

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22611

研究課題名（和文）光駆動型Casを用いた革新的遺伝子改変技術の開発

研究課題名（英文）Development of an innovative genome-editing technique using photoactivatable Cas

研究代表者

松本 翔馬（Matsumoto, Shoma）

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・特任助教

研究者番号：00881517

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：青色LEDの照射がマウス受精卵の胚盤胞発生率に影響しないことを受け、本研究では青色光駆動型Cas9（paCas9）を用いた高効率遺伝子改変動物作製技術の開発を試みた。paCas9を高効率でマウス受精卵へと導入するためのpiggyBacトランスポザゼクターの開発に成功し、受精卵を用いたゲノム編集試みたが、mRNAを用いた方法ではゲノム編集を誘導することができなかった。一方、paCas9プラスミドを用いることで標的配列を編集することに成功したが、その効率は著しく低かった。またマウス胚性幹細胞を用いた解析から、クリーンベンチ内の白色光がゲノム編集を誘導す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

本研究の成果から、青色光照射条件のさらなる検討や編集効率の改善の必要性が示唆されたが、青色光照射による時空間制御型の遺伝子改変技術が確立することで、ヘテロな細胞集団における特定の遺伝子機能について新たな知見を得ることが可能になる。特に遺伝子改変動物作製においては、相同組換え修復（HDR）活性の高いIG2/S期を狙ってゲノム編集を行うことで、目的のゲノム編集を高効率に誘導可能となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Our preliminary experiments revealed that the developmental efficiency of mouse embryos was not suppressed by blue light irradiation. From this result, we have tried to develop an innovative genome-editing technique using photoactivatable Cas9 (paCas9). We succeeded generating piggyBac transposase vector to induce paCas9 into host genome effectively. Although we performed genome editing for mouse embryos using paCas9 mRNA, only wild type genome sequencing was detected. Subsequently, we decided to use paCas9 plasmid to induce target gene knockout for mouse embryos. Genome editing was successfully observed at target loci, however, the efficiencies were quite low. Our results using mouse embryonic stem cells suggested that interior light also induce genome editing by paCas9.

研究分野：Developmental engineering

キーワード：Genome editing CRISPR/Cas9 optogenetics

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

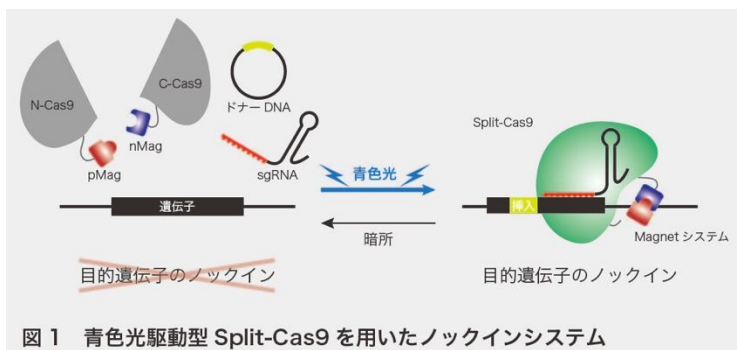
### 1. 研究開始当初の背景

歴史的にトランスジェニック、遺伝子操作された胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いた個体作製、ゲノム編集に代表されるゲノム改変技術などの発生工学技術の開発により、多くの有用なヒト疾患モデル動物が作出され、医学・生物学の発展に貢献してきた。特に 2012 年に報告された CRISPR/Cas9 は、これまでの ES 細胞を経由した個体作出の流れを一変させ、受精卵を直接遺伝子操作することでノックアウト個体を簡便に作出することが可能となった。しかし、GFP などの DNA 断片を特定のゲノム部位に挿入するノックイン効率は未だ 0~数十%と極めて低く、F0 世代での個体解析には程遠いのが現状である。この低いノックイン効率は、特定のゲノム部位に 2 本鎖 DNA が挿入されるために必要な相同組換え修復 (HDR) 活性が S/G2 期で高いにも関わらず、非相同末端結合修復 (NHEJ) 活性が恒常的に高いため、HDR が起こる前に NHEJ 経路の挿入/欠失変異が標的部位に入ってしまうことに起因する。

近年、アカパンカビが有する光受容体に着目し、Magnet システムと称する光スイッチタンパク質の開発が報告された (Kawano *et al.*, *Nat. Commun.*, 2015)。Magnet システムは pMag と nMag から成り、青色の光に応答して結合する性質をもつ。青色光駆動型 Cas9 (photoactivatable Cas9; paCas9) は、この Magnet システムを、二分割して DNA 切断活性を失った Split-Cas9 にそれぞれ連結したものであり、青色光の照射による Magnet システムの結合に伴い、Split-Cas9 も接近、結合することで標的の塩基配列を切断することができる画期的な遺伝子改変ツールである。paCas9 を利用することで、時期特異的なゲノム編集を簡便に誘導することが可能となる。

### 2. 研究の目的

paCas9 を利用し S/G2 期の間だけヌクレアーゼ活性を光誘導することで、受精卵へのノックイン効率を劇的に高める革新的発生工学技術の開発を目的とした (図 1)。



### 3. 研究の方法

#### i) piggyBac システムを利用した paCas9 ベクターの開発

マウス受精卵への応用を目的とし、paCas9 発現ユニットの piggyBac ベクターへの載せ替えを行なった。paCas9 領域は 5kbp と長大であったため、2 ステップに分けて piggyBac 用ドナーベクターへと組み替えた。その際、全身性で強力な発現が期待される CAG プロモーターへと変更し、また paCas9 の下流に薬剤耐性遺伝子も挿入した。さらに U6 プロモーター下流に ROSA26 領域または Nanog 遺伝子領域をターゲットとする sgRNA を導入したオールインワンベクターも構築した。

#### ii) マウス胚性幹 (ES) 細胞の培養および paCas9 安定発現株の樹立

マウス ES 細胞は DMEM (high glucose) に 20% KnockOut Serum Replacement、0.1 mM 2-mercaptoethanol、1x NEAA、1 mM Sodium Pyruvate、1x P/S、1  $\mu$ M PD0325901、3  $\mu$ M CHIR99021 および mouse LIF (house made) を加え、X-ray irradiated MEF (iMEF) 上で培養した。ROSA26 領域および Nanog 遺伝子をターゲットとする sgRNA を有する paCas9 ベクターは Lipofectamine 2000 を用いてマウス ES 細胞へと導入した。Puromycin 用いてこれら発現ユニットを有するクローンを選抜した。

#### iii) 免疫染色による Cas9 タンパク質の発現解析

クローン化されたマウス ES 細胞 paCas9 安定発現株について、470 nm  $\pm$  20 nm の青色光を 24 時間照射し、4% PFA で固定したサンプルについて抗 Cas9 抗体を用いた免疫染色を実施した。

#### iv) サンガーシーケンスによる変異解析

470 nm  $\pm$  20 nm の青色光を 24 時間照射したマウス ES 細胞について、gDNA を抽出し、sgRNA ターゲット領域の PCR を行なった。得られた PCR 産物を精製後、T-vector へとクローニングし、TempliPhi により増幅した amplicon をサンガーシーケンスすることで変異の検出を行なった。

#### 4. 研究成果

##### i) マウス ES 細胞 paCas9 安定発現株の樹立

マウス初期胚への応用を考慮し、piggyBac システムを用いた導入が可能となる paCas9 ベクターを構築した。全身性の発現を促すため、プロモーターを CAG プロモーターへと変更後、piggyBac ITR 配列 (5' および 3') を有するベクターへと組み替えた。また gDNA へと挿入されたことを薬剤により簡便に判定するため、paCas9 ユニットの downstream に IRES-PuroR を導入した。さらに、sgRNA も同時に導入するため、paCas9 の上流に U6 プロモーターおよび sgRNA 発現ユニットも搭載した。sgRNA ターゲット配列としては、セーフハーバー部位である ROSA26 領域、マウス ES 細胞にて高発現する Nanog 遺伝子を選定した。2iL 培地にて培養したマウス ES 細胞に、Lipofectamine 2000 を用いてこれらのプラスミドをそれぞれ導入し、Puromycin にて gDNA へと挿入されたクローンを選抜した。24 時間の青色光照射後に免疫染色を行なった結果、Cas9 タンパク質を発現する細胞を確認することができた (図 2)。樹立されたマウス ES 細胞株は以降の解析に用いた。



図 2 マウス ES 細胞 paCas9 発現株の樹立

##### ii) マウス ES 細胞 paCas9 安定発現株の変異解析

i) で樹立したマウス ES 細胞株を用いて、青色光による時期特異的ノックアウトの誘導を行なった。青色光を 24 時間照射したマウス ES 細胞から gDNA を抽出し、標的配列近傍を PCR により増幅、T-vector にクローニングを介しサンガーシーケンスによる変異の検出を試みた野生型マウス ES 細胞では標的配列に変異が検出されなかった一方、paCas9 安定発現株ではシーケンスの波形に乱れが見られ、変異が挿入されていることが確認された (図 3)。しかしながら、青色光を照射していない群についても頻度が低いながらも変異が導入されていることが明らかになった。また、野生型では二本鎖切断 (DSB) が生じる領域に TCT の 3 塩基が見られるものの、paCas9 安定発現株ではいずれの青色光照射条件でも共通して確認されないことが示された。これらのことから、paCas9 安定発現株を樹立する過程で、実験室内の白色光の影響で DSB が生じ、3 塩基欠失が生じていることが示唆された。実際に照度計を用いて青色光、実験室内の白色光を測定すると、paCas9 の活性化に用いた青色光は 1 ルクス (low) であったのに対し、実験室内における白色光の照度は数百倍以上であった。したがって樹立したマウス ES 細胞 paCas9 安定発現株を培養している間に、白色光に含まれる 470 nm 付近の光により Cas9 タンパク質によるゲノム編集が生じてしまったと考えられる。しかしながら、1 ルクスの青色光によりさらにゲノム編集が生じていることが確認されたため、構築した paCas9 ベクターは細胞内で正常に働くことが示された。

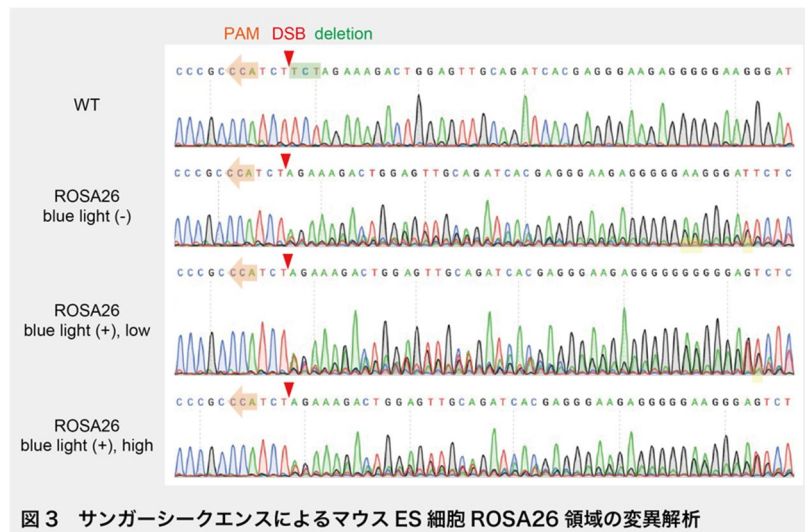


図 3 サンガーシーケンスによるマウス ES 細胞 ROSA26 領域の変異解析

##### iii) マウス初期胚の paCas9 による時期特異的ノックアウト解析

当初 piggyBac システムを用いて paCas9 発現ユニットをマウス初期胚へと導入する計画であったが、2 細胞期の S/G2 期特異的にゲノム編集を誘導することを考慮し、paCas9 mRNA を電圧ポレーションにより初期胚へと導入する計画へと変更した。これに伴い、まずは paCas9 配列を in vitro transcription 用ベクターへと載せ替え、paCas9 mRNA の合成を行なった。また、sgRNA についても ii) に使用したのと同じ配列を人工合成した。まずはこれらをマウス 1 細胞期胚に電圧ポレーションにより導入し、その後 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で体外培養を開始した。電圧ポレーションから 24 時間後に青色光を 6 時間照射、その後胚盤胞期まで発生させた。我々はこれまでにマウス初期胚に青色光を照射 (~24 時間) しても胚盤胞発生率に影響しないことを確認している。培養の結果、予備データと同様に青色光照射群と非照射群の胚盤胞発生率には差がないことが明らかになった。これら胚盤胞期胚を回収し、gDNA を抽出後、ii) と同様の方法でサンガーシーケンスを実施し変異解析を行なった。しかしながら、青色光照射群に関しても野生型胚と同様にターゲット領域にゲノム編集が確認されなかった。青色光の照射はマウス ES 細胞と同様の条件を採用したが、この結果から青色光の照射条件を検討する必要

があることが示唆された。

これまでの結果から、paCas9 を用いたマウス初期胚のゲノム編集技術確立向け、青色光照射条件のさらなる検討や編集効率の改善の必要性が示唆された。その一方で、本研究により完成するpaCas9 を用いた高効率遺伝子改変技術は、畜産動物や非ヒト霊長類など世代時間の長い中型動物に対して特に有効であり、短期間での遺伝子改変動物作出が期待され、広く医学・生物学研究に波及効果があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0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
---------	---------