

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06631

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9システムを用いた新規組換え修復亢進因子の探索

研究課題名(英文) Screening for factors that enhance HDR by CRISPR-Cas9

研究代表者

加藤 朋子 (KATO-INUI, Tomoko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・研究員

研究者番号：10638802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR-Cas9は医療に応用可能な技術として着目されている。しかし、DNA二重鎖切断後に生じる修復のうち、鋳型DNAとの相同組換えによる修復(HDR)が正確な編集に寄与するが、同時に塩基の欠失・挿入を伴うNHEJが高頻度で生じてしまう。本研究では、HDRとNHEJを生じた細胞を同時に検出可能なレポーターシステムを用いて、HDR亢進因子のスクリーニングを行った結果、NHEJを生じた細胞に比べてHDRを生じた細胞で極めて高い発現を示す遺伝子を複数同定した。さらにそれらの遺伝子オントロジー解析を行ったところ、DNA修復や細胞周期に関連する遺伝子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は正確なゲノム編集技術の確立を目指すと同時に、CRISPR-Cas9の分子機構の解明を更に加速させる可能性を秘めている。特に、HDR効率の高い哺乳類細胞からcDNAライブラリを用いたゲノムワイドな研究と、HDRとNHEJの同時検出を可能にするレポーター遺伝子を用いたスクリーニングの組み合わせによる研究は画期的な研究手法である。既存の概念を打破した研究への展開には、CRISPRスクリーニングは必須のツールであり、本研究により正確なゲノム編集が達成できれば、国内外問わず、ゲノム編集の実用化に向けての礎となる重要な成果となる。

研究成果の概要(英文)：CRISPR-Cas9 is a versatile technology that can be applied to medical treatment. Between the repair pathway that occur after DNA double-stranded breaks, repair by homologous recombination with template DNA (HDR) contributes to precise editing, but at the same time NHEJ, which involves in base deletions or insertions, also occurs at a high frequency. I performed the cell-based screening for HDR-enhancing factors using the Traffic Light Reporter system, which can simultaneously detect cells with HDR and NHEJ, and identified several genes that are highly expressed in HDR-derived cells compared to NHEJ-derived cells. Further gene ontology analysis of these genes suggested that they are related to DNA repair and the cell cycle.

研究分野：ゲノム編集

キーワード：相同組換え修復 HDR CRISPR-Cas9 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

世界で蔓延している遺伝性疾患の多くが点変異を起因とするものであり、従来の遺伝子治療法では困難なものも多く存在する。しかし、ゲノム編集技術の加速的な進展により、塩基単位の正確なゲノム編集技術が実現可能となり、変異を生体内で直接修復する治療への期待も大きい。ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療は、十分な安全性が担保されるならば、効果的な遺伝子治療法として確立されることが期待される。しかし、現状では正確なゲノム修復への誘導効率の低さが大きな障壁となっている。ゲノム編集は、ゲノム中の標的領域に DNA 二重鎖切断が誘導された後、共導入したドナーDNA を用いた相同組換えによる修復(HDR)、あるいは塩基の欠失や挿入を伴う切断された末端同士の間接結合(NHEJ)のいずれかを介して行われる。このうち、正確なゲノム編集を可能にするのは HDR であるが、一般的に HDR に比べて NHEJ が高頻度に誘導されてしまうことが医療応用の実現を困難にしている。研究代表者はこれまで、CRISPR-Cas9 による HDR 活性を優位にするゲノム編集条件の検討を重ねてきた。そして、guide RNA(gRNA) や Cas9 を改変するアプローチから、Cas9-gRNA 複合体と、標的ゲノム DNA 間の相互作用を変化させることにより、より正確にゲノムが編集できることを見出した[1]。本研究ではさらに正確なゲノム編集条件を追求するため、このような Cas9 や gRNA の改変と並行して利用可能な、HDR 亢進因子の探索を行うこととした。これまでに HDR 亢進因子である Rad51[2]や CtIP[3]の過剰発現により HDR が亢進すること、あるいは NHEJ 阻害因子である i53 の過剰発現によって、HDR が亢進したという報告[4]がある。更に、DNA 修復に関与するファンコーニ貧血の原因遺伝子ファミリーが、一本鎖ドナーDNA による HDR を亢進することも明らかになっている[5]。しかし、これらの結果を統合してもなお、CRISPR-Cas9 の分子機構の解明は部分的に過ぎず、HDR 亢進による正確なゲノム編集を誘導する系の確立には至っていない。そこで、ゲノムワイドなスクリーニングの中から新たな HDR 亢進因子を探索する必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では HDR と NHEJ を蛍光標識で効率よく検出できる Traffic Light Reporter[6]を導入したレポーター細胞 (図 1 A) と、Cas9 の発現を厳密に制御する Tet 発現誘導型 Cas9 (図 1 B) を用いて、HDR 亢進因子のスクリーニングを試みた。Traffic Light Reporter は欠失変異を持つ EGFP 遺伝子と、フレームシフト変異を持つ mCherry 遺伝子が 2A ペプチドで連結されたレポーター遺伝子であり、EGFP 配列の修復を可能にする鋳型 DNA との相同組換えが生じると EGFP 陽性、塩基の欠失や挿入により、mCherry 遺伝子のフレームが合致すると mCherry 陽性細胞として検出できる。多コピーのレポーターが染色体に取り込まれた細胞を樹立することで、EGFP の蛍光強度が細胞内での HDR 誘導頻度がそのまま反映されることを利用する。また、Tet 発現誘導型 Cas9 は、doxycyclin 存在下で発現が誘導されるため、非存在下で Cas9 を導入した細胞を樹立する。本研究では、HDR 活性が高い HEK293T 細胞に発現している遺伝子を候補対象とすることで、効率的なスクリーニングを期待した。

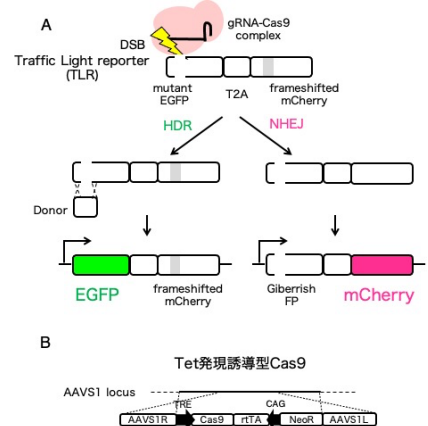


図 1 A. Traffic Light Reporter システム
B. Tet 発現誘導型 Cas9 の AAVS1 サイトへのノックイン

3. 研究の方法

(1) Traffic Light Reporter 導入 K562 細胞(K562-TLR)の作製と樹立

Traffic Light Reporter(TLR)をヒト白血球細胞 K562 細胞へ Nucleofection により導入した。レポータープラスミドは、染色体中にランダムに挿入されるため、Puromycin による薬剤選択で目的の細胞を取得し、クローン化した。Puromycin 耐性遺伝子、及び内在性の RPP30 遺伝子を標的にした primer/probe セットをそれぞれ用い、デジタル PCR によりコピー数を測定した。

(2) gRNA、Cas9 共発現レポーターK562 細胞の作製と樹立

まず、TLR の EGFP 遺伝子の欠失変異を修正する目的で設計した gRNA を導入した。blasticidin で薬剤選択を行った後、1細胞クローニングを行い、HA-tag を指標にしたウェスタンブロットリングおよび免疫染色により、発現を確認した。次に、Tet 発現誘導 Cas9 を CRISPR-Cas9 により、ヒト安全領域である AAVS1 へノックインした。neomycin で薬剤選択を行った後、1細胞クローニングを行い、FLAG-tag を指標にしたウェスタンブロットリングおよび免疫染色により、発現を確認した。作製したクローンに対し、EGFP 配列の修復を可能にする鋳型 DNA の導入と同時に、doxycyclin を添加して編集を誘導した。そのうち、最も doxycyclin 反応性の高い細胞をスクリーニングに用いる細胞として樹立した。

(3) レンチウイルス cDNA ライブラリの作製

HEK293T 細胞より total RNA を抽出し、常法に倣って cDNA ライブラリを作製した。作製した cDNA ライブラリを HEK293T 細胞に導入し、レンチウイルスを作製した。作製したウイルスの力価はレンチウイルスベクター特異的配列、及び内在性の RPP30 遺伝子を標的にした primer/probe セットを用い、デジタル PCR により測定した。

(4) K562-TLRiWTCas9-gRNA 細胞によるスクリーニング

K562-TLRiWTCas9-gRNA 細胞に、EGFP 配列の修復を可能にする鋳型 DNA を導入した。翌日、レンチウイルス cDNA ライブラリと共に doxycyclin を培地に添加して CRISPR-Cas9 を誘導した。7日後に EGFP と mCherry を指標にそれぞれの蛍光を発する細胞を FACS により分取した。分取した細胞から total RNA を抽出し、ライブラリの作製とシークエンスは専門受託会社(GENEWIZ/AZENTA)に依頼した。

(5) RNA シークエンス解析と遺伝子オントロジー解析

RNA シークエンス解析は、CLC Genomics workbench を用いて行った。EGFP sort サンプルと mCherry sort サンプルのそれぞれで得られたリードから、遺伝子発現量(TPM)の算出を行い、さらに各サンプルの発現量から発現量比(Fold change)を算出した。次に、TPM を指標にしたオントロジーと、Fold Change を指標にしたオントロジー解析をそれぞれ行った。

4. 研究成果

(1) Traffic Light Reporter 導入 K562 細胞(K562-TLR)の作製と樹立

K562 細胞に Nucleofection により Traffic Light Reporter(TLR)を導入し、Puromycin による薬剤選択を行った。ddPCR での測定の結果、25 コピーの TLR が K562 細胞に挿入されていることを確認した (図 2 A)。

(2) gRNA、Cas9 共発現レポーターK562 細胞の作製と樹立

gRNA と Cas9 を順次導入し、1細胞クローニングを行った。gRNA については、抗 HA 抗体を用いて免疫組織染色を行い、HA 陽性細胞を確認した (図 2 B)。Cas9 については、抗 FLAG 抗体を用いて同様の検討を行い、FLAG 陽性細胞を確認した。次に、得られたクローンに対し、

EGFP 遺伝子の欠失配列を修復する鋳型 DNA と doxycyclin を添加し、CRISPR-Cas9 を誘導した。その結果、doxycyclin 反応性の高い細胞(17)を選出した(図 2 C)。続くサブクローニングによって、さらに 10 クローンについて検討を行った結果、最も doxycyclin 反応性が高かった細胞(4) をスクリーニングに用いる細胞として樹立した(図 2 D)。

(3) レンチウイルス cDNA ライブラリの作製

HEK293T 細胞から total RNA を抽出し、常法にしたがって cDNA を合成したところ、約 10^5 個の遺伝子が挿入されたレンチウイルス cDNA ライブラリを作製できた。このプラスミドを HEK293T 細胞へ導入し、レンチウイルスを作製した。ウイルスのコピー数を ddPCR にて測定したところ、1 細胞あたり 13.7 コピーのウイルスが挿入されていることが示された(図 3 A)。

(4) K562-TLRiWTCas9-gRNA 細胞によるスクリーニング

EGFP 遺伝子の欠失配列を修復する鋳型 DNA を K562-TLRiWTCas9-gRNA 細胞に導入し、cDNA ライブラリと doxycyclin の添加により、編集を誘導し、EGFP 陽性細胞および mCherry 陽性細胞を FACS により分取した。同様の実験を 3 回繰り返した結果、それぞれの陽性細胞の割合は EGFP 陽性 0.5~0.9%、mCherry 陽性細胞は 1.4%~2.4%であった(図 3 B)。

(5) RNA シークエンス解析と遺伝子オントロジー解析

EGFP 陽性細胞と mCherry 陽性細胞の各 3 サンプルずつについて、RNA シークエンス解析を行った。それぞれのサンプルのリード配列を用いて、TPM(遺伝子発現量)と、Fold Change(遺伝子発現量比)を算出した。次に、Volcano plot を作製した結果、mCherry sort サンプルに比べて EGFP sort サンプルで極めて高い発現量比を示す遺伝子が複数同定された(図 4 A)。また、Heat Map 解析を行った結果、EGFP サンプルはいずれも同様な発現パターンを示したのに対し、mCherry サンプルは 1 サンプルで異なる発現パターンが観察された(図 4 B)。さらに、各サンプルで発現している遺伝子のオントロジー解析を 2 つの手法を用いて行った。まず、TPM を指標にした Gene Set Enrichment Analysis を行った。その結果、RNA 結合に関わるもの、ヘリカーゼ活性に関わるものやヒストン修飾に関わるものなどがエンリッチされていることが示された。次に、Correlation Engine (Illumina)を用いて、mCherry sort サンプルに対する EGFP

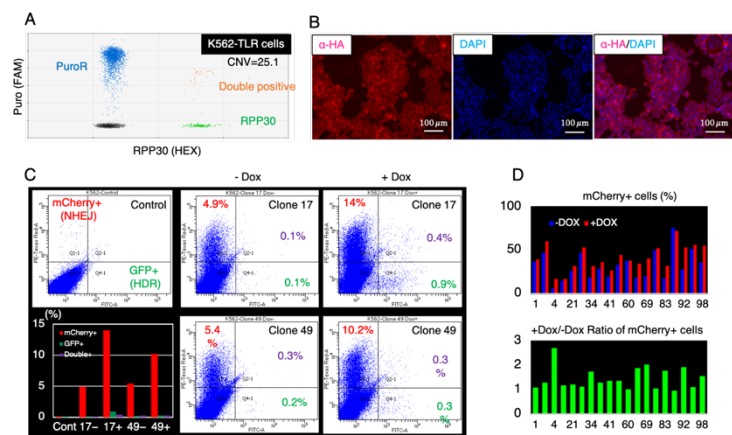


図 2 K562-TLRiWTCas9-gRNA 細胞の樹立 A)デジタル PCR による K562-TLR のコピー数測定 B)K562-TLR-EGFPgRNA 細胞の抗 HA 抗体による免疫染色。Scale bar=100 mm C)K562-TLREGFPgRNA 細胞に Tet 発現誘導型 Cas9 を導入した細胞での doxycyclin に応答した HDR と NHEJ の活性測定 D)K562-TLRiWTCas9-gRNA(clone17)のサブクローニングによる doxycyclin 存在下・非存在下による各々の mCherry 陽性細胞数と割合の比較

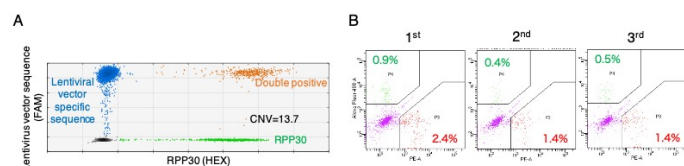


図 3 K562-TLRiWTCas9-gRNA 細胞を用いたスクリーニング A)デジタル PCR によるレンチウイルス cDNA ライブラリのコピー数測定 B) 3 回のスクリーニングにおける FACS 解析

sort サンプルの fold Change が 1.5 以上の遺伝子を対象に、エンリッチメント解析を行った。その結果、乳がんに関わるもの、DNA 損傷に関わるものなどがエンリッチされていることが示された。また、DNA 損傷や細胞周期など、相同組換え修復に深く関わるオントロジーで高い発現を示す遺伝子も複数同定された (図 4 C)。今後は、発現の高い遺伝子や相同組み換え修復に深く関わるオントロジーで高い発現を示す遺伝子に着目し、その機能解析を進める。

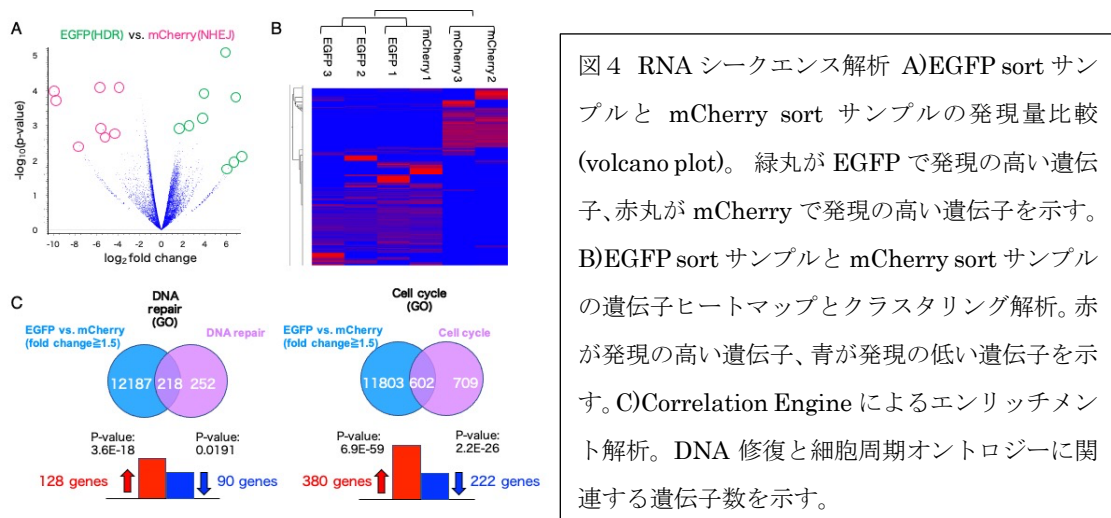


図 4 RNA シーケンス解析 A)EGFP sort サンプルと mCherry sort サンプルの発現量比較 (volcano plot)。緑丸が EGFP で発現の高い遺伝子、赤丸が mCherry で発現の高い遺伝子を示す。B)EGFP sort サンプルと mCherry sort サンプルの遺伝子ヒートマップとクラスタリング解析。赤が発現の高い遺伝子、青が発現の低い遺伝子を示す。C)Correlation Engine によるエンリッチメント解析。DNA 修復と細胞周期オントロジーに関連する遺伝子数を示す。

<引用文献>

1. [Kato-Inui T, Takahashi G, Hsu S, Miyaoka Y. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats \(CRISPR\)/CRISPR-associated protein 9 with improved proof-reading enhances homology-directed repair. Nucleic Acids Research. 46\(9\):4677-4688 \(2018\)](#)
2. [Takayama K, Igai K, Hhagihara Y, Hashimoto R, Hanawa M, Sakuma T, Tachibana M, Sakurai F, Yamamoto T and Mizuguchi H. Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN system. Nucleic Acids Research. 45\(9\):5198-5207 \(2017\)](#)
3. [Charpentier M, Khedher A.H, Menoret S, Brion A, Lamribet K, Dardillac E, Boix C, Perrouault L, Tesson L, Geny S, Cian A.D, Itier J.M, Anegon I, Lopez B, Giovannangeli C and Concordet J.P.CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. Nat Commun. 9\(1\):1133 \(2018\)](#)
4. [Canny M.D, Moatti N, Wan L.C.K, Fradet-Turcotte A, Kransner D, Mateos-Gomez P.A, Zimmermann M, Orthwein A, Juang Y-C, Zhang W, Noordermeer S. M, Seclen E, Wilson M.D, Vorobyov A, Munro M, Ernst A, Ng T. F, Cho T, Cannon P. M, Sidhu S.S, Sicheri F, Durocher D Inhibition of 53BP1 favors homology-dependent DNA repair and increases CRISPR-Cas9 genome-editing efficiency. Nat Biotechnol. 36\(1\):95-102 \(2018\)](#)
5. [Richardson C.D, Kazane K.R, Feng S.J, Zelin E, Bray N.L, Sháfer A.J, Floor S.N, Corn J.E CRISPR-Cas9 genome editing in human cells occurs via the Fanconi anemia pathway. Nat Genetics 50:1132-1139 \(2018\)](#)
6. [Certo M.T, Ryu B.Y, Annis J.E, Garibov M, Jarjour J, Rawlins D, Scharenberg A.M Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints. Nat Methods 8\(8\):671-676 \(2011\)](#)
7. [Sybramanian A, Tamayo P, Mootha V.K, Mukherjee S, Ebert B.L, Gillette M.A, Paulovich A, Pomeroy S. L, Golub T.R, Lander E.C, Mesirov J.P Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc Natl Acad Sci U S A. 102\(43\):15545-15550 \(2005\)](#)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Yamashita S, Kataoka K, Yamamoto H, Kato T, Hara S, Yamaguchi K, Renard-Guillet C, Katou Y, Shirahige K, Ochi H, Ogino H, Uchida T, Inui M, Takada S, Shigenobu S, and Asahara H	4. 巻 9
2. 論文標題 Comparative analysis demonstrates cell type-specific conservation of SOX9 targets between mouse and chicken.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-48979-4	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 Fujitani K, Otomo A, Nagayama Y, Tachibana T, Kato R, Kawashima Y, Kodera Y, Kato T, Takada S, Tamura K, Takamatatsu N and Ito M.	4. 巻 43
2. 論文標題 PACT/PRKRA and p53 regulate transcriptional activity of DMRT1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genetics and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 e20190017
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1590/1678-4685-GMB-2019-0017	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 Ikeda Y, Kato-Inui T, Tagami A, Maekawa M	4. 巻 1712
2. 論文標題 Expression of progesterone receptor, estrogen receptors and , and kisspeptin in the hypothalamus during perinatal development of gonad-lacking steroidogenic factor-1 knockout mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 167-179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2019.02.016	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤 朋子、高橋 剛、宮岡 佑一郎
2. 発表標題 CRISPR-Cas9システムを基盤とした相同組換えによる修復(HDR)亢進因子の新規探索
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者:96名(乾 雅史、乾一加藤朋子(分担執筆))、技術情報協会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 602
3. 書名 ゲノム編集技術を応用した製品開発とその実用化	

〔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
---------	---------