

課題名	ゲノム編集技術を用いた効率的遺伝子ノックイン系統作製システムの開発
課題管理者	山本 卓 国立大学法人広島大学 理学研究科数理分子生命理学専攻
実施期間	2016 年度
概要・実施体制	<p>バイオリソース事業におけるゲノム編集技術の開発や普及には、我々ゲノム編集研究コミュニティと、リソースユーザーならびに NBRP 中核機関の三者連携による組織的な取り組みが必要不可欠である。当申請課題の目標は、申請者らが開発した新規ノックイン(KI)技術である PITCh 法や 2H2OP 法を、ドナーベクターの改良やリコンビナント Cas9 タンパク質の使用により最適化し、ネッタイツメガエル・ラット・ゼブラフィッシュにおける KI プロトコルの確立を目指すことであった。代表機関である広島大学が中心となり分担機関の大阪大学、山梨大学と連携して、申請者らが開発した KI 技術(PITCh 法および 2H2OP 法)を用いてラット、ネッタイツメガエル、ゼブラフィッシュの標的遺伝子座への KI を行い、プロトコル化に向けた実験条件の検討を行った。その結果、KI 法の最適化に向けた条件検討と技術プロトコルの整備という目的が達成された。本事業により検討された技術プロトコルが、様々なリソースにおいて KI 技術を基盤とした生命科学的研究、特に疾患モデル動物研究の発展の後押しとなることが期待出来る。</p>
成果	<p>【概要】</p> <p>標的遺伝子の破壊（ノックアウト(KO)）は、CRISPR-Cas9 の急速な普及によって様々な生物種において実施可能となり、既にリソース作製の基盤技術となっている。一方、標的遺伝子座へ自在に外来遺伝子をノックインした個体を作製する技術は、多様なリソース作製においては必須であるものの、ゲノム編集と相同組換え(HR)を利用した方法では効率などの点で十分ではない状況にある。そのため、独自の技術を利用したノックイン(KI)効率の向上とモザイク性の低減、安全な技術の開発と適用が急務である。本課題では、広島大学の開発したマイクロホモロジー媒介性末端結合(MMEJ)を利用した遺伝子 KI 法（PITCh 法）と、大阪大学が開発した一本鎖 DNA を‘のり’として用いた遺伝子 KI 法（2H2OP 法）を基盤として、外来遺伝子を挿入する KI 法の最適化を行い、NBRP において必要とされる遺伝子 KI 系統の効率的な作出システムを開発することを目的とした。</p> <p>代表機関の広島大学が大阪大学および山梨大学と連携して、上記の新規の遺伝子 KI 法を用いてラット、ネッタイツメガエル、ゼブラフィッシュでの標的遺伝子座への遺伝子 KI をそれぞれの NBRP 中核機関と連携して実施し、高効率での KI およびモザイク性の低減、オフターゲットを低減する方法の開発検討を行った。ネッタイツメガエル：リコンビナント Cas9 タンパク質を用いた PITCh 法の検討を行った。KI 胚のセレクションを簡便にするため、眼で赤色蛍光タンパク質が発現するマーカーを含むトラップ型ドナーベクターを開発した。ヒト疾患関連遺伝子 cDNA をツメガエルのオルソログ領域のイントロンに KI し、ファウンダー(F0)胚をレポーター活性でセレクションした。得られたレポーター陽性胚をジェノタイピング解析した結果、標的領域への MMEJ を介した KI が確認された。F0 胚においてヒト疾患遺伝子 cDNA 由来の mRNA が RT-PCR 法により検出されたことから、この KI 法がネッタイツメガエルにとって有用であることが示された。ラット：2H2OP 法および PITCh 法の最適化、および最適化 KI 法によるヒト疾患モデルとしての KI ラットの作製を行った。分担機関が開発した 2H2OP 法は、ベクターに相同配列の付加が不要で、大きなサイズの BAC ベクター等の KI が可能である一方で、つなぎ目の正確性やモザイク頻度、オフターゲットの影響などについては、不明な点が多い。本研究では、①2H2OP 法および PITCh 法による KI 技術の最適化とオフターゲット解析、②リコンビナント Cas9 タンパク質の検討、③ヒト疾患モデルとして使用可能な遺伝子改変ラットの作製を試みた。ゼブラフィッシュ：ヒートショックタンパク質プロモーター領域(hsp)と緑色蛍光タンパク質(eGFP)遺伝子を接続したレポーター遺伝子(hsp-eGFP)を標的遺伝子の開始コドン付近に挿入する新しい解析法を開発した。pax2a は、中脳後脳境界部(MHB)に発現する転写因子であり、その KO は、MHB の欠損を誘導する。我々は、レポーター遺伝子を pax2a 部位に挿入したヘテロ接合体において、eGFP が MHB で観察されることおよび HMB が正常に形成されることを見出した(標的遺伝子の動態解析が可能と考えられた)。一方、そのホモ接合体は、MHB の欠損が認められたことから、KO に依存した機能解析を遂行できると考えられた。さらに、上記のレポーター遺伝子は、非同末端結合(NHEJ)及び MMEJ で標的ゲノム部位に挿入できることを明らかにした。</p> <p>【学会誌・雑誌等における論文一覧】</p> <ol style="list-style-type: none"> 山本卓 編、ゲノム編集入門-ZFN・TALEN・CRISPR-Cas9-、裳華房、2016 年 鈴木賢一、両生類でのゲノム編集の利用(第 7 章)、ゲノム編集入門-ZFN・TALEN・CRISPR-Cas9-、

山本卓 編、裳華房、2016 年、P113-135

3. 真下知士、山本卓、監修、実験医学増刊号 All About ゲノム編集、羊土社、2016 年、Vol.34 No.20
4. 鈴木賢一、両生類でのゲノム編集、実験医学増刊号 All About ゲノム編集、真下知士、山本卓、監修、羊土社、2016 年、Vol.34 No.20、p98-103
5. Yuto Sakane, Ken-ichi T Suzuki, Takashi Yamamoto. A Simple Protocol for Loss-of-Function Analysis in *Xenopus tropicalis* founders using the CRISPR-Cas System. Methods Mol Biol, in press.

【学会・シンポジウム等における口頭・ポスター】

1. 坂根祐人, 山本卓, 鈴木賢一, 口頭, A Simple Protocol for Loss-of-Function Analysis in *Xenopus tropicalis* founders using the CRISPR-Cas System, 第 10 回日本ツメガエル研究集会, 2016. 11, 沖縄 (口頭)
2. 鈴木賢一, 口頭, ツメガエルのポストゲノム研究, シンポジウム: ツメガエルが教えてくれること: 過去, 現在, そして未来へ 日本動物学会第 87 回大会, 2016.11.17, 沖縄 (口頭)
3. 重田美津紀, 坂根祐人, 飯田緑, 鈴木美有紀, 柏木啓子, 柏木明彦, 藤井聡, 山本卓, 鈴木賢一, An efficient workflow for gene knockout using CRISPR-Cas9 in *Xenopus tropicalis* founders. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016.12.2, 横浜 (ポスター)
4. Yuto Sakane, Mitsuki Shigeta, Miyuki Suzuki, Keiko Kashiwagi Akihiko Kashiwagi, Takashi Yamamoto, Ken-ichi T Suzuki., Rapid functional analysis of disease-related genes using cloning-free CRISPR-Cas9 system in *Xenopus tropicalis*. The 8th Aquatic Animal Models of Human Disease Conference, January 7-12, 2017, Birmingham, ALABAMA. (ポスター)
5. Mitsuki Shigeta, Yuto Sakane, Miyuki Suzuki, Keiko Kashiwagi Akihiko Kashiwagi, Takashi Yamamoto, Ken-ichi T Suzuki., A streamlined workflow for rapid and efficient gene disruption by CRISPR-Cas9 in *Xenopus tropicalis* founders. Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists. March 15-18, 2017, Kiel, Germany. (ポスター)