

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25890011

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9を用いた多重遺伝子ノックアウトラット作製技術の開発

研究課題名(英文) Development of a multiple knockout technology with CRISPR/Cas9 in rats

研究代表者

吉見 一人 (Yoshimi, Kazuto)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50709813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、毛色関連遺伝子Tyr、Asip、Kit遺伝子を対象に、遺伝子改変技術CRISPR/Cas9を利用した効率的なノックアウトラット作製システムの構築を行った。また、一本鎖オリゴヌクレオチドを用いることで、破壊だけでなく特定の配列に置き換えるノックイン技術の確立も行った。ラット受精卵にマイクロインジェクション法によりRNAを導入することで、すべての遺伝子についてノックアウトおよびノックインを得ることができた。これらの遺伝子を修復したノックイン個体は、表現型が修復することを確認した。

研究成果の概要(英文)：Recently, the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) system was applied as a newly and efficient genome editing tool in rats. We focused on the coat color related gene, Tyr, Asip and Kit genes. Microinjection of guide RNA (gRNA) and Cas9 mRNA into rat embryos produced a variety of insertion or deletion mutations and generated knockout (KO) rats by using the CRISPR/Cas9 system. Furthermore, combination of CRISPR/Cas9 and single-stranded oligodeoxynucleotides (ssODNs) enabled us to generate several types of targeted knock-in (KI) rats, such as SNP substitution, short DNA fragment integration, and large DNA fragment elimination. Therefore, CRISPR/Cas9 provides an efficient and robust genome engineering tool to generate multiple KO and KI rats.

研究分野：実験動物学

キーワード：ラット ゲノム編集 ノックアウト ノックイン CRISPR/Cas9

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト疾患の発症機序の解明、新たな治療法の開発には、モデル動物を用いた研究が欠かせない。ラットは古くからヒト疾患モデル動物として、生理学、栄養学、薬理学、行動学等における基礎研究や、新規化合物の評価試験・安全性試験に用いられてきた。しかし、これまで ES 細胞を用いた遺伝子改変技術が確立されておらず、ノックアウトラットを作製することが極めて困難であった。

近年、人工ヌクレアーゼ ZFN、TALEN を用いたゲノム編集技術により、従来 ES 細胞がないために困難であった遺伝子改変ラットの作製が可能になった。さらに 2013 年、新たなゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 が報告された。この方法は、一本鎖の RNA (gRNA) が標的配列を認識し、Cas9 ヌクレアーゼを誘導して標的配列に二本鎖切断を導入することで、ZFN/TALEN と同様に自由なゲノム編集を可能にする。

## 2. 研究の目的

CRISPR/Cas9 システムは、gRNA が簡単かつ低コストで作製することができ、複数の gRNA を同時に注入することで複数の遺伝子を同時に操作できるなど利点が多く、効率的な遺伝子改変ラット作製への汎用性が極めて高いと期待された。

そこで本研究では、新規ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を利用し、正確、低コスト、短期間で複数の遺伝子を破壊できるノックアウトラット作製システムを構築することとした。

## 3. 研究の方法

(1) チロシナーゼ (Tyr) 遺伝子を対象に gRNA を設計し、トランスフェクション効率の高いラット繊維芽細胞 Rat-1 を用いて、CRISPR/Cas9 の切断効率を検討することとした。エレクトロポレーション法により Cas9 ベクターおよびガイド RNA もしくはガイド RNA 発現ベクターを細胞に導入した。これらの細胞を回収後、DNA を抽出し Surveyor 解析およびシーケンス解析により、切断効率を測定した。この方法により、変異導入効率の良い gRNA を選抜した。

(2) Tyr 遺伝子はメラニン色素の合成に関わる遺伝子で、変異あるいは欠損すると体毛や皮膚が白くなる色素欠乏症、いわゆるアルビノになることが知られている。そこで、変異導入効率が確認された gRNA を用いて、ラット受精卵の雄性前核に Cas9 の mRNA および gRNA をマイクロインジェクション法により導入した。得られた産子の Ggenotyping によ

り Tyr 遺伝子のノックアウトラットを同定し、特性確認を行った。

(3) 多重遺伝子ノックアウトラットの作製技術を構築することを目指して、毛色に関連する遺伝子 Tyr に加え、Asip, Kit 遺伝子についても同様に gRNA を設計・変異導入効率を検討し、トリプルノックアウトラットおよびノックインラットを作製し、特性確認を行った。

## 4. 研究成果

(1) Tyr 遺伝子を標的とする gRNA を CRISPR Design Tool (crispr.mit.edu) を用いて設計した。ラット繊維芽細胞を用いて Surveyor 解析を行った結果、変異が導入されていることが確認された。実際に標的領域のシーケンス解析により切断効率を検討した結果、31.6% で Tyr 遺伝子に数 bp から数十 bp の挿入または欠失変異が見られた。

(2) 細胞で変異導入が確認された gRNA および Cas9 mRNA をマイクロインジェクションにより導入した受精卵を、2 細胞期胚で回収し、シーケンス解析を行った結果、41.2% の胚で標的配列に変異が導入されていた。

次に、実際にインジェクションをした受精卵を偽妊娠ラットに移植し、産子を得た結果、Wistar ラット系統では 3 匹中 3 匹ともに Tyr の変異が導入されていることが確認できた。標的配列に類似した Off target 配列についても 7 か所シーケンスを行った結果、これらの領域に変異は検出されなかった。また、得られた変異はすべて子孫へ安定的に伝達されることも確認できた。

(3) F344 や Wistar などアルビノを示すラット系統は、Tyr 遺伝子上 896 番目の G から A への一塩基変異 (SNP) を有することで色素欠乏が生じることが知られている。そこで Tyr 遺伝子の野生型を認識する gRNA (野生型 gRNA) を野生色由来繊維芽細胞 (REF) に導入したところ、変異が導入されていたのに対し、アルビノ由来繊維芽細胞に導入したところ、変異が導入されなかった。アルビノ型を認識する gRNA (アルビノ型 gRNA) を用いた場合でも同等の正確性が見られた。

そこで、野生型、アルビノ型の両アリルを持つ F1 個体に対し、野生型 gRNA を導入したところ、産子の中にアルビノもしくはモザイク色を示す個体が出現し、野生型 Tyr 遺伝子アリルに変異が導入されていた (30.4%)。逆に、アルビノ型 gRNA を導入した場合、アルビノ型 Tyr 遺伝子アリルだけに変異が導入されており (28.6%) 産子の毛色はすべて野生色だった。すなわち gRNA は正確に SNP を認識し、アリル特異的にノックアウトを作製できることが明らかとなった。

(4) 野生色系統に比べ、F344 ラットは上述し

た Tyr 遺伝子の一塩基変異に加え、Asip 遺伝子の 19 塩基欠損変異(ノンアグーチ色)、Kit 遺伝子のレトロトランスポゾン挿入変異(頭巾斑)を有することが知られている。そこで、これらの遺伝子についても同様に標的配列を設計し、ノックアウトラットの作製を試みた。その結果、Tyr、Asip、Kit すべての標的配列において、ノックアウトラットの作製に成功した。

(5) 変異を導入する際にドナーDNA を共に導入することで、特定の配列に遺伝子を改変するノックインが可能であることが知られている。そこで、一本鎖オリゴヌクレオチド(ssODN)をドナーとして用いて、F344 ラットでみられる Tyr、Asip、Kit それぞれの遺伝子の変異に対して ssODN を用いて修復することを試みた。各標的部位について、ドナーとなる野生型配列の ssODN を設計し、gRNA、Cas9 mRNA とともに受精卵へ導入したところ、1 塩基置換、19 塩基挿入、トランスポゾン除去された、いわゆるノックインラットの作製に成功した。また、これら遺伝子変異の修復により、表現型がすべて修復されることを確認した。

(5) 以上の結果から、新規ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を利用することで、正確、低コスト、短時間で複数の遺伝子を破壊および改変できる遺伝子改変ラット作製システムを構築することに成功した。今後、より効率的かつ自由な遺伝子改変ラット作製基盤を確立することで、ヒト疾患で同定された遺伝子変異・SNP 等を正確に反映したノックインラットの作製が可能となり、ヒト疾患モデルを含む新規モデルラットの創出に大きく寄与することが期待される。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

吉見一人、金子武人、真下知士、ラットにおけるゲノム編集技術革命、実験医学、査読無、2014、32 (11)、1715-1720

Kazuto Yoshimi, Takehito Kaneko, Birger Voigt, Tomoji Mashimo、Allele-specific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR-Cas platform、Nature Communications、査読有、2014、5:4240. DOI: 10.1038/ncomms5240

吉見一人、金子武人、真下知士、ラットにおける TALEN および CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子改変、実験医学別冊 最強のステップアップシリーズ「今すぐ始めるゲノム編集」(山本卓/編)、査読無、2014、109-119

〔学会発表〕(計 11 件)

Kazuto Yoshimi, Takehito Kaneko, Birger Voigt, Tomoji Mashimo、Improved Protocols for Generating Genetically-modified Rats with the CRISPR/Cas9 System、BRI International Symposium 2015、Niigata, Japan, Mar 5-6

Kazuto Yoshimi, Takehito Kaneko, Birger Voigt, Tomoji Mashimo、Improved Protocols for Generating Genetically-modified Rats with the CRISPR/Cas9 System、2014 Rat Genomics & Models, Hinxton, UK, Dec 1-4

吉見一人、金子武人、真下知士、CRISPR/Cas システムによるノックインラットの作製法、第 37 回日本分子生物学会総会、横浜 2014 年 11 月 25 日 -27 日

吉見一人、国広弥生、林真智子、服部晃佑、金子武人、真下知士、CRISPR/Cas9 を利用した効率的な遺伝子改変ラット作製法、第 4 回ゲノム編集研究会、広島 2014 年 10 月 6-7 日

吉見一人、ゲノム編集技術がもたらす実験動物の新展開 ~ラットを中心に~、第 31 回藤田カンファレンス、大阪 2014 年 9 月 20 日-21 日

Kazuto Yoshimi, Takehito Kaneko, Birger Voigt, Tomoji Mashimo、Allele-specific genome editing and correction of coat color-related phenotypes in rats using the CRISPR/Cas system、Cold Spring Harbor Asia Conference “Systems Biology of Gene Regulation and Genome Editing”、Suzhou, China, Sep 9-12, 2014

Kazuto Yoshimi、Allele-specific genome editing and correction of coat color-related phenotypes in rats using CRISPR/Cas9、5th Young EURAT Investigators Symposium, Malaga, Spain, June 5-6, 2014

吉見一人、金子武人、真下知士、CRISPR/Cas を用いたノックインラットの作製、第 61 回日本実験動物学会総会、札幌 2014 年 5 月 15-17 日

吉見一人、CRISPR/Cas システム:ラット遺伝子改変技術のさらなる展開、第 7 回ラットリソースリサーチ研究会、京都 2014 年 1 月 31 日

Kazuto Yoshimi, Takehito Kaneko, Tomoji Mashimo、Knockout and knock-in mutations for rat albino gene generated by CRISPR/Cas、2013 Rat Genomics & Models、Cold Spring Harbor, NY, Dec 11-14

吉見一人、金子武人、芹川忠夫、真下知

士、CRISPR/Cas を用いた SNP 特異的  
遺伝子改変ラットの作製、第 3 回ゲノム  
編集研究会、東広島 2013 年 10 月  
26-27 日

〔図書〕(計 1 件)

Kazuto Yoshimi 他、Springer Japan、  
Targeted Genome Editing Using  
Site-Specific Nucleases (ZFNs, TALENs,  
and the CRISPR/Cas9 System)、2015、205  
(183-195)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：哺乳動物の標的ゲノム領域に DNA を  
ノックインする方法及び細胞  
発明者：真下知士、吉見一人、金子武人  
権利者：国立大学法人京都大学  
種類：特許権  
番号：特願 2014-235898  
出願年月日：平成 26 年 11 月 20 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

京都大学研究成果ページ「CRISPR/Cas シス  
テムを用いたアレル特異的ゲノム編集とラ  
ット毛色突然変異の修復」  
[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research\\_results/2014/140626\\_1.html](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2014/140626_1.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉見一人 (YOSHIMI, Kazuto)

研究者番号：50709813