

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460088

研究課題名(和文)人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集技術の開発

研究課題名(英文) development of genome-editing techniques using engineered nucleases

研究代表者

久野 悠 (Hisano, Yu)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：60467636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではゼブラフィッシュを用いたゲノム編集技術の開発を目指した。CRISPR/Cas9システムによってDNA二本鎖切断が引き起こされると細胞が持つ二種類の修復機構が働く。1つは非相同末端結合修復と呼ばれるもので、もう1つは相同組換え修復で、切断部位と相同配列を持つ鋳型を利用して修復するため外来遺伝子を挿入・置換することが可能である。比較的短い相同配列を導入したプラスミドを利用したところ、約80%の頻度で遺伝子挿入が生じており、そのうち60-70%という高頻度で相同配列を利用した正確な遺伝子挿入が行われていることを確認した。さらにこの外来遺伝子の挿入が次世代に引き継がれることを確認した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop new genome-editing techniques using engineered nucleases such as CRISPR/Cas9 system in zebrafish. CRISPR/Cas9 system causes DNA double strand breaks, which can be repaired by non-homologous end joining or homology directed recombination. We achieved to knock-in exogenous genes into target genomic locus using donor vector harboring short homologous sequences. The donor vector was designed to have gRNA-recognition sites, homology arms, and the exogenous gene to be integrated. By introducing two gRNA-recognition sites in both side of the integrating gene, backbone sequences of donor vector can be eliminated. Furthermore, the precise genome modification was also occurred in germ cells, resulting in the establishment of knocked-in zebrafish line. This method enables efficient and precise genome modification in a homology-dependent manner, which should be able to be applied to other model organisms

研究分野：脂質生化学

キーワード：人工ヌクレアーゼ 遺伝学 ゲノム編集 TALEN CRISPR/Cas9 system ゼブラフィッシュ ノックイン 逆

1. 研究開始当初の背景

これまでマウスがモデル生物としての地位を確立してきた背景には胚性幹(ES)細胞を用いたゲノム編集技術によるところが大きい。マウスでは生殖細胞へと分化可能なES細胞が樹立されているため、相同組換えによりゲノムを編集した個体を作製できる。これにより標的遺伝子を破壊した際の表現型を解析する逆遺伝学的解析手法が可能となり、多くの遺伝子の生理機能が解明されてきた。一方で世代時間や飼育コスト、ゲノムサイズ、観察の容易さなどから研究目的に適したマウス以外にも様々なモデル生物が利用されているが、マウス以外のモデル生物ではES細胞が樹立されておらず逆遺伝学的解析が困難であった。このような状況下で近年、ゲノムの標的部位にDNA二本鎖切断を引き起こす人工ヌクレアーゼが開発され大きく注目されている。

人工ヌクレアーゼとしてまずZFN (Zinc Finger Nuclease)が登場し、最近ではデザインの容易さからTALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)が広く利用されている。またCRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)/Cas9システムと呼ばれる新しいタイプのゲノム編集技術も登場し、その有用性の高さから急速に広がっている。人工ヌクレアーゼによってDNA二本鎖切断が引き起こされると、細胞が持つ二種類の修復機構が働く。1つは非相同末端結合修復と呼ばれるもので、切断末端が直接繋がる。この際に高頻度で数塩基の挿入及び欠損変異が生じるため、フレームシフトを誘導し標的遺伝子が破壊される。もう1つは相同組換え修復で、切断部位と相同配列を持つ鋳型を利用して修復するため外来遺伝子を挿入・置換することが可能である。人工ヌクレアーゼを利用したゲノム編集を行う場合、高いDNA二本鎖切断活性を持つ人工ヌクレアーゼを得ることが最も重要となってくる。申請者はこれまでに簡便で正確な*in vivo*での人工ヌクレアーゼの活性評価法を開発した。この方法は実際に生じた変異を選択的に確認できるという点においても優れた評価方法である。これにより、作製した人工ヌクレアーゼの活性を評価し、以降の解析に有用であるか素早く判断することを可能とし、人工ヌクレアーゼTALENを用いた遺伝子破壊生物の樹立を国内で初めて報告している。現在のところ、活性の高い人工ヌクレアーゼを作製できれば、遺伝子破壊生物の樹立は容易にできる段階にある。次に残された課題が標的部位特異的に外来DNAを挿入・置換する技術であり、本研究では最先端のゲノム編集技術を開発する。

2. 研究の目的

本研究では発生システムがヒトと高い相同性を有し、マウスと比較して費用対効果の

側面で優れているゼブラフィッシュを用いて、個体レベルでのゲノム編集を行う。研究期間内に以下の技術開発を目指す。

(1)数塩基置換による部位特異的変異導入

30-40塩基のオリゴDNAを鋳型とした正確な変異導入技術を開発する。これまでTILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes)と呼ばれる手法で標的遺伝子に点突然変異が生じた個体をスクリーニングしていたが、この手法では偶発的に生じた変異体しか得られず、目的とする変異を誘導することは困難であった。オリゴDNAを用いた相同組換えは数塩基を目的の塩基配列に置き換えられるため、機能分子の構造機能相関の解析にも有用な手法である。

(2)外来遺伝子の挿入

外来遺伝子をゲノム標的部位に挿入するためには、効率良く相同組換えを引き起こす必要がある。本技術によりCre-loxPシステムを用いたコンディショナル・ノックアウトが可能となる。特定のプロモーター下でCreリコンビナーゼを発現させる系統と標的遺伝子をloxP配列で挟んだ系統を掛け合わせることで、Creリコンビナーゼを発現する細胞でのみ標的遺伝子を破壊できる。また蛍光蛋白質と融合させることで生体内局在等の解析が可能となる。

またゼブラフィッシュは母体外で短い時間で発生し、初期胚が透明で観察が容易といった特徴を持つことから、遺伝学研究や発生生物学研究における有用なモデル脊椎動物として利用されている。特に順遺伝学的解析に適しており、化学変異原によりゲノムにランダムな変異を導入し形態形成に異常を示す変異体のスクリーニングが行われている。またゼブラフィッシュは胚を用いたハイスループットスクリーニングが可能のため、創薬分野においても重要なモデル脊椎動物として注目されている。マウスと同等のゲノム編集がゼブラフィッシュにおいて利用可能となれば、順遺伝学的解析手法及び逆遺伝学的解析手法を同一のモデル生物に適用できることになり、モデル生物としての重要性が更に増すものと期待される。そのためこれまでにゼブラフィッシュES細胞の樹立が試みられてきたものの成功していない。申請者は人工ヌクレアーゼを利用したゲノム改変ゼブラフィッシュの作製技術の開発を目指している。これにより部位特異的変異導入やコンディショナル・ノックアウト等が可能となり、逆遺伝学的解析を行う際のモデル生物の選択肢を広げ、興味ある遺伝子の生理機能解析をより効率的に行えるようになる。

またヒト疾患モデルゼブラフィッシュの利用価値も高い。ゼブラフィッシュの長所の1つである*in vivo*ケミカルスクリーニングを行う際、野生型のゼブラフィッシュを用いてヒトの標的分子に作用する化合物を探索すると、種差の違いによる候補化合物と標的

分子の親和性・特異性の問題を回避できない。そこでゼブラフィッシュの内因性遺伝子とヒト由来の標的遺伝子を置き換えることでこの問題を解決でき、飛躍的な創薬開発の効率化が見込まれる。

人工ヌクレアーゼは効率良く DNA 二本鎖切断を引き起こし、ES 細胞を必要としないため、様々なモデル生物及び細胞に利用可能である。つまり本研究課題で開発した技術を応用することで、ゼブラフィッシュ以外のこれまでゲノム編集が困難であったモデル生物に逆遺伝学的解析手法を持ち込むことができる。また疾患患者由来の iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells) において疾患の原因遺伝子を正常な遺伝子に置換するといった遺伝子治療の基礎技術にも発展する。このように本研究で扱う課題はゼブラフィッシュのゲノム編集のみに留まらず、生命科学及び再生医療の分野に対しても広く貢献するものである。

3. 研究の方法

(1)オリゴ DNA による部位特異的変異導入法の確立

数百塩基以上の外来 DNA を挿入する場合と比べて、短いオリゴ DNA を鋳型として用いた組換えは比較的高頻度で生じるものの、組換え時にエラーが生じてしまい正確性が非常に低いという知見を得ている。そこで正確なオリゴ DNA の組換えが生じる条件を確立するため、以下の条件を検討する。

TALEN や Cas9 ヌクレアーゼとオリゴ DNA の濃度

標的ゲノム配列との相同領域の長さ と DNA 二本鎖切断部位からの距離

オリゴ DNA の形態 (相補鎖、逆相補鎖、一本鎖、二本鎖、ゲノム相同配列のみ一本鎖)

(2)新規ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムの利用

申請者はこれまで人工ヌクレアーゼ TALEN を用いた遺伝子破壊ゼブラフィッシュの作製技術を開発してきた。その過程で簡便な人工ヌクレアーゼの活性評価法を開発し、これにより高活性の TALEN が得られている。この TALEN を用いて外来 DNA の挿入・置換技術の開発を進めていく。一方で新たなゲノム編集技術として CRISPR/Cas9 システムが近年登場した。このシステムでは guide RNA (gRNA) と呼ばれる短い一本鎖 RNA が標的配列を認識し、そこへヌクレアーゼである Cas9 ヌクレアーゼが複合体を形成することで DNA 二本鎖切断を引き起こす。TALEN では 2 つの DNA 結合ドメインに挟まれたスペーサー領域に二本鎖切断が生じるため、DNA 二本鎖切断後も TALEN が認識配列部位に留まり、相同組換え修復に関わる分子複合体の形成を空間的に阻害している可能性もある。CRISPR/Cas9 システムでは gRNA による認識配列内に DNA 二本鎖切断が生じるため、二本鎖切断後は gRNA

と認識配列は結合できなくなる。そこで TALEN に加えて CRISPR/Cas9 システムについても検討する。

(3) 外来遺伝子の挿入技術開発 (ノックイン法)

数百塩基以上の長い外来 DNA をゲノムに挿入する場合、その効率の低さが問題となっている。外来 DNA の挿入には二本鎖切断後の修復機構として相同組換え修復を利用する。しかし非相同末端結合修復活性が常に高い状態であるのに対して、相同組換え修復は DNA 複製中など限られた細胞周期でのみ活性化されていることが組換え効率の低さの原因になっていると考えられる。そこで阻害剤やアンチセンスモルフォリノオリゴ (MO) を用いて非相同末端結合修復の阻害し、相同組換え修復の活性化を誘導することで、非相同末端結合修復に対して相同組換え修復が優位に働く環境を作り出すことで組換え効率を高める。

4. 研究成果

TALEN に続いて登場した新規ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムがゼブラフィッシュにおいても機能するのか評価した。これまでに TALEN による二本鎖切断活性を評価する系として HMA (heteroduplex mobility assay) を利用した手法を確立している。そこで *fh1* 及び *spns2* 遺伝子を標的とする gRNA をデザインし、ゼブラフィッシュ胚に Cas9 mRNA と共にインジェクションを行ったところ、二本鎖切断に起因するヘテロ二本鎖を確認した (図 1)。実際にゲノム標的部位を PCR 増幅しサブクローニング後、シーケンシングにより変異を調べたところ、*spns2* 遺伝子に対する gRNA ではおよそ 70% の頻度で変異が生じていた。これは高活性の TALEN と同程度の高活性である。

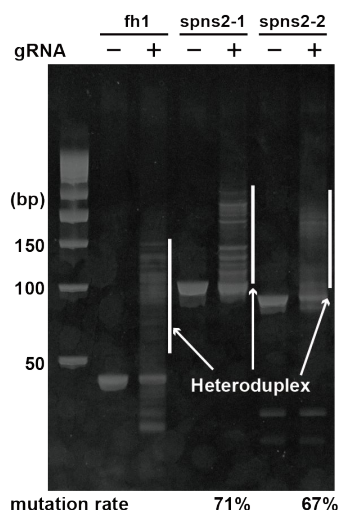
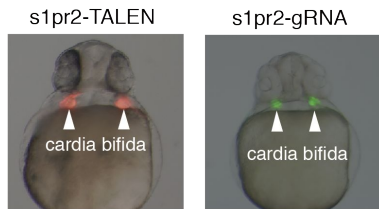


図 1 . HMA による二本鎖切断活性の測定

また脂質メディエーターであるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) の受容体の一つである S1PR2 はゼブラフィッシュの心臓前駆細胞の

移動を制御しており、*s1pr2* 変異体は心臓が二つ形成される *cardia bifida* と呼ばれる表現型を示す。*s1pr2* を標的とする TALEN だけでなく、同遺伝子を標的とする gRNA によっても *cardia bifida* が見られており、インジェクションを行った F0 胚において標的遺伝



子の機能破壊が引き起こせることを示した(図2)。

図2. 心筋細胞特異的に RFP もしくは GFP を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ胚に TALEN もしくは gRNA をインジェクションし、*s1pr2* 遺伝子破壊を引き起こした

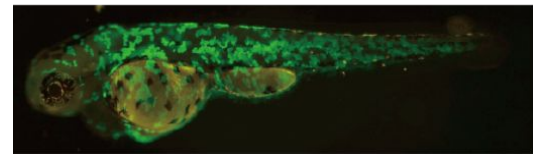
外来遺伝子を標的部位に挿入する過程として、1) 非相同末端結合修復によるゲノムの切断末端と外来遺伝子断片の結合、2) 相同配列を利用した外来遺伝子の挿入がある。非相同末端結合修復は遺伝子破壊の際にも利用されているように非常に高頻度で数塩基の欠損・挿入を伴うため、蛍光蛋白質を内因性遺伝子との融合蛋白質として発現させるようなゲノムと外来 DNA の繋ぎ目を正確にデザインすることが困難である。また相同配列を利用する場合は数十塩基ほどの短い配列を利用するマイクロホモロジー媒介末端結合と比較的長い相同配列を利用する相同組換え修復機構があり、後者は一般的に低頻度である。そこでマイクロホモロジー媒介末端結合を利用した外来遺伝子のノックイン技術の確立を目指した。

まず予備的な研究により高活性の gRNA 変えられていたため、tyrosinase を標的遺伝子として、この gRNA 標的部位への外来遺伝子の挿入を試みた。遺伝子挿入を行う場合は、Cas9 mRNA 及び gRNA に加えて、鑄型となる挿入 DNA を同時にインジェクションする必要がある。両端に相同配列を持つ DNA 断片をインジェクションした際には外来遺伝子由来の DNA 配列がゲノム標的部位への挿入は低頻度で確認されたが、解析した全てのクローンにおいて結合部位に変異が生じていた。そこで鑄型 DNA としてプラスミドをインジェクションし、CRISPR/Cas9 システムによってゲノム標的部位と同時に鑄型 DNA プラスミドも切断され、DNA 断片が形成されるようにした。これにより細胞内に発現する内因性のエキソヌクレアーゼによる DNA 消化を抑えられると考えられる。相同配列を持たないプラスミドでは約 50%の頻度で日相同末端結合により遺伝子挿入が生じていた。一方で、10bp から 40bp の比較的短い相同配列を導入したプラスミドでは約 80%と挿入頻度が上昇し、そのうち 60-70%という高頻度で相同配列を利用

した正確な遺伝子挿入が行われていた。

このマイクロホモロジー媒介末端結合による正確な遺伝子挿入を利用し、内因性遺伝子と外来遺伝子の融合タンパク質を作成するため、体表に発現するケラチン遺伝子である *krtt1c19e* をゲノム標的遺伝子とし、この遺伝子の終始コドン付近を標的とする gRNA をデザインした。外来挿入遺伝子として eGFP の上流及び下流に相同配列、さらにその外側に gRNA による切断部位を持つプラスミドをデザインした。これにより、鑄型プラスミドのバックボーンとなる DNA 配列はゲノムに挿入されず、必要な配列のみを挿入することが可能である。またプラスミドから直接 eGFP の発現が誘導されないように、プラスミド上のプロモーター配列は削除した。この鑄型プラスミドを *krtt1c19e* gRNA 及び Cas9 mRNA と共にゼブラフィッシュ受精卵にインジェクションを行ったところ、体表面にまだらに eGFP を発現する個体を得られた(図3)。また DNA シークエンス解析により、ゲノム DNA と外来 DNA の結合部位が相同配列を利用した正確なノックインであることを確認した。

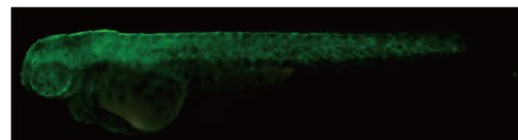
図3. *krtt1c19e* gRNA、Cas9 mRNA、鑄型 DNA



をインジェクションした F₀ ゼブラフィッシュ

をインジェクションした F₀ ゼブラフィッシュ胚の内、eGFP の体表面への発現は見られないものやごく一部に限られているものもあったが、図3に示すような広範囲に eGFP の発現が認められる稚魚を成魚へと育て、野生型ゼブラフィッシュと掛け合わせた。その F₁ ゼブラフィッシュ胚では *Krtt1c19e* が発現する体表面全体に eGFP の発現が見られた(図4)。また DNA シークエンス解析により、遺伝子レベルでも遺伝子挿入を確認している。つまりゲノム編集技術によって挿入した外来遺伝子が生殖細胞においても生じており、それが次世代へと引き継がれたことを示している。

図4. F₁ 世代における eGFP の発現



本研究では代表的なモデル生物としてゼブラフィッシュを用いて遺伝子挿入技術の開発を行い、効果的なゲノム編集技術を確立した。本手法は哺乳類細胞や他のモデル生物にも応用可能であり、広く利用されることが期待される。

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8件)

Atsuo Kawahara, Yu Hisano, Satoshi Ota, Kiyohito Taimatsu, Site-Specific Integration of Exogenous Genes Using Genome Editing Technologies in Zebrafish, *International Journal of Molecular Sciences*, 査読有, 2016 May 13; 17(5). pii: E727.
doi: 10.3390/ijms17050727.

Yu Hisano, Asuka Inoue, Kiyohito Taimatsu, Satoshi Ota, Rie Ohga, Hirohito Kotani, Michiko Muraki, Junken Aoki, Atsuo Kawahara, Comprehensive analysis of sphingosine-1-phosphate receptor mutants during zebrafish embryogenesis, *Genes to Cells*, 査読有, 2015 Aug;20(8):647-58.
doi: 10.1111/gtc.12259.

Yu Hisano, Asuka Inoue, Michiyo Okudaira, Kiyohito Taimatsu, Hirotaka Matsumoto, Hirohito Kotani, Rie Ohga, Junken Aoki, Atsuo Kawahara, Maternal and Zygotic Sphingosine Kinase 2 Are Indispensable for Cardiac Development in Zebrafish, *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 2015 Jun 12;290(24): 14841-51.
doi: 10.1074/jbc.M114.634717.

Yu Hisano, Tetsushi Sakuma, Shota Nakade, Rie Ohga, Satoshi Ota, Hitoshi Okamoto, Takashi Yamamoto, Atsuo Kawahara, Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish, *Scientific Reports*, 査読有, 2015 Mar 5;5:8841.
doi: 10.1038/srep08841.

Yukiko Kimura, Yu Hisano, Atsuo Kawahara, Shin-ichi Higashijima, Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/ driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering, *Scientific Reports*, 査読有, 2014 Oct 8;4:6545.
doi: 10.1038/srep06545.

Satoshi Ota, Yu Hisano, Yoshiya Ikawa, Atsuo Kawahara, Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish, *Genes to Cells*, 査読有, 2014 Jul;19(7):555-64.
doi: 10.1111/gtc.12154.

Yu Hisano, Satoshi Ota, Atsuo Kawahara,

Genome editing using artificial site-specific nucleases in zebrafish, *Development, Growth & Differentiation*, 査読有, 2014 Jan;56(1):26-33.
doi: 10.1111/dgd.12094.

Tsuyoshi Nishi, Naoki Kobayashi, Yu Hisano, Atsuo Kawahara, Akihito Yamaguchi, Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 査読有, 2014 May;1841(5): 759-65.
doi: 10.1016/j.bbalip.2013.07.012.

[学会発表](計6件)

Yu Hisano, Spatial proteomics analysis for identifying sphingosine 1-phosphate receptor-associated proteins on endothelial cells, 19th International Vascular Biology Meeting, 2016年10月30日-11月3日、ボストン

Yu Hisano, S1P₁-associated proteins and possible relationship to sensing fluid shear stress on endothelial cells, North American Vascular Biology Organization 2015, 2015年10月18日-22日、ケープコッド

久野 悠, "CRISPR/Cas9 system を利用したノックイン法"の開発、第六回 膜輸送体研究会、2014年12月26日-28日、富良野(新富良野プリンスホテル)

Yu Hisano, Exogenous DNA integration into zebrafish genome without indel mutations at the junctions, The 3rd "International Institute for Advanced Studies" Conference of Novel Developments on the Study of Life and Biological Systems Based on Genome Engineering and Imaging Science, 2014年10月28日-29日、木津川市(国際高等研究所)

久野 悠, CRISPR/Cas9 システムを用いた精巧な遺伝子導入技術の開発、第4回 ゲノム編集研究会、2014年10月6日-7日、広島(広島国際会議場ダリア)

Yu Hisano, Precise genome-editing using CRISPR/Cas9 system, 20th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2014年9月20日-21日、東京(慶應義塾大学薬学部(芝共立キャンパス))

[図書](計4件)

西毅, 久野悠, 小林直木, 山口明人, 羊土社, 実験医学「新しい創薬標的としての脂質メディエーター分泌輸送体」2016年、139、

(2356-2361)

Yu Hisano, Tsuyoshi Nishi, Atsuo Kawahara, Springer 「Bioactive Lipid Mediators Current Reviews and Protocols」 2015年、424、Chapter 15 (207-220)

木下政人、安齋賢、久野悠、川原敦雄、羊土社、実験医学別冊「今すぐ始めるゲノム編集」2014年、207、205(169-179)

久野悠、川原敦雄、医歯薬出版株式会社、医学のあゆみ「生命を支える脂質 最新の研究と臨床」2014年、300、284(1014-1018)

6. 研究組織

(1)研究代表者

久野 悠 (HISANO, Yu)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：60467636

(2)連携研究者

川原 敦雄 (KAWAHARA, Atsuo)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：10362518

(3)小林琢磨 (KOBAYASHI, Takuma)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・研究員

研究者番号：80582288