

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500491

研究課題名(和文) ウイルスベクターとジンクフィンガーヌクレアーゼを用いた高効率相同組み換え法の開発

研究課題名(英文) Development of technology for efficient homologous recombination by the viral vector and zincfinger nuclease

研究代表者

山口 智之 (Yamaguchi, Tomoyuki)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80392158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ZFN、TALEN、Cas9-CRISPRなどのゲノム編集技術の進歩により相同組み換えによる遺伝子改変動物作製は飛躍的に容易になった。これらはNucleaseがゲノム上の特定の場所を切断することで細胞のDNA修復機構が働き、さらには相同組換えを誘導することができるという方法である。これらの方法では複数のコンポーネントを同時に発現させることが必要であり、初代培養細胞などの遺伝子導入が難しい細胞では効果は得られにくいという問題がある。そこで本研究では複数コンポーネントをレンチウイルスベクター上に導入し、高効率な相同組み換え法の開発を目指した。

研究成果の概要(英文)：Recent great progress of development of genome editing technology such as ZFN, TALEN, Cas9-CRISPR enabled us to generate gene targeting mice without labor intensive work. These genome editing systems can cut the specific sequence on the genome followed by recruitment of DNA repair machinery to the digested site and enhance the homologous recombination. On the other hand, simultaneous expression of several components are necessary for genome editing by these systems and this is the drawback of these systems for efficient genome editing in primary cells. In this study, we tried to generate single lentiviral vector harboring several components of gene editing system for efficient gene edition.

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：ゲノム編集技術 レンチウイルスベクター CRISPR-Cas9

1. 研究開始当初の背景

(1) ES 細胞を利用したノックアウトマウスの作製のためには、ターゲティングベクターを用いて相同組換えを行った後、相同組換え ES 細胞を胚盤胞へ導入し作製する。疾患の治療を研究する上では、ヒトに近い動物つまりサルやブタの疾患モデルを使用することが非常に重要であるが、現在のところサルを含めげっ歯類以外の動物由来の ES 細胞はキメラ形成能が無いいため、相同組換えを起こした繊維芽細胞を用いた核移植に頼らざるを得ない。これらの一連の作業は熟練の技術が必要であり、また相同組換えの頻度が極めて低いことなどから、時間と労力と費用のかかることが大きな欠点である。

(2) 近年 ZFN を用いた高効率な相同組換え法が開発され、多くの論文が発表されている。ZFN とはゲノム上の任意の場所の両側9塩基に特異的に結合できるよう人工的に合成された Zinc-finger DNA 結合領域 と FokI 制限酵素のエンドヌクレアーゼ領域を結合させたキメラヌクレアーゼであり、FokI が二量体を形成しゲノム上の特定の場所を切断することで細胞の DNA 修復機構が働き、さらには相同組換えを誘導することができる。ターゲティングベクターを用いたコンベンショナルな相同組換えの起こる確率は $1/10^5$ 程度であるが、ZFN を用いることで1~50%と飛躍的に効率が良くなることが報告されている。

2. 研究の目的

一方でこの方法の弱点は、ZFN 2種類とターゲティングコンストラクトの3種類の遺伝子を同時に発現させることが必要であり、初代培養細胞などの遺伝子導入が難しい細胞では当然ZFNの効果は得られにくいということである。改善策として考えら

れる方法は、「細胞への導入効率を上げる。」「ZFNとターゲティングコンストラクトをシングルベクターで導入する。」「相同組換え効率を上げる。」という三点である。そこで本研究ではHIVインテグラーゼとZFNの融合タンパク質をターゲティングコンストラクトが組み込まれたレンチウイルスベクターに封入し初代培養細胞および受精卵での相同組換えを試みる。

3. 研究の方法

(1) ZFN コンストラクトの作製

Oligomerized Pool Engineering (OPEN) method (Maeder ら、Mol Cell、2008) により Foxn1、Pdx11ターゲット ZFN を検索する。具体的には、OPEN pool (すでに入手済み) と呼ばれる Zinc Finger Motif の pool をもちいて Zinc Finger Library を作製し、その Library を使って Bacteria One-Hybrid 法を行う。ターゲット配列に特異的に結合する可能性が高い Zinc Finger Motif を数種類選択する。

(2) レンチウイルスベクターの作製

ZFN とインテグラーゼの融合タンパク質をレンチウイルスベクターに封入したウイルスベクターを作製する。

(3) 293T 細胞における変異の導入の確認

293T 細胞に ZFN を封入したレンチウイルスベクターを感染させターゲット配列に変異が導入できるか確認する。

また、ターゲティングコンストラクトも組み込んだウイルスを感染され相同組換えの有無を確認する。

(4) 完成したレンチウイルスベクターを

Foxn1KO 受精卵、前核に感染させ、遺伝子修復を試みる。

4. 研究成果

(1) ZFN コンストラクトの作製

OPEN method により Foxn1、コントロールとしてブタ Pdx1ZFN を検索した。(図1)

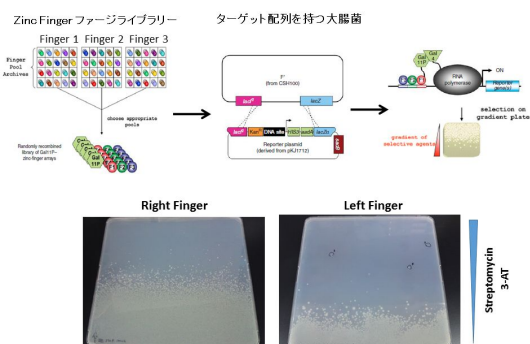


図1 . OPEN selection for ZFN

Pdx1に対するZFNは図1のように選択でき、ブタ iPS 細胞に導入すると変異を導入することが確認できた。(図2)

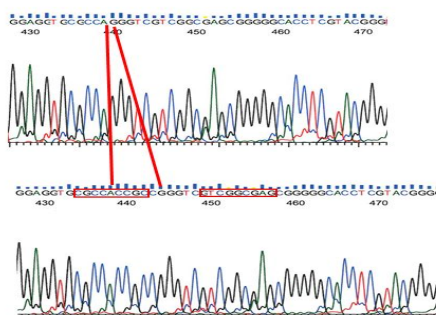


図2、Genome editing by selected ZFN

しかしながら、Foxn1 に対する ZFN はターゲット特異的なものが選択できなかった。そこで、Foxn1 に対する genome 編集が validate された TALEN を用いてウイルスベクターを構築する方針に変更した。

(2) レンチウイルスベクターの構築

Integrase-TALEN の融合たんぱく質の形でウイルスに取り込まれ、標的細胞内で genome に変異を導入できるか確かめる為に、図3のコンストラクト、およびウイルスベクターを作製し、マウス胎児繊維芽細胞 (MEF) に感染させ、GFP 陽性細胞の変異の有無を確かめ

た。

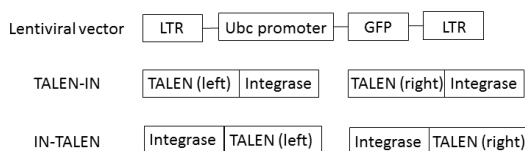


図3、Lentiviral vector construct (TALEN)

TALEN-IN、IN-TALEN それぞれのウイルス感染細胞 100 クローン以上よりゲノムを回収し、ターゲット配列のシーケンスを行ったが、変異は一つも観られなかった。この原因として、1、融合タンパクがウイルスに取り込まれていない。2、融合タンパクが TALEN の機能を失ってしまった。3、左右の TALEN が両方効率よくウイルスに取り込まれていない。この3つの可能性が考えられる。

TALEN-IN、IN-TALEN 融合タンパクのウイルスベクターへの取り込みを調べるために、ウイルス粒子の TALEN N 末端にある FLAG エピトープに対して Western blot を行った。その結果、TALEN-IN、IN-TALEN 両方とも全く、または極微量にしかウイルス粒子に取り込まれていないことが分かった。(図4)

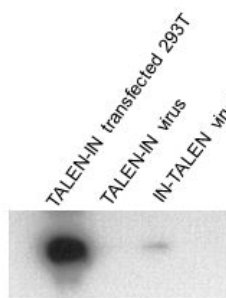


図4、Viral particle Western blot

これらの結果から、現段階でウイルス粒子中にタンパク質で ZFN や TALEN を封入し感染細胞中でゲノムに変異を導入するのは非効率であることが分かった。

次に、遺伝子の形でウイルスに組み込む方法を検討した。ここでは、近年発表された ZFN

や TALEN よりも作製が容易で、左右 2 種類の融合タンパクが不必要な CRISPR-Cas9 を用い、下記のコンストラクトを作製した。(図 5)

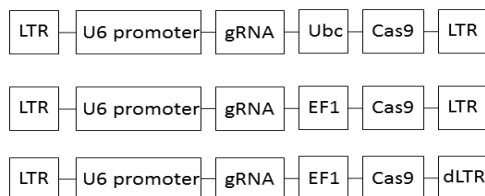


図 5、CRISPR-Cas9 Lentiviral vectors

gRNA には safe harbor である AAVS1 と CGD の原因遺伝子である CYBB を標的とするものの 2 種類を作製した。また、これらのウイルスは episomal 型を使用するため、episomal 型のウイルスにおいて遺伝子の発現量を増加させると報告されている LTR の欠損型も作製した

これらのプラスミドを使って episomal 型、非 episomal 型のレンチウイルスベクターを作製し、moi=25 で 293T 細胞に感染させた。そして、感染 3 日後にゲノムを回収し、T7 endonuclease assay により変異導入を確かめた。(図 6)

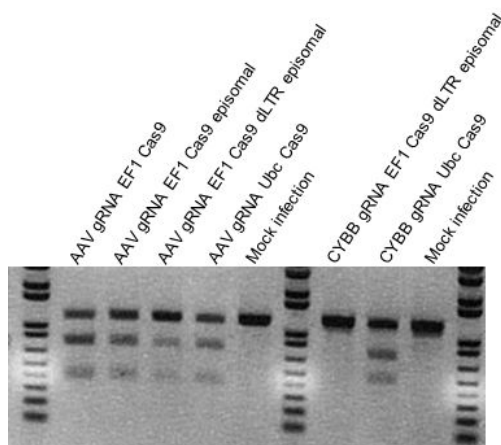


図 6、T7E1 assay of infected cells

レーン 1, 2 より episomal 型のウイルスでも効率良く変異を導入できることが確認できた。また、293T 細胞では、Ubc promoter よりも EF1 promoter の方が変異導入効率が高いことも分かった。一方で、遺伝子発現が

より高くなると報告されている LTR 欠損型では逆に効率が低下してしまうことが確認された。

以上の結果から、gRNA と Cas9 はシングルレンチウイルスベクター上に構築でき、効率良くゲノムに変異を導入できることが分かった。

次にドナーベクターの構築を行った。(図 7)



図 7、Construct of Donor vector

これらベクターと Cas9、gRNA を同時に 293T 細胞に導入し、相同組み換え (HR) が起こったかどうかを T7E1 assay で確認した。

その結果、plasmid では 25%、lentiviral vector では 42% の確率で HR が起こったことが確認された。(図 8)

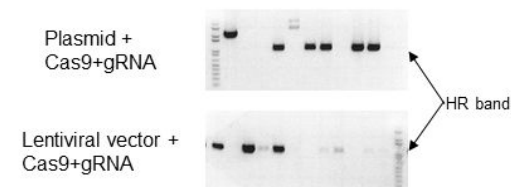


図 8、T7E1 assay of 293T cells

この結果から、上記の Cas9-gRNA system で効率良く HR が起こり、ドナー配列がレンチウイルスベクターに組み込まれていても HR が起こるといことが確認された。

当初の研究計画ではシングルベクターでの HR を目指したが、達成できなかった。しかし、Cas9-gRNA、Donor vector 共にレンチウイルスベクターの形で働くことが確認されたので、今後はこれらをシングルベクターにすることでさらに HR 効率を上げ、*in vivo* での HR を目指したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計14件)

1. Hirose S, Takayama N, Nakamura S, Nagasawa K, Ochi K, Hirata S, Yamazaki S, Yamaguchi T, Otsu M, Sano S, Takahashi N, Sawaguchi A, Ito M, Kato T, Nakauchi H, Eto K. Immortalization of erythroblasts by *c-MYC* and *BCL-XL* enables large-scale erythrocyte production from human pluripotent stem cells. **Stem Cell Reports.** 1, 499-508 (2013).
2. Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. **Nat Genet.** 45, 1232-1237 (2013).
3. Hamanaka S, Ooehara J, Morita Y, Ema H, Takahashi S, Miyawaki A, Otsu M, Yamaguchi T (Corresponding author), Onodera M, Nakauchi H. Generation of transgenic mouse line expressing Kusabira Orange throughout body, including erythrocytes, by random segregation of provirus method. **Biochem Biophys Res Commun.** 435, 586-591 (2013).
4. Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, Okabe M, Masaki H, Takaki S, Otsu M, Nakauchi H. Generation of Engraftable Hematopoietic Stem Cells From Induced Pluripotent Stem Cells by Way of Teratoma Formation. **Mol Ther.** 21, 1424-1431 (2013).
5. Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Nagaya M, Kobayashi T, Yamaguchi T, Sumazaki R, Herzenberg LA, Nakauchi H. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 110, 4557-4562 (2013).
6. Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Sakai R, Watanabe M, Umeyama K, Kobayashi T, Yamaguchi T, Shiota A, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H. 326 generation of a double-transgenic pig with pancreas-specific green and liver-specific red fluorescence. **Reprod Fertil Dev.** 25, 311 (2012).
7. Yamaguchi T, Morikawa A & Miyoshi H. Comparison of gene-trapping efficiency between retroviral and lentiviral vectors in mouse embryonic stem cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 425, 297-303 (2012).
8. Yamaguchi T (Corresponding author), Hamanaka S, Kamiya A, Okabe M, Kawarai M, Wakiyama Y, Umino A, Hayama T, Sato H, Lee YS, Kato-Itoh M, Masaki H, Kobayashi T, Yamazaki S & Nakauchi H. Development of an All-in-One Inducible Lentiviral Vector for Gene Specific Analysis of Reprogramming. **PLoS One.** 7, e41007 (2012).
9. Kobayashi T, Kato-Itoh M, Yamaguchi T, Tamura C, Sanbo M, Hirabayashi M, & Nakauchi H. Identification of Rat Rosa26 Locus Enables Generation of Knock-in Rat Lines Ubiquitously Expressing tdTomato. **Stem Cells Dev.** 21, 2981-2986. (2012).
10. Usui J, Kobayashi T, Yamaguchi T, Knisely AS, Nishinakamura R, &

Nakauchi H. Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation. **Am J Pathol.** 180, 2417-2426 (2012).

11. Suzuki N, Yamazaki S, Ema H, Yamaguchi T, Nakauchi H, & Takaki S. Homeostasis of hematopoietic stem cells regulated by the myeloproliferative disease associated-gene product Lnk/Sh2b3 via Bcl-xL. **Exp Hematol.** 40, 166-174, (2012).
12. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo M.M, Karlsson S, Iwama A, & Nakauchi H. Nonmyelinating schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. **Cell**, 147, 1146-1158 (2011).
13. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, & Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. **Nature.** 478, 64-69 (2011).
14. Hamanaka S, Yamaguchi T (Corresponding author), Kobayashi T, Kato-Ito, M, Yamazaki S, Sato H, Umino A, Wakiyama Y, Arai M, Sanbo M, Hirabayashi M, & Nakauchi H. Generation of germline-competent rat induced pluripotent stem cells. **PLoS One.** 6, e22008 (2011).

[学会発表](計3件)

山口智之 DEVELOPMENT OF ALL-IN-ONE

INDUCIBLE LENTIVIRAL VECTOR FOR GENE SPECIFIC ANALYSIS OF REPROGRAMMING

国際幹細胞学会 (ISSCR) 2011 年 6 月 1

4 日 横浜

山口智之 異種動物体内を利用した多能性幹細胞からの臓器、組織再生法動物学

会総会 2013 年 9 月 26 日 岡山

山口智之 異種動物体内での臓器構築

再生医療学会 2014 年 3 月 5 日 京都

[図書](計4件)

1. Yamaguchi T, Hamanaka S, Nakauchi H. The generation and maintenance of rat induced pluripotent stem cells. **Methods in Stem Cells and Tissue Repair**, in press
2. 葉山智工、山口智之、中内啓光、iPS細胞研究の現状と生殖細胞研究との関連、**Horm Front Gynecol**、18 巻、69-78 頁 (2011) .
3. 山口智之、中内啓光、異種動物個体内での臓器再生、**最新医学**、69 巻、3 月増刊号 (2014) .
4. 山口智之、中内啓光、動物利用ヒト臓器再生、**医学のあゆみ**、Vol.249 No.5 (2014)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 智之 (YAMAGUCHI Tomoyuki)

東京大学 医科学研究所 助教

研究者番号 : 80392158