

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710240

研究課題名(和文)トランスポゾンを利用した一塩基レベル遺伝子ターゲティング

研究課題名(英文)Single nucleotide-level genome engineering using transposon cassettes

研究代表者

ウォルツェン クヌート(Woltjen, Knut)

京都大学・白眉センター・准教授

研究者番号：50589489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、piggyBacトランスポゾンやTALEN技術を用いて、ヒトiPS細胞において遺伝子改変技術を確立することを目的とした。TALENを利用した遺伝子改変方法により、ヒトiPS細胞においてHPRT遺伝子の破壊、およびAAVS1遺伝子座にtransgene cassetteを導入することに成功した。さらに、single-stranded oligonucleotideを用いてHPRT遺伝子の一塩基置換にも成功した。我々が確立したヒトiPS細胞における遺伝子改変技術は、病態モデル作製や疾患特異的iPS細胞を用いた病態解明、治療法確立に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to combine TALEN (TAL-Effector Nuclease) technology and piggyBac transposon-based selection cassettes to establish novel gene-modification technology in human iPS cells. We succeeded in genetic modification using TALENs, disrupting the HPRT gene and introducing transgene cassettes into the AAVS1 locus in human iPS cells. In addition, we also succeeded in single base substitution within the HPRT gene using TALEN disruption and a single-stranded oligonucleotide repair template. Based on the gene modification technology that we have established in human iPS cells, we propose applications in gene correction of disease-specific iPS cells, or the production of disease models to understand pathogenesis and establish clinical treatments.

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：応用ゲノム科学

キーワード：遺伝子ターゲティング ヌクレアーゼ iPS細胞 TALEN nuclease transposon cardiomyocyte SNP ion channel

1. 研究開始当初の背景

ヒト個人が持つ一塩基多型(SNPs)は、特定の疾患への罹患率を上昇させる原因となる。iPS細胞樹立の技術と invitroでの遺伝子改変の技術を組み合わせることによって、患者個人のゲノム情報に基づいた疾患機能解析を行うことが可能となることが期待されている。しかしながら、現在までの技術では、遺伝子操作によってゲノムの中から特定のSNPsのみを改変、修正する事は不可能であった。しかし、ゲノムに挿入後痕跡を残さずに削除することができるトランスポゾンの性質を利用すれば、一塩基レベルでの遺伝子の改変、修正を行うことが可能になる。また近年開発された TALE ヌクレアーゼ (TALEN)による遺伝子改変技術はヒト細胞における遺伝子改変ツールとして注目されている。

2. 研究の目的

本研究では、*piggyBac* トランスポゾンや TALEN 技術を用いて、ヒト iPS 細胞において遺伝子改変技術を確認することを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子改変を行わない方法 (エピソーマル) によって樹立された正常あるいは疾患 iPS 細胞において、*piggyBac* (PB) トランスポゾンの技術を応用した遺伝子ターゲティングを行った。

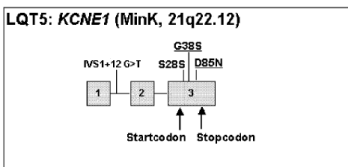


Figure 1. A SNP in KCNE1 exon3 results in the LQTS associated D85N mutation.

を導出したのち、トランスポゾンの一過的な発現によって痕跡を残さず PB カセットを取り除き、候補 SNP の改変を試みた。さらに、iPS 細胞由来の心筋細胞における機能を調べることによってゲノム上の DNA 一塩基レベルの変化が与える影響について検討を行った。通常の相同組み換えによる遺伝子改変は、組換え効率が低いことが知られているため、効率の良い遺伝子改変技術開発を目指した。具体的には、TALEN 技術を用いて BAC から作製したターゲティングベクター、および single-stranded oligonucleotide による遺伝子改変の可能性について検討した。

4. 研究成果

初年度には、CiRA 内での共同研究によりエピソーマルベクターによって樹立された正常および疾患特異的 iPS 細胞を用いて研究を行なった。まず、SNP アレイやダイレクトシーケンシングを用いて、それら細胞の遺伝子型の解析を行なった (Figure 2)。また、FACS 解析やソーティング技術を用いて、*piggyBac* トランスポゾンを取り除く効率の良い条件を検討した (Figure 3, 4)。

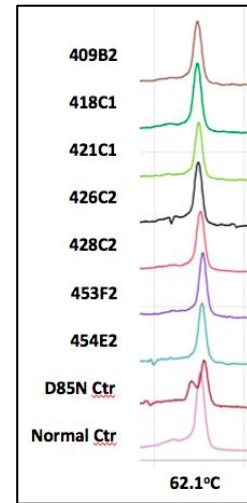


Figure 2. D85N SNP genotyping of episomal iPS cell lines showing normal genotypes.

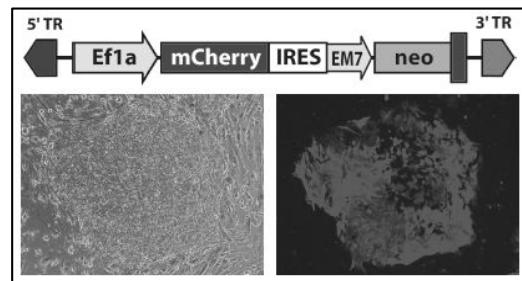


Figure 3. Design of the *piggyBac* gene targeting cassette, and expression in human iPS cells (409B2). The vector was also produced to express GFP.

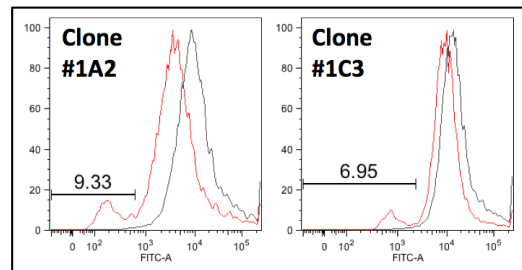


Figure 4. *piggyBac* transposase-mediated removal frequencies in two 409B2 clones. black, without transposase; red, with transposase.

piggyBac トランスポゾンの除去効率は確率的であり挿入遺伝子座により影響を受けることが明らかとなった。*piggyBac* トランスポゾンの除去後のランダムな再挿入による遺伝子変異の可能性が考えられる。さらに

piggyBac トランスポゾン除去時の遺伝子変異率は低いことが知られるものの、その可能性は完全には否定しきれない。以上より、*piggyBac* トランスポゾンや薬剤選択を必要としない効率の高い遺伝子組み換え技術の確立が必要と考えられた。そこで、研究の後半には新しいヌクレアーゼ技術 (TALEN) を応用した効率の良い遺伝子ターゲティング法の確立に集中して研究を行った。具体的には、CiRA が保有する筋肉変性疾患、神経変性疾患、心臓疾患患者の細胞から樹立した疾患ヒト iPS 細胞を利用し、研究を行なった。それら iPS 細胞の遺伝子型および特性を解析し、BAC から作製した標準的なターゲティングベクターを利用した遺伝子ターゲティングを試みたが、過去の報告通り、効率が非常に悪く、遺伝子ターゲティングは成功しなかった。そこで、効率の良い新たな遺伝子ターゲティング法の開発を目指した。TALEN を利用した遺伝子改変方法の確立は、広島大学の山本卓教授と共同で行った。この新しい遺伝子ターゲティング手法により、ヒト iPS 細胞において HPRT 遺伝子の破壊、および AAVS1 遺伝子座に transgene cassette を導入することに成功した。TALEN を用いたヒト iPS 細胞での HPRT 遺伝子座ターゲティングに関しては、国際誌に報告した(Sakuma et al., *Genes to Cells*, 2013)。次に、未分化状態のヒト iPS 細胞において AAVS1 遺伝子座に挿入した外来遺伝子が持続的に発現可能であることを確認した。現在は、

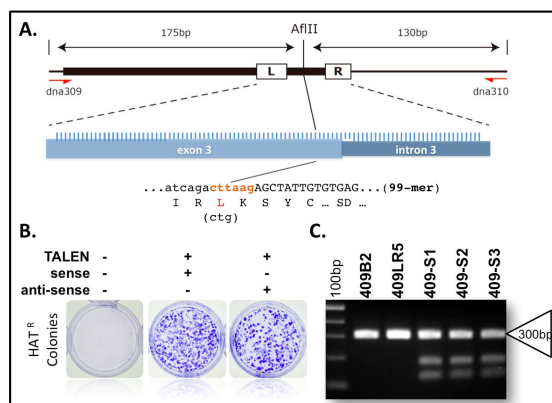


Figure 5. HPRT gene correction using single-stranded oligonucleotides. **A.** TALENs (L/R) flank the mutation site. The oligo (blue) corrects the mutation and deposits an AflIII restriction site. **B.** Growth in HAT medium indicates HPRT mutation correction. **C.** Genomic PCR and AflIII digestion reveals gene correction in three clones (S1,2,3). PCR products from 409B2 and 409LR5 (HPRT mutant) do not cut.

AAVS1-GFP 導入ヒト iPS 細胞を各種分化細胞に分化させることで、分化細胞における AAVS1 遺伝子座からの外来遺伝子発現量について比較検討を行っている。さらに、我々は single-stranded oligonucleotide を用いて HPRT 遺伝子の一塩基置換にも成功した (一塩基置換は RFLP により確認を行った) (Figure 5)。

ヒト iPS 細胞における遺伝子改変技術の確立は、iPS 細胞を用いた病態モデル作製に有用であるのみならず、疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明、治療法確立にも応用可能である。本研究手法を用い、より多くの遺伝子に対して遺伝子改変を行なっていく予定である。

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 3件)

Sakuma, T. and Woltjen, K. Nuclease-mediated genome editing: At the front-line of functional genomics technology. *Development, growth & differentiation*, 2014; 56, 2-13. *peer reviewed.*

Sakuma T., Hosoi S., Woltjen K., Suzuki K.I., Kashiwagi K, Wada H., Ochiai H., Miyamoto T., Kawai N., Sasakura Y., Matsuura S., Okada Y., Kawahara A., Hayashi S. and Yamamoto T. Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes to Cells*, 2013; 18(4), 315-326. *peer reviewed.*

Michael, I.P., Monetti, C., Chiu, A.C., Zhang, P., Baba, T., Nishino, K., Agha-Mohammadi, S., Woltjen, K., Sung, H.K. and Nagy, A. Highly efficient site-specific transgenesis in cancer cell lines. *Molecular Cancer*, 2012; 11(1), 89-100. *peer reviewed.*

[学会発表](計 4件)

Transposed and targeted gene expression systems for guiding somatic cell reprogramming and differentiation. Conference on Transposition and Genome Engineering. Woltjen, K. 2013年09月18日、Budapest, Hungary.

Transposed and targeted gene expression systems for guiding somatic cell reprogramming and differentiation.

Japanese Society for Developmental Biology. Woltjen, K. 2013年05月31日、松江、日本。

Developing TALEN-mediated genome engineering strategies for human iPS cells. 2回のゲノム編集研究会(招待講演)。Woltjen, K. 2012年09月20日~21日、岡崎、日本。

Genome engineering strategies for human iPS cells. 分子生物学学会。 Woltjen, K. 2012年12月11日~14日、福岡、日本。

〔図書〕(計 2件)

李 紅梅, Knut Woltjen, 高橋和利, 山中伸弥, 堀田秋津. TALENを用いたヒト iPS 細胞におけるゲノム編集. *細胞工学*, 2013; Vol.32 (5): p526-531.

Woltjen, K., Hamalainen, R., Kibschull, M., Mileikovsky, M., Nagy, A. Transposon-Based Production of Genetically Unmodified Induced Pluripotent Stem Cells From Human Embryonic Fibroblasts. *Methods in Molecular Biology*, 2011; 767, 87-103

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/woltjen/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 ()

研究者番号：

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：