

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07696

研究課題名（和文）ゲノム編集タンパク質分泌合成システムとワンステップでの遺伝子改変動物作製法の構築

研究課題名（英文）Development of easy-to-use genome editing protein synthesis system and one-step genetically modified animal production method

研究代表者

大西 伸幸（Onishi, Nobuyuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・訪問研究員

研究者番号：40534540

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）：本研究では、大腸菌タンパク質発現系を用いて、高精度型Cas9であるHypaCas9タンパク質をgRNAと同時に発現させ、リボヌクレオプロテインとして精製するシステムを構築した。大腸菌株の選定やタンパク質発現誘導条件・大腸菌破壊法を最適化することで、シングルバンドでHypaCas9タンパク質を精製することができた。具体的には、Cas9タンパク質合成で一般的に用いられているRosetta2(DE3)ではなくBL21(DE3)を採用し、低温ではなく30℃での発現誘導を行い、超音波ではなく凍結融解法ならびにリゾチームを用いてマイルドな条件で大腸菌破壊することで夾雑タンパク質を減少させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPR/Cas9ヌクレアーゼの精製タンパク質が一般に入手できるようになったことで、目的遺伝子ノックアウト細胞の作製が身近になり研究室レベルで頻りに挑戦されるようになったが、細胞一つ一つで切断された遺伝子配列の修復様式が異なるため、クローン化する必要がある場合は細胞株樹立までに長い期間を要する。ましてや研究室単位で遺伝子改変マウスの作製を行うにはまだまだハードルが高いのが現状である。本研究を進めていくことで、迅速かつ簡便に遺伝子改変マウスを作製することが可能となり、多様な疾患ならびに治療モデルの構築に挑戦していくことで、有効な治療法が無い疾患に対して新たな治療法開発に貢献することができる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a method to express HypaCas9 protein, which is a high-precision Cas9, and gRNA at a time using an E. coli protein expression system and purify them as ribonucleoprotein (RNP). By optimizing the selection of E. coli strains, protein expression induction conditions, and E. coli disruption method, HypaCas9 protein could be purified in a single band. Specifically, BL21 (DE3) is used instead of Rosetta2 (DE3), which is commonly used in Cas9 protein synthesis, and expression is induced at 30 °C instead of low temperature. Contaminant proteins could be reduced by disrupting E. coli under mild conditions using freeze-thaw and lysozyme instead of sonication.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：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

CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集の技術革新は他に類を見ない。同時多発的にゲノム上の目的配列を切断することによる複数遺伝子の同時ノックアウトや、ゲノム DNA 一本鎖切断を2箇所に施すことによるオフターゲット切断の低減ならびに高効率な目的配列ノックインなども可能となった(*Cell*, 153:910-8, 2013, *Cell*, 154:1380-9, 2013)。CRISPR/Cas9 ヌクレアーゼの発現ベクターや精製タンパク質が一般に入手できるようになったことで、目的遺伝子ノックアウト細胞の作製が身近になり研究室レベルで頻りに挑戦されるようになったが、レンチウイルスを用いて全細胞で CRISPR/Cas9 ヌクレアーゼを発現させてもノックアウト細胞株を樹立できなったり、細胞一つ一つで切断された遺伝子配列の修復様式が異なるため、クローン化する必要がある場合は細胞株樹立までに長い期間を要したり、ましてや研究室単位で遺伝子改変マウスの作製を行うにはまだまだハードルが高いのが現状である。

近年、「GONAD 法」という採卵・顕微注入・移植のステップを省略できる新しいゲノム編集マウス作製法が東海大学の塚正人准教授によって考案され、より大型動物であるラットでのゲノム編集も既に行われている(*Sci Rep.* 5:11406, 2015, *Genome Biol.* 19:25, 2018, *Sci Rep.* 8:12059, 2018) (図1)。具体的に、GONAD 法を用いてノックアウトマウスを作製する方法は、

麻酔処置をした妊娠雌マウスより2細胞期の受精卵を有する卵管膨大部を体外に露わにし、ガラスキャピラリーを用いて CRISPR/Cas9 ヌクレアーゼタンパク質ならびに CRISPR/Cas9 を切断標的配列に配向させるガイド RNA (sgRNA, crRNA+tracrRNA) を卵管膨大部内に注入後、直ちに卵管全体に対してエレクトロポレーションを行う。施術後、卵管を雌マウスの体内に戻し、通常飼育で自然分娩させる。というもので、標的領域と相同配列を持つ一本鎖 DNA をドナー DNA として同時に導入することで、ノックインマウスの作製も可能である(*Genome Biol.* 19:25, 2018)。

GONAD 法で準備するマウス個体は交配用の雌雄マウスのみで、胚移植用の偽妊娠マウスやそれらを出産する精管結紮マウスは必要としない。また、従来法で求められる熟練した技術や専門的な設備を必要としないことから、小規模研究室や個人レベルでの遺伝子改変マウス作製が可能であり、個体レベルでの研究の加速化が期待できる。

これまでに申請者は、*in vivo* エレクトロポレーション法を用いて piggyBac 目的遺伝子発現ベクターと Transposase 発現ベクターをマウス脳内に同時導入することで、ゲノム上のトランスポゾン配列に目的遺伝子を挿入し、簡便かつ短期間にマウス脳腫瘍の作製に成功している(図2)。そこで申請者は、CRISPR/Cas9 の代わりに piggyBac Transposase を用いて GONAD 法で受精卵のゲノムに目的配列を挿入し、個人レベルで「迅速かつ簡便に多様な

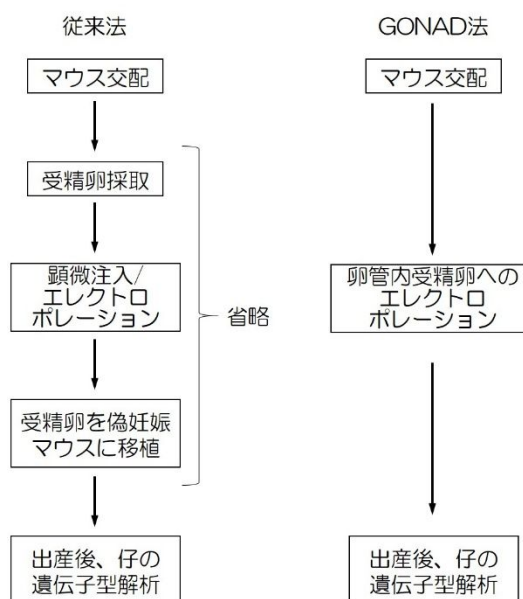


図1. GONAD 法を用いたゲノム編集マウス作製行程

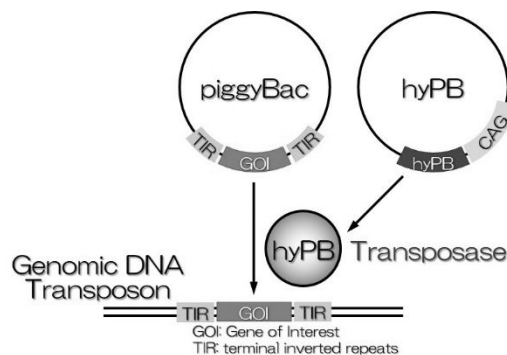


図2. PiggyBac システムを用いたゲノム DNA への遺伝子導入

トランスジェニックマウスを作製できるのではないか？」「GONAD 法で作製した遺伝子改変マウスの組織に *in vivo* 遺伝子発現を行うことで、これまでに作製が困難であった発がんモデルや病態モデルのマウス構築が可能になるのではないか？」という課題に挑戦したいと考えた。

2. 研究の目的

効果的な治療法が確立されていない悪性脳腫瘍の分子基盤解明を目的に、申請者は piggyBac システム(非ウィルスの目的配列をゲノムに挿入)と *in vivo* 電気穿孔法(エレクトロポレーション法)を組み合わせることでマウス脳に直接がん遺伝子を導入し、正常脳から脳腫瘍を作製する *in vivo* 発がんモデルの構築ならびに解析を行ってきた。また、同法を用いてマウスの膵臓や卵管などへの直接遺伝子導入にも成功している。本研究では、これまでに申請者が構築してきた piggyBac/*in vivo* エレクトロポレーション法による *in vivo* 遺伝子発現システムを発展させ、採卵・顕微注入・移植の作業を必要としない新規ゲノム編集マウス作製法「Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery(GONAD)法」と申請者が独自に進めているタンパク質分泌合成システムを組み合わせることで、安定発現細胞株を樹立する感覚で迅速かつ簡便に遺伝子改変マウスを作製し、多様な発がんモデルの構築を目指す。

3. 研究の方法

これまでの予備実験において、piggyBac/エレクトロポレーション法を用いて簡便かつ短期間に安定分泌発現細胞株の樹立に成功している。本研究では、申請者が独自に構築した簡便なタンパク質分泌合成システムを用いて Transposase hyPB ならびに CRISPR/Cas9 複合体を大量精製する。自作のゲノム編集ツールを GONAD 法に導入し、迅速かつ簡便に多様なトランスジェニックマウスの作製やこれまでに作製が困難であった発がんモデル・病態モデルのマウス作製に挑戦したいと考えている。Transposase hyPB や CRISPR/Cas9 は核移行シグナル(NLS)を有していることから、合成したタンパク質が培養上清中に分泌されるかが懸念される。そこで申請者は GFP に NLS を付加し細胞外に分泌されるかについて予備検討を行った。分泌 GST-GFP-NLS 安定発現細胞株の培養上清を回収後、GST 融合タンパク質精製システムにて精製を行ったところ、NLS を有した GFP を十分量回収することができた(図 3)。蛍光確認もできたが分泌時翻訳後修飾のためか予想よりタンパク質サイズが大きかった。hyPB や CRISPR/Cas9 の精製時には厳密なサイズ・活性確認も行いたいと考えている。

また、これまでに申請者は、独自に構築した piggyBac/*in vivo* エレクトロポレーション法でマウス脳に直接がん遺伝子を導入し、正常脳から脳腫瘍を発生させることに成功しており、piggyBac/*in vivo* エレクトロポレーション法を用いた発がんモデルは他臓器にも応用ができる。これまでに同法でマウスの膵臓や卵管を含めたいくつかの臓器で直接遺伝子発現を確認しており、膵がんや卵巣がんをはじめとする様々な発がんモデルに挑戦したいと考えている。卵管へのインジェクションを条件検討していた際に、採卵・顕微注入・移植のステップを省略できる新規ゲノム編集マウス作製法「GONAD 法」を開発した東海大学医学部基礎医学系分子生命科学の大塚正人准教授と出会い、GONAD 法実験手技のご指導を賜ることになった。

4. 研究成果

申請者が独自に構築した簡便なタンパク質分泌合成システムでは、GFP などの 50kDa 以下のタンパク質は容易に分泌精製することができたが、CRISPR/Cas9 のような 150kDa 以上ものタンパク質では同様にはいかなかった。そこで、申請者は従来の大腸菌タンパク質発現系を用いて、高精度型 Cas9 である HypaCas9 タンパク質を gRNA と同時に大腸菌で発現させ、リボヌクレオプロテイン(Ribonucleoprotein(RNP))として精製するシステムを構築することにした。Cas9 タンパク質合成の際に一般的に用いられている大腸菌株 Rosetta(DE3)を用いてタンパク質発現を行った場合、様々な可溶性タンパク質(タグ)を融合させてみたが、精製タンパク質は得られなかった。ごく近年、Cas9 タンパク質合成について、大腸菌株 BL21(DE3)と Rosetta(DE3)で比較した論文が報告され、この論文によると Rosetta(DE3)では mRNA レベルがはるかに低いため、微量の Cas9

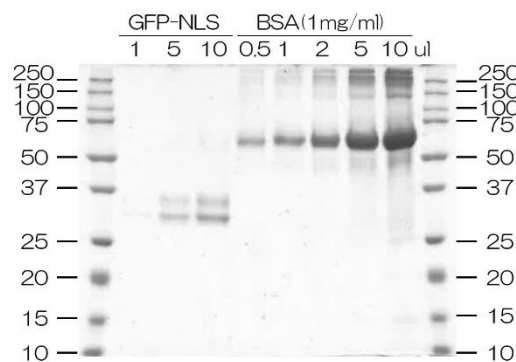


図 3. SDS-PAGE ならびに CBB 染色を用いた GFP-NLS の分泌ならびに精製確認

タンパク質しか検出できなかったのに対し、BL21(DE3)ではタンパク質発現の改善が見られた(*J Biotechnol.* 306: 62-70. 2019)。また、高分子量タンパク質を合成する際は低温(18℃ など)で発現誘導するのが一般的とされているのに対し、この論文では30℃での発現誘導にて最大発現量が得られた。そこで申請者も同様にBL21(DE3)を用いて30℃にてHypaCas9タンパク質を発現誘導し、十分なタンパク質発現量を得ることができた。また、大腸菌破碎方法は凍結融解法ならびにリゾチームを用いてマイルドな条件でタンパク質抽出を行うことで、夾雑タンパク質の減少によりシングルバンドでタンパク質を精製することができた(図4)。今後、自作HypaCas9 RNPを培養細胞に導入し、様々な遺伝子のノックアウト/イン効率の確認を行っていく予定である。

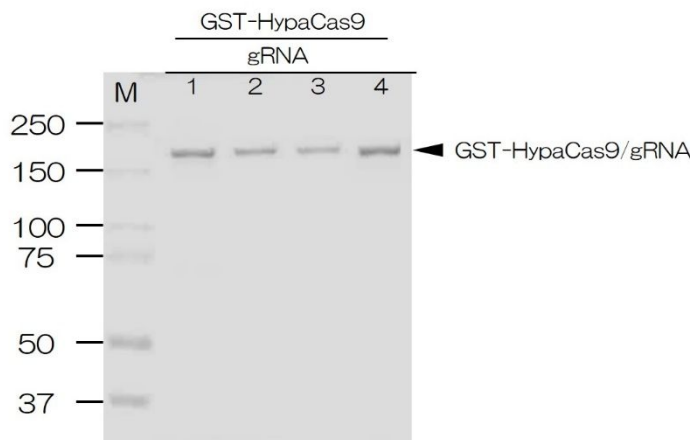


図4. SDS-PAGEならびにCBB染色を用いたHypaCas9タンパク質の精製確認

東海大学の塚先生にGONAD法実験手技のご指導を賜り、十分に麻酔が効いた妊娠雌マウスの背中に切れ目を入れて卵管部を体外に取り出し、受精卵を有する卵管膨大部にガラスキャピラリーを用いてRhodamine蛍光色素をインジェクションした。直ちに卵管全体を専用の電極で挟みエレクトロポレーション法を行い、卵管部を雌マウス体内に戻して背中を閉じた。翌日に雌マウス卵管より受精卵を回収して蛍光顕微鏡下で観察を行ったところ、2細胞期受精卵内でRhodamineの蛍光を確認することができた(図5)。自身でも反復練習を行い、GONAD法の手技を習得することができた。CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集技術による遺伝子改変マウスの作製は個体レベルでの解析を加速化させているが、希望のマウスを作製できないこともしばしばある。また、GONAD法は研究室単位での遺伝子改変マウス作製を可能にする方法ではあるが、がん研究で頻繁に使用されるC57BL/6マウスでは現時点で産出成績が悪いことから、塚先生のチームでは排卵誘発の条件検討を行うことで算出成績を上げることに成功している。

従来法によるpiggyBacシステムを用いた遺伝子改変マウスの作製は以前より注目されており、piggyBac Transposaseは9kb以上という長い配列でも効率を下げることなくゲノムに挿入可能であることから、遺伝子治療モデルにも有用であることが報告されている(*Cell.*

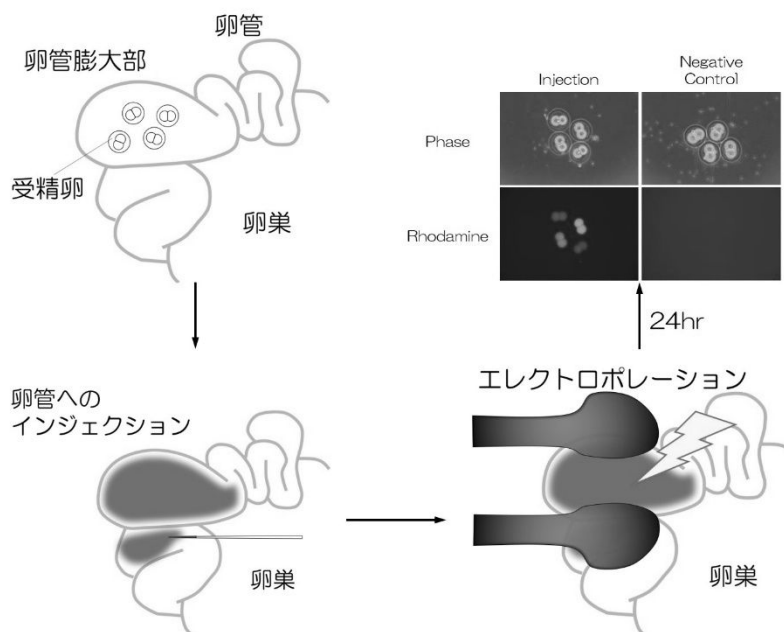


図5. GONAD法を用いたマウス受精卵へのRhodamine蛍光色素インジェクション

122:473-83. 2005, *Nucleic Acids Res.* 44:744-60. 2016)。これらがGONAD法を用いて再現できれば、安定発現細胞株を樹立する感覚で個体レベルでの解析を行うことが可能となる。

ゲノム編集タンパク質の簡便な合成精製法が樹立でき、GONAD法の手技を習得することができたが、コロナ禍の影響が大きく、マウス実験の断念を余儀無くされた。道具も技術も準備ができ

ているのに、研究期間内に自前で遺伝子改変マウスの作製に挑戦できなかったのはとても残念である。引き続き、構築した実験系を最適化していくことで当初の目的であった、安定発現細胞株を樹立する感覚で迅速かつ簡便に遺伝子改変マウスを作製し、多様な発がんモデルやそれらを用いた治療モデルの構築を目指していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------