

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25890014

研究課題名(和文)染色体レベルの高度なゲノム編集を可能にするCRISPR/Casシステムの開発

研究課題名(英文)Development of CRISPR/Cas system enabling advanced genome editing on chromosome level

研究代表者

佐久間 哲史(SAKUMA, TETSUSHI)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：90711143

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)：複数遺伝子の同時破壊や染色体の広域欠失といった高度なゲノム編集を実行可能なベクターシステムを開発し、培養細胞およびマウス個体での実用性を検証した。培養細胞では、最大で7遺伝子までの同時破壊と染色体の広域欠失が可能であることが示された。また、特異性の高いCas9バリエーションであるFokI-dCas9を用いたオールインワンベクターによって、単一プラスミドの顕微注入で複数の遺伝子座への変異導入がマウス胚内で実現できることを示した。

研究成果の概要(英文)：We developed a vector system enabling advanced genome editing such as simultaneous disruption of multiple genes and large chromosomal deletion, and evaluated its applicability in cultured cells and mice. In cultured cells, multiple targeted mutagenesis for up to seven genes and chromosomal deletion were demonstrated. In addition, it was shown that simultaneous gene disruption at multiple gene loci was feasible in mouse embryos by single plasmid injection using an all-in-one vector carrying FokI-dCas9, which is known as a highly-specific variant of Cas9.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：ゲノム編集 CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

CRISPR/Cas9 法の登場により、ゲノム編集技術の利便性は大きく向上したが、研究開始当初には、同時多重遺伝子破壊や染色体の転座、逆位、重複、広域な領域欠失など、染色体レベルでの高度なゲノム改変を可能にするベクターシステムは確立されていなかった。

2. 研究の目的

CRISPR/Cas9 法を利用し、複数の遺伝子座の切断を効率的に誘導できるベクターを容易に作製可能なシステムを開発することを目的とした。CRISPR/Cas9 システムは、Cas9 タンパク質とガイド RNA と呼ばれる低分子 RNA の 2 つのコンポーネントにより構成されるが、1 種類の Cas9 タンパク質と共に、複数のガイド RNA を発現させると、複数の遺伝子座を同時に切断することが可能となる。そのため、Cas9 の発現カセットと複数のガイド RNA 発現カセットを単一のベクター上に統合できるシステムを確立すれば、高度ゲノム編集を効率的に誘導できると考えられる。

3. 研究の方法

(1) マルチガイドベクターシステムの確立と培養細胞を用いた高度ゲノム編集の実践

マルチガイドベクターシステムは、2 段階のステップから成る。ステップ 1 では、ガイド RNA の標的配列に対応する合成オリゴヌクレオチドを挿入し、ステップ 2 ではそれらを Golden Gate 法と呼ばれるアセンブリー法によって統合する(下図)。これにより、最大で 7 つまでのガイド RNA カセットと Cas9 を同時に発現するベクターが作製可能となった。また、このベクターを培養細胞に導入し、高度ゲノム編集が実施可能かどうかを検証した。

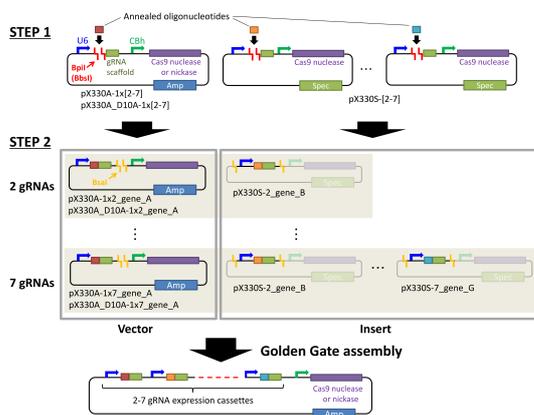


図 マルチガイドベクターシステムの概要

(2) マルチガイドベクターシステムの改良とマウス個体を用いた高度ゲノム編集の実践

当初、マルチガイドベクターシステムで発現させられる Cas9 タンパク質は、ヌクレア

ーゼ型とニッカーゼ型のみであったが、更に特異性の高いバリエーションである FokI-dCas9 型についても対応できるようにシステムを拡張し、これらを用いたゲノム編集の効率を、マウス個体を用いて検証した。

4. 研究成果

(1) マルチガイドベクターシステムの確立と培養細胞を用いた高度ゲノム編集の実践

7 つのガイド RNA と Cas9 ニュクレアーゼを同時に発現するベクターを HEK293T 細胞に導入し、7 箇所の遺伝子座の同時改変が可能であることを証明した。また、同ベクターを用いて、ゲノム領域の広域欠失が可能であることも示した。更に、ガイド RNA をペアで用いるダブルニッカーゼのシステムによって、3 箇所の同時改変および領域欠失が可能であることも証明された。

(2) マルチガイドベクターシステムの改良とマウス個体を用いた高度ゲノム編集の実践

FokI-dCas9 バージョンを加えた拡張版のシステムを用いて、マウスのインターロイキン 11 (IL11) 遺伝子座を標的としたベクター(ヌクレアーゼ型、ニッカーゼ型、FokI-dCas9 型)を作製し、マウス受精卵へ直接顕微注射することにより、いずれのベクターでもノックアウトマウスを作製可能であることを示した。また、特に良好な結果を示した FokI-dCas9 型については、2 箇所の遺伝子座 (Reg3b, Reg3g) を同時にターゲティング可能なベクターも構築し、マウスプラストシトでの変異解析を行った結果、ダブルノックアウトを効率的に実行可能であることが示された。

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 35 件)

1. Fujiwara M, Nagatomo A, Tsuda M, Obata S, Sakuma T, Yamamoto T and Suzuki ST. Desmocollin-2 alone forms functional desmosomal plaques, with the plaque formation requiring the juxtamembrane region and plakophilins. *J Biochem.* 査読有 in press (2015). doi: 10.1093/jb/mvv048
2. Hara S, Tamano M, Yamashita S, Kato T, Saito T, Sakuma T, Yamamoto T, Inui M and Takada S. Generation of mutant mice via the CRISPR/Cas9 system using FokI-dCas9. *Sci Rep.* 査読有 in press (2015).
3. Nakagawa Y, Sakuma T, Sakamoto T, Ohmuraya M, Nakagata N and Yamamoto T. Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed fertilized

- oocytes. *BMC Biotechnol.* 査読有 15: 33 (2015). doi: 10.1186/s12896-015-0144-x
4. Aida T, Chiyo K, Usami T, Ishikubo H, Imahashi R, Wada Y, Tanaka K, Sakuma T, Yamamoto T and Tanaka K. Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knockin in mice. *Genome Biol.* 査読有 16: 87 (2015). doi: 10.1186/s13059-015-0653-x
  5. Nakade S, Sakuma T, Sakane Y, Hara Y, Kurabayashi A, Kashiwagi K, Kashiwagi A, Yamamoto T and Obara M. Homeolog-specific targeted mutagenesis in *Xenopus laevis* using TALENs. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 査読有 in press (2015). doi: 10.1007/s11626-015-9912-0
  6. Kawai N, Ogura Y, Ikuta T, Saiga H, Hamada M, Sakuma T, Yamamoto T, Satoh N and Sasakura Y. Hox10-regulated endodermal cell migration is essential for development of the ascidian intestine. *Dev Biol.* 査読有 in press (2015). doi: 10.1016/j.ydbio.2015.03.018
  7. Ebina H, Kanemura Y, Misawa N, Sakuma T, Kobayashi T, Yamamoto T and Koyanagi Y. A high excision potential of TALENs for integrated DNA of HIV-based lentiviral vector. *PLoS One.* 査読有 10: e0120047 (2015). doi: 10.1371/journal.pone.0120047
  8. Hisano Y, Sakuma T, Nakade S, Ohga R, Ota S, Okamoto H, Yamamoto T and Kawahara A. Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Sci Rep.* 査読有 5: 8841 (2015). doi: 10.1038/srep08841
  9. Arazoe T, Ogawa T, Miyoshi K, Yamato T, Ohsato S, Sakuma T, Yamamoto T, Arie T and Kuwata S. Tailor-made TALEN system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnol Bioeng.* 査読有 112: 1335-1342 (2015). doi: 10.1002/bit.25559
  10. Miyamoto T, Hosoba K, Ochiai H, Royba E, Izumi H, Sakuma T, Yamamoto T, Dynlacht BD and Matsuura S. The microtubule depolymerizing activity of a mitotic kinesin protein KIF2A drives primary cilia disassembly coupled with cell proliferation. *Cell Rep.* 査読有 in press (2015). doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.003
  11. Choi J, Suzuki KT, Sakuma T, Shewade L, Yamamoto T and Buchholz DR. Unliganded thyroid hormone receptor alpha regulates developmental timing via gene repression as revealed by gene disruption in *Xenopus tropicalis*. *Endocrinology.* 査読有 156: 735-744 (2015). doi: 10.1210/en.2014-1554
  12. Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watabnabe A, Sakurai H, Yamamoto T, Yamanaka S and Hotta A. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports.* 査読有 4: 143-154 (2015). doi: 10.1016/j.stemcr.2014
  13. Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, Yamamoto T, Sakuma T and Suzuki K. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun.* 査読有 5: 5560 (2014). doi: 10.1038/ncomms6560
  14. Ochiai H, Sugawara T, Sakuma T and Yamamoto T. Stochastic promoter activation affects Nanog expression variability in mouse embryonic stem cells. *Sci Rep.* 査読有 4: 7125 (2014). doi: 10.1038/srep07125
  15. Hiruta C, Ogino Y, Sakuma T, Toyota K, Miyagawa S, Yamamoto T and Iguchi T. Targeted gene disruption by use of transcription activator-like effector nuclease (TALEN) in the water flea *Daphnia pulex*. *BMC Biotechnol.* 査読有 14: 95 (2014). doi: 10.1186/s12896-014-0095-7
  16. Kaneko T, Sakuma T, Yamamoto T and Mashimo T. Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Sci Rep.* 査読有 4: 6382 (2014). doi: 10.1038/srep06382
  17. Sawai S, Ohyama K, Yasumoto S, Seki H, Sakuma T, Yamamoto T, Takebayashi Y, Kojima M, Sakakibara H, Aoki T, Muranaka T, Saito K and Umemoto N. Sterol Side Chain Reductase 2 Is a Key Enzyme in the Biosynthesis of Cholesterol, the Common Precursor of Toxic Steroidal Glycoalkaloids in Potato. *Plant Cell.* 査読有 26: 3763-3774 (2014). doi: 10.1105/tpc.114.130096
  18. Kazuki Y, Yakura Y, Abe S, Osaki M, Kajitani N, Kazuki K, Takehara S, Honma K, Suemori H, Yamazaki S, Sakuma T, Toki T, Shimizu R, Nakauchi H,

- Yamamoto T and Oshimura M. Down syndrome-associated haematopoiesis abnormalities created by chromosome transfer and genome editing technologies. *Sci Rep*. 査読有 4: 6136 (2014). doi: 10.1038/srep06136
19. Ninagawa S, Okada T, Sumitomo Y, Kamiya Y, Kato K, Horimoto S, Ishikawa T, Takeda S, Sakuma T, Yamamoto T and Mori K. EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step. *J Cell Biol*. 査読有 206: 347-356 (2014). doi: 10.1083/jcb.201404075
  20. Nakagawa Y, Sakuma T, Nakagata N, Yamasaki S, Takeda N, Ohmuraya M and Yamamoto T. Application of oocyte cryopreservation technology in TALEN-mediated mouse genome editing. *Exp Anim*. 査読有 63: 349-355 (2014). doi: 10.1538/expanim.63.349
  21. Yasue A, Mitsui SN, Watanabe T, Sakuma T, Oyadomari S, Yamamoto T, Noji S, Mito T and Tanaka E. Highly efficient targeted mutagenesis in one-cell mouse embryos mediated by the TALEN and CRISPR/Cas systems. *Sci Rep*. 査読有 4: 5705 (2014). doi: 10.1038/srep05705
  22. Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K and Yamamoto T. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Sci Rep*. 査読有 4: 5400 (2014). doi: 10.1038/srep05400
  23. Yoshida K, Treen N, Hozumi A, Sakuma T, Yamamoto T and Sasakura Y. Germ cell mutations of the ascidian *Ciona intestinalis* with TALE nucleases. *Genesis*. 査読有 52: 431-439 (2014). doi: 10.1002/dvg.22770
  24. Tokumasu D, Sakuma T, Hayashi Y, Hosoi S, Hiyama E and Yamamoto T. FAST-id system for enrichment of cells with TALEN-induced mutations and large deletions. *Genes Cells*. 査読有 19: 419-431 (2014). doi: 10.1111/gtc.12142
  25. Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Kudo Y, Asami K, Ogawa A, Watanabe A, Kajii T, Yamamoto T and Matsuura S. TALEN-mediated single-base-pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 査読有 111: 1461-1466 (2014). doi: 10.1073/pnas.1317008111
  26. Treen N, Yoshida K, Sakuma T, Sasaki H, Kawai N, Yamamoto T and Sasakura Y. Tissue-specific and ubiquitous gene knockouts in *Ciona* by electroporating TALENs provide new approaches to investigate gene functions. *Development*. 査読有 141: 481-487 (2014). doi: 10.1242/dev.099572
  27. Sakuma T and Woltjen K. Nuclease-mediated genome editing: At the front-line of functional genomics technology. *Dev Growth Differ*. 査読有 56: 2-13 (2014). doi: 10.1111/dgd.12111
  28. Sugi T, Sakuma T, Ohtani T and Yamamoto T. Versatile strategy for isolating transcription activator-like effector nuclease-mediated knockout mutants in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Growth Differ*. 査読有 56: 78-85 (2014). doi: 10.1111/dgd.12108
  29. Sakane Y, Sakuma T, Kashiwagi K, Kashiwagi A, Yamamoto T and Suzuki K. Targeted mutagenesis of multiple and paralogous genes in *Xenopus laevis* using two pairs of transcription activator-like effector nucleases. *Dev Growth Differ*. 査読有 56: 108-114 (2014). doi: 10.1111/dgd.12105
  30. Hosoi S, Sakuma T, Sakamoto N and Yamamoto T. Targeted mutagenesis in sea urchin embryos using TALENs. *Dev Growth Differ*. 査読有 56: 92-97 (2014). doi: 10.1111/dgd.12099
  31. Hayashi T, Sakamoto K, Sakuma T, Yokotani N, Inoue T, Kawaguchi E, Agata K, Yamamoto T and Takeuchi T. Transcription activator-like effector nucleases efficiently disrupt the target gene in Iberian ribbed newts (*Pleurodeles waltl*), an experimental model animal for regeneration. *Dev Growth Differ*. 査読有 56: 115-121 (2014). doi: 10.1111/dgd.12103
  32. Kondo T, Sakuma T, Wada H, Akimoto A, Yamamoto T and Hayashi S. TALEN-induced gene knock out in *Drosophila*. *Dev Growth Differ*. 査読有 56: 86-91 (2014). doi: 10.1111/dgd.12097
  33. Nakagawa Y, Yamamoto T, Suzuki KI, Araki K, Takeda N, Ohmuraya M and Sakuma T. Screening methods to identify TALEN-mediated knockout mice. *Exp Anim*. 査読有 63: 79-84 (2014). doi: 10.1538/expanim.63.79
  34. Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, Suzuki K, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S and Yamamoto T. Repeating pattern of

non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Sci Rep*. 査読有 3: 3379 (2013). doi: 10.1038/srep03379

35. Kato T, Miyata K, Sonobe M, Yamashita S, Tamano M, Miura K, Kanai Y, Miyamoto S, Sakuma T, Yamamoto T, Inui M, Kikusui T, Asahara H, Takada S. Production of Sry knockout mouse using TALEN via oocyte injection. *Sci Rep*. 査読有 3: 3136 (2013). doi: 10.1038/srep03136

〔学会発表〕(計 107 件)

1. 佐久間哲史, Platinum TALEN およびマルチガイド CRISPR システムを用いたゲノム編集, ゲノム編集マウスワークショップ, 2015 年 3 月 17 日, つくば(理学研究所バイオリソースセンター)
2. 佐久間哲史, ゲノム編集の基礎と動物における利用の現状, 平成 26 年度日本実験動物技術者協会 関西支部 秋季広島大会, 2014 年 11 月 29 日-30 日, 広島(サテライトキャンパスひろしま)
3. Tetsushi Sakuma, Front-line of genome engineering technologies, The 27th Annual Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology, 2014 年 11 月 11 日-14 日, 北九州(北九州国際会議場)
4. 佐久間哲史, Platinum TALEN および CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集, 第 39 回日本比較内分泌学会大会, 2014 年 11 月 7 日-9 日, 岡崎(岡崎コンファレンスセンター)
5. 佐久間哲史, ゲノム編集の基礎と最新動向, 第 4 回ゲノム編集研究会, 2014 年 10 月 6 日-7 日, 広島(広島国際会議場)
6. Tetsushi Sakuma, Front-line of genome editing technology in various animals, 2014 KALAS Winter Symposium, 2014 年 2 月 20 日-21 日, Daegwalllyeong, South Korea
7. 佐久間哲史, 動物におけるゲノム編集技術の最前線, 第 31 回九州実験動物研究会総会, 2013 年 11 月 16 日, 熊本(八千代座)

他 100 件

〔図書〕(計 2 件)

1. Sakuma T, Yamamoto T 他 (Yamamoto T, ed.), Targeted Genome Editing Using Engineered Nucleases: ZFNs, TALENs, and the CRISPR/Cas9 System, Springer Japan, 205, 2015.
2. 佐久間哲史 他(山本卓 編), 実験医学別冊「今すぐ始めるゲノム編集」, 羊土社, 205, 2014.

〔産業財産権〕  
出願状況(計 1 件)

名称: 核酸挿入用ベクター  
発明者: 鈴木賢一、坂根祐人、佐久間哲史、山本卓  
権利者: 国立大学法人広島大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2013-230349  
出願年月日: 2013 年 11 月 6 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等  
広島大学 分子遺伝学研究室  
<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/sm/g/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐久間 哲史 (SAKUMA TETSUSHI)  
広島大学・大学院理学研究科・特任講師  
研究者番号: 9 0 7 1 1 1 4 3