

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21370

研究課題名（和文）内在性相同組換え機構を利用した革新的ノックイン技術の開発

研究課題名（英文）Development of innovative knock-in technology using endogenous homologous recombination mechanism

研究代表者

築山 智之（TSUKIYAMA, Tomoyuki）

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・特任准教授

研究者番号：60612132

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：CRISPR/Cas9を始めとするゲノム編集技術により、これまでに様々な遺伝子改変動物が作られるようになってはいるものの、相同組換えによる大きなフラグメントのノックインは依然として効率が悪いことが知られている。本研究では、内在性の相同組換え機構に注目し、それをノックインに応用することで高効率な遺伝子改変技術を確立することを目的とした。

本研究では、ノックイン効率を効率よく評価するための評価系を構築したのに加え、内在性の相同組換え機構において働くことが知られている複数の遺伝子、および内在性の相同組換えに近い状態に誘導するために相乗的に働く因子のクローニングを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者が所属する滋賀医科大学では、カニクイザルにおけるゲノム編集研究を積極的に推進しているが、サルを用いる場合、マウスのように単純に試行数を増やすことで効率の問題を回避することが倫理的に難しく、現状の効率ではノックイン実験は難しい状況である。

もし効率よくノックインを誘導することが可能になれば、カニクイザルを含めた大動物のみならず、全てを置き換えるポテンシャルを秘めた意欲的な研究である。

研究成果の概要（英文）：Although CRISPR/Cas9 and other genome editing technologies have enabled the generation of a variety of genetically modified animals, knock-in of large fragments by homologous recombination is still inefficient. Here, we focused on the endogenous homologous recombination mechanism and applied it to knock-in to establish a highly efficient gene modification technique. In this study, we first constructed an evaluation system to efficiently assess knock-in efficiency. Additionally, we cloned several genes known to work in the endogenous homologous recombination mechanism and factors that work synergistically to induce a state close to endogenous homologous recombination.

研究分野：発生工学

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を始めとするゲノム編集技術により、これまでに様々な遺伝子改変動物が作られるようになってはいるものの、相同組換えによる大きなフラグメントのノックインは依然として効率が悪いことが知られている。これは Cas9 による DNA の二本鎖切断 (Double Strand Break、DSB) の後、相同性配向型修復 (Homology Directed Repair、HDR) が誘導される前に非相同性末端結合 (Non Homologous End Joining、NHEJ) による修復機構が働き、塩基配列の挿入・欠失 (Insertion & Deletion、Indel) が誘導されることで target 配列が改変され、もはや Cas9 の target にならなくなることが大きな要因である。つまり、相同組換えによるノックインの効率を上げるためには、NHEJ をいかに阻害するのが鍵となる。

これまでに、NHEJ 阻害のため、様々な阻害剤が応用されているが、再現性に欠けるのが現状である。特に、受精卵における応用で再現性のある報告は未だない。申請者が所属する滋賀医科大学では、カニクイザルにおけるゲノム編集研究を積極的に推進しているが、サルを用いる場合、マウスのように単純に試行数を増やすことで効率の問題を回避するということが倫理的に難しく、現状の効率ではノックイン実験は難しい状況である。

2. 研究の目的

そこで我々は、内在性の相同組換え機構に注目し、それをノックインに応用しようと考えた。本研究では、様々な阻害剤に加え、HDR 経路の関連タンパク質を発現させることで、NHEJ よりも優先的に HDR を誘導させ、ノックイン効率を向上できないか検討することを目的とした。

本研究では特に、内在性相同組換え因子の内因性のヌクレアーゼ活性と NHEJ 阻害活性をそのままゲノム編集に応用するために、切断活性を持たない変異型 Cas9 である dCas9 と内在性相同組換え因子との融合タンパク質を構築し、それをゲノム編集に応用して、効率的なノックイン誘導法を確立しようと考えた。

さらに、その他の HDR 経路の関連タンパク質の強制発現や化学的阻害剤を駆使し、内在性の相同組換えに近い状態に誘導するために、相乗的に働く因子の探索を行おうと考えた。

3. 研究の方法

本研究では、内在性の相同組換え機構に注目し、それをノックインに応用することで高効率な遺伝子改変技術を確立することを目的としたが、その実現のためには効率的なノックインの評価系の確立が不可欠である。

よって、内在性の相同組換え機構において働くことが知られている複数の遺伝子のクローニングを行い、dCas9 との融合タンパク質を発現するベクターを構築するのに加え、ノックイン効率を効率よく評価するために、恒常的発現遺伝子あるいは初期胚で高発現している遺伝子の遺伝子座にレポーターをノックインする評価系を構築を試みた。

4. 研究成果

本研究では、ノックイン効率をいかに効率よく評価するかが極めて重要となる。そこで恒常的発現遺伝子あるいは初期胚で高発現している遺伝子の遺伝子座にレポーターをノックインする評価系を構築した。

評価系はマウス ES 細胞、カニクイザル ES 細胞、マウス初期胚、カニクイザル初期胚を用い、それぞれ構築した。

マウス ES 細胞においては、セーフハーバー遺伝子として知られている *ROSA26* 遺伝子座 (図 1) に加え、未分化細胞で高発現することが知られている *Pou5f1*(Oct3/4) 遺伝子座 (図 2)、恒常的に発現する *Rplp0* 遺伝子座 (図 3) にレポーターをノックインする評価系を構築した。

マウス初期胚では、これらのうち、*Pou5f1* 遺伝子座、*Rplp0* 遺伝子座へのノックイン系を用いて評価系を構築した。

カニクイザル ES 細胞においては、セーフハーバー遺伝子として知られている *AAVS1* 遺伝子座 (図 4) に加え、マウスと同様、未分化細胞で高発現することが知られている *POU5F1(OCT3/4)* 遺伝子座、恒常的に発現する *RPLP0* 遺伝子座にレポーターをノックインする評価系を構築した。

カニクイザル初期胚でも、これらのうち、*POU5F1* 遺伝子座、*RPLP0* 遺伝子座へのノックイン系を用いて評価系を構築した。

なお、ノックインに使用したレポーターについて、図ではそれぞれの一例を掲載したが、これらの他、目的に応じたレポーターを搭載した複数のベクターを構築した。

次に、内在性の相同組換え機構において働くことが知られている複数の遺伝子のクローニングを行い、dCas9 との融合タンパク質を発現するベクターを構築した。

さらに、内在性の相同組換えに近い状態に誘導するために、相乗的に働く因子の探索を行い、それらの遺伝子のクローニングも行った。

これらの研究により、内在性の相同組換え機構を用いて効率的にノックインを行うための基盤を整えた。今後、これらの基盤を用いてさらに研究を推進する予定である。

本研究では、内在性の相同組換え機構に注目し、それをノックインに応用することで高効率な遺伝子改変技術を確認することを目的としたが、もし効率よくノックインを誘導することが可能になれば、カニクイザルを含めた大動物のみならず、全てを置き換えるポテンシャルを秘めた意欲的な研究である。

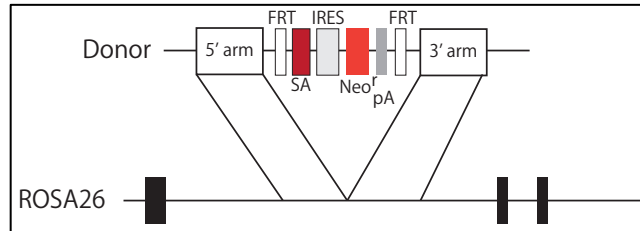


図 1. ROSA26 へのノックイン

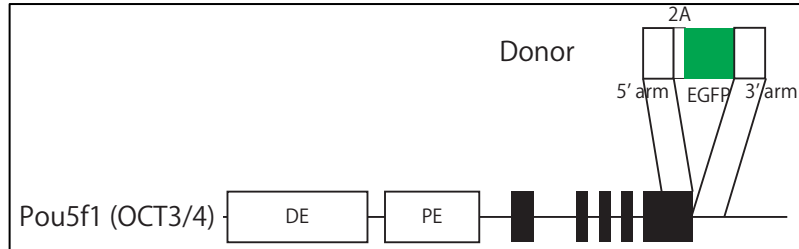


図 2. POU5F1 へのノックイン

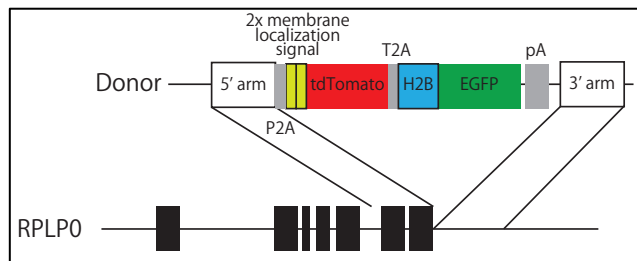


図 3. RPLP0 へのノックイン

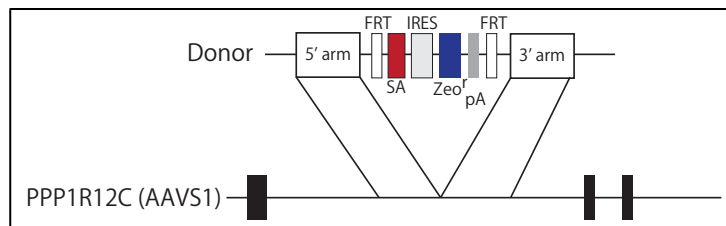


図 4. AAVS1 へのノックイン

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakamura Tomonori, Fujiwara Kohei, Saitou Mitinori, Tsukiyama Tomoyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Non-human primates as a model for human development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1093 ~ 1103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.03.021	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 Jayakumar Vasanthan, Nishimura Osamu, Kadota Mitsutaka, Hirose Naoki, Sano Hiromi, Murakawa Yasuhiro, Yamamoto Yumiko, Nakaya Masataka, Tsukiyama Tomoyuki, Seita Yasunari, Nakamura Shinichiro, Kawai Jun, Sasaki Erika, Ema Masatsugu, Kuraku Shigehiro, Kawaji Hideya, Sakakibara Yasubumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Chromosomal-scale de novo genome assemblies of Cynomolgus Macaque and Common Marmoset	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Data	6. 最初と最後の頁 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41597-021-00935-6	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 Kojima Yoji, Yamashiro Chika, Murase Yusuke, Yabuta Yukihiro, Okamoto Ikuhiro, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Nakaya Masataka, Tsukiyama Tomoyuki, Nakamura Tomonori, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 4
2. 論文標題 GATA transcription factors, SOX17 and TFAP2C, drive the human germ-cell specification program	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202000974	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 Seita Yasunari, Morimura Toshifumi, Watanabe Naoki, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Nakamura Shinichiro, Suzuki Toshiharu, Yanagisawa Daijiro, Tsukiyama Tomoyuki, Nakaya Masataka, Okamura Eiichi, Muto Masanaga, Ema Masatsugu, Nishimura Masaki, Tooyama Ikuo	4. 巻 75
2. 論文標題 Generation of Transgenic Cynomolgus Monkeys Overexpressing the Gene for Amyloid- Precursor Protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 45 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-191081	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2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tsukiyama T.
2. 発表標題 Disease modeling in cynomolgus monkeys using CRISPR/Cas9.
3. 学会等名 日本発生生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsukiyama T.
2. 発表標題 Generation of transgenic cynomolgus monkeys using piggyBac transposition.
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
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
---------	---------