幹細胞はマウス ES 細胞と比較して相同組み換え効率が極めて低いとされるが、マーモセット ES 細胞においてはマウスをもはるかに凌駕する効率であった。

トランスクリプトーム解析により、マーモセット ES 細胞では他の細胞に比べ、相同組み換えに関わる複数の因子が高発現していることを見出した。そこで、これらの因子 (遺伝子 A, B, C, D, E) が他の細胞におけるノックイン効率に及ぼす影響の解析を行うことを目的とした。さらに、ノックイン効率の上昇効果が期待される低分子化合物についても検討を行なった。

3. 研究の方法

1) マウス ES 細胞におけるノックイン効率検出系の構築

マウス ES 細胞の Sox2 遺伝子座の 3' 端に対し蛍光レポーター遺伝子である Venus をノックインし、融合タンパクとして発現させるようターゲティングベクターを設計、構築した。このベクターと共に Sox2 遺伝子 3' 端に対する gRNA 及び Cas9 の発現ベクター、ノックイン効率増幅因子候補の発現ベクターをマウス ES 細胞に導入した。この結果得られる正しい相同組み換え体では、Venus が Sox2 遺伝子の核移行シグナルをトラップすることにより核に局在して発現するため、ノックインの成否を容易に判別可能である。ハイコンテントイメージアナライザーによる画像解析により、Venus が核に局在して発現するコロニーの割合を定量評価した (図 1)。

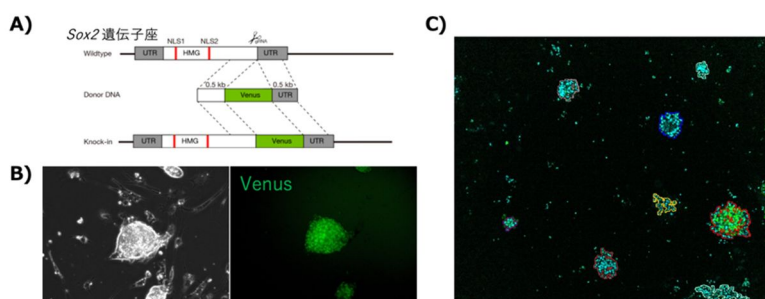


図1 Sox2遺伝子に対するVenusノックインの概要

A)ベクター及びガイドRNAのデザイン B) VenusがノックインされたマウスES細胞コロニー。蛍光シグナルの核局在を示す。C) ハイコンテントイメージアナライザーを用いたVenus陽性コロニーの定量解析の例

2) マウス受精卵におけるノックイン効率検出系の構築

マウス受精卵におけるノックイン効率の評価系を構築するため、マウスの毛色決定に重要なチロシナーゼ(Tyr)遺伝子に対する gRNA 及び第4エクソンに1塩基変異によるアミノ酸置換を引き起こす ssODN を設計、構築した。この系を用いることで単純ノックアウトではアルビノに、変異がノックインされるとチロシナーゼが温度感受性変異を獲得することにより特異な毛色を呈するため、容易に遺伝型を判別することができる。

さらに、in vitro における遺伝型判定を容易にするため、gRNA によって切断部位に変異が導入されると高率に内在性 HaeIII サイトを失うようにデザインした。さらに、ノックインが成立するとサイレント変異により MfeI サイトが新たに導入されるよう ssODN をデザインした。これにより、遺伝型判定の際に PCR 産物の RFLP (制限酵素断片長多型) 解析が可能となり、より簡便に遺伝型判定を行うことができる (図2)。

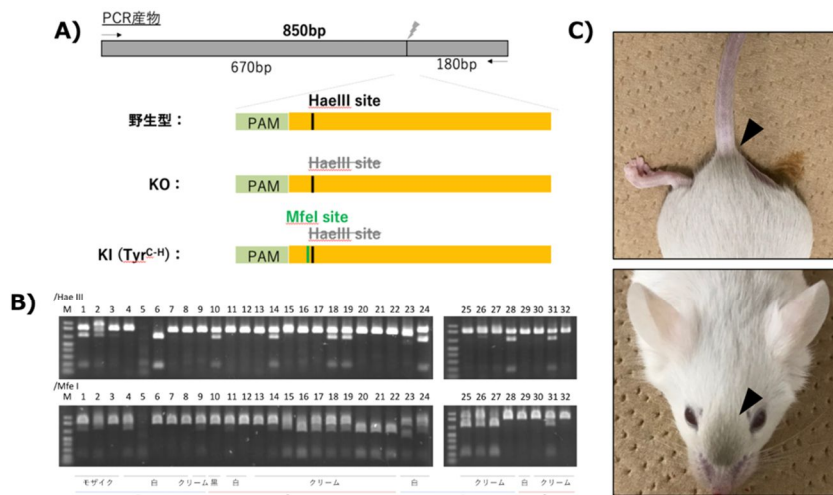


図2 Tyr遺伝子におけるRFLP解析及び毛色による遺伝型判定

A) 本研究におけるPCR-RFLP解析の概略図 B)各遺伝型における毛色と制限酵素切断パターン C)KIマウスの毛色を示す。尾根部(上)及び鼻梁(下)に特徴的な斑を認める(矢頭)。

この系を用い、ノックイン効率増幅因子候補のリコンビナントタンパク質及び培養細胞においてノックイン効率の上昇効果を示す低分子化合物 X,Y について、マウス受精卵におけるノックイン効率に及ぼす影響の評価を行なった。

4. 研究成果

1) マウス ES 細胞におけるノックイン効率の検討

まず、構築した Sox2-Venus を用いたノックイン効率検出系を用い、ノックイン効率増幅因子候補となる遺伝子 A, B, C, D, E の効果を検討した。それぞれ単独の遺伝子を発現するベクターを導入したところ、遺伝子 C 以外の4種では、Mock と比較してノックイン効率の有意な上昇が認められた。一方、遺伝子 C ではノックイン効率の上昇効果は認められなかった。

次に、5種類全て(AII)及び遺伝子Cを除く4因子(AII-C)を同時に導入した際の効果を検討した。その結果、4因子を導入した際に最もノックイン効率が高かった(図3)。

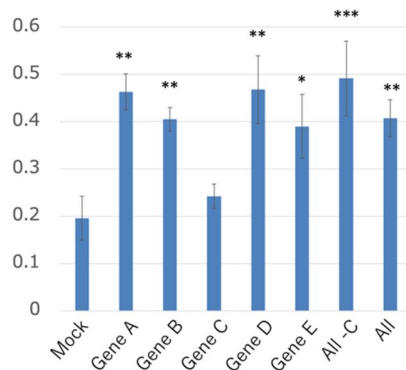


図3 マウスES細胞ゲノム編集におけるノックイン効率増幅因子の効果

マウスES細胞におけるノックイン効率検出系を用いたノックイン効率増幅因子(遺伝子A~E)の効果。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

2) マウス受精卵におけるノックイン効率の検討

マウス受精卵におけるノックイン効率検出系評価のため、まずゲノム編集マウス作出系を確立した。野生型 C57BL/6 マウス体外受精卵を用い、エレクトロポレーション法により Tyr 遺伝子に対する gRNA 及び Cas9 タンパク複合体 (RNP 複合体) を、ssODN とともに導入した。3~4 日後、受精卵からゲノム DNA を抽出し、標的部位を含む領域に対し PCR を行なった。PCR 産物を HaeIII 及び MfeI で消化し、電気泳動によりバンドパターンを解析した。その結果、単純ノックアウトでは HaeIII サイトが失われ、ノックインでは HaeIII サイトを失うとともに MfeI により切断さ

れるようになり、ノックイン効率検出系が想定通り働くことが確認された。次に、ノックイン効率増幅因子のうち、遺伝子 A についてマウス受精卵におけるノックイン効率の改善効果を検討した。RNP 複合体及び ssODN を導入する際に、遺伝子 A のリコンビナントタンパクを加え、ゲノム編集を行なった。その結果、リコンビナントタンパクを加えた群においてはマウス受精卵が死滅し、ノックイン効率の検討ができなかった。そこで、濃度条件について検討したところ、 $2.5 \sim 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ の濃度まで低下させる必要があることが明らかになった。しかしながら、この濃度ではノックイン効率の上昇効果は認められなかった。

次に、培養細胞においてノックイン効率の上昇効果を示す低分子化合物 X, Y について、マウス受精卵におけるノックイン効率に与える影響を解析した。予備実験により、培養細胞において有効性を示す濃度でそれぞれ培地中に加え、受精卵を培養したところ、いずれも毒性を示さなかった。エレクトロポレーションによるゲノム編集を行なった直後から、これらの化合物を含む培地中で培養を行ったところ、X についてはノックイン効率に変化は認められなかったものの、Y では有意にノックイン効率が増加することが明らかとなった (図 4)。

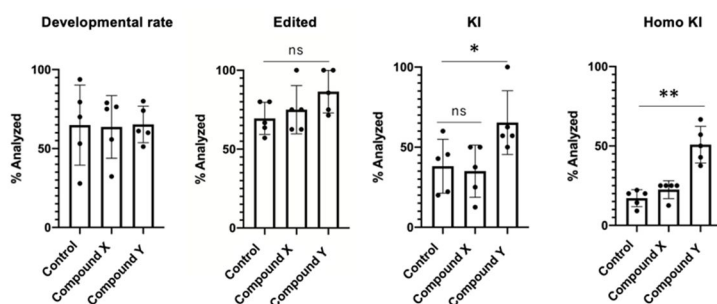


図 4 マウス受精卵ゲノム編集におけるノックイン効率の検討
 マウス受精卵における低分子化合物 X, Y の添加がノックイン効率に及ぼす効果の検討。
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,

本研究課題によって、マウス ES 細胞及びマウス受精卵において、ゲノム編集の際に簡便にノックイン効率を評価しうる系を確立した。この系を用い、強制発現によりマウス ES 細胞においてノックイン効率の向上が認められる遺伝子及び遺伝子セットを見出した。さらに、マウス受精卵においてはノックイン効率を上昇させる低分子化合物を見出すことに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shiozawa S*, Nakajima M, Okahara J, Kuortaki Y, Kisa F, Yoshimatsu S, Nakamura M, Koya I, Yoshimura M, Sasagawa Y, Nikaido I, Sasaki E, Okano H.	4. 巻 29
2. 論文標題 Primed to Naive-Like Conversion of the Common Marmoset Embryonic Stem Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cells Dev.	6. 最初と最後の頁 761-773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2019.0259.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nemoto Akisa, Kobayashi Reona, Yoshimatsu Sho, Sato Yuta, Kondo Takahiro, Yoo Andrew S., Shiozawa Seiji, Okano Hideyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Direct Neuronal Reprogramming of Common Marmoset Fibroblasts by ASCL1, microRNA-9/9*, and microRNA-124 Overexpression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 6~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10010006	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 該当する
1. 著者名 Nakajima Mayutaka, Yoshimatsu Sho, Sato Tsukika, Nakamura Mari, Okahara Junko, Sasaki Erika, Shiozawa Seiji, Okano Hideyuki	4. 巻 515
2. 論文標題 Establishment of induced pluripotent stem cells from common marmoset fibroblasts by RNA-based reprogramming	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 593 ~ 599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.05.175	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 Sharma Govinda, Huo Anni, Kimura Taeko, Shiozawa Seiji, Kobayashi Reona, Sahara Naruhiko, Ishibashi Minaka, Ishigaki Shinsuke, Saito Taro, Ando Kanae, Murayama Shigeo, Hasegawa Masato, Sobue Gen, Okano Hideyuki, Hisanaga Shin-ichi	4. 巻 294
2. 論文標題 Tau isoform expression and phosphorylation in marmoset brains	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11433 ~ 11444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.008415	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Mari, Shiozawa Seiji, Tsuboi Daisuke, Amano Mutsuki, Watanabe Hirotaka, Maeda Sumihiro, Kimura Taeko, Yoshimatsu Sho, Kisa Fumihiko, Karch Celeste M., Miyasaka Tomohiro, Takashima Akihiko, Sahara Naruhiko, Hisanaga Shin-ichi, Ikeuchi Takeshi, Kaibuchi Kozo, Okano Hideyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Pathological Progression Induced by the Frontotemporal Dementia-Associated R406W Tau Mutation in Patient-Derived iPSCs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 684 ~ 699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2019.08.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 塩澤 誠司	4. 巻 37
2. 論文標題 ヒト及び非ヒト霊長類多能性幹細胞におけるナイーブ型多能性状態の獲得	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 九州実験動物雑誌	6. 最初と最後の頁 3-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Mari Nakamura, Seiji Shiozawa, Daisuke Tsuboi, Mutsuki Amano, Hirotaka Watanabe, Sumihiro Maeda, Taeko Kimura, Sho Yoshimatsu, Fumihiko Kisa, Celeste Karch, Tomohiro Miyasaka, Akihiko Takashima, Naruhiko Sahara, Shinichi Hisanaga, Takeshi Ikeuchi, Kozo Kaibuchi, Hideyuki Okano
2. 発表標題 IN VITRO DISEASE MODELING OF THE FTDP-17 TAU R406W MUTATION USING PATIENT-DERIVED IPSCS
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 17th annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sumihiro Maeda, Hayato Hiramane, Mitsuru Ishikawa, Ikuko Koya, Ryosuke Nagashima, Seiji Shiozawa, Mari Nakamura Manabu Itoh, Hideyuki Okano
2. 発表標題 Developing a 3D hiPSC-derived culture model system for inducing endogenous tau aggregation
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 19th annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平峯勇人、前田純宏、石川充、古家育子、永島峻甫、塩澤誠司、中村真理、伊藤学、岡野栄之
2. 発表標題 hiPSC3D培養モデルを用いた内在性タウタンパク質凝集誘導系の開発
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hayato Hiramine, Sumihiro Maeda, Mitsuru Ishikawa, Ikuko Koya, Ryosuke Nagashima, Seiji Shiozawa, Mari Nakamura, Manabu Itoh, Hideyuki Okano
2. 発表標題 hiPSC3D培養モデルを用いた内在性タウタンパク質凝集誘導系の開発
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------