

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) ゲノム編集効率向上の為の細胞環境とゲノム編集ベクター改良のトータルパッケージ開発
(英語) Total package development of appropriate inner-cell environmental and vector improvement for the efficient genome editing

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学蛋白質研究所 准教授 篠原美紀
所属 役職 氏名： (英語) Miki SHINOHARA, Associate Professor, Institute for Protein Research, Osaka University

実施期間： 平成28年11月5日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) マウスを用いた組織特異的 CRISPR/Cas9 発現系の構築
開発課題名： (英語) Construction of tissue-specific expression system of CRISPR/Cas9 in mice

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学蛋白質研究所 助教・松寄健一郎
所属 役職 氏名： (英語) Kenichiro MATSUZAKI, Assistant Professor, Institute for Protein Research, Osaka University

分担研究 (日本語) 不正確な末端結合上昇のための細胞環境の提供方法の検討
開発課題名： (英語) Studies for providing an inner-cellular environment to activate imprecise end joining pathway

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学蛋白質研究所 特任助教・寺澤匡博 (平成29年1月末まで)
所属 役職 氏名： (英語) Masahiro TERASAWA, Specially Appointed Assistant Professor, Institute for Protein Research, Osaka University

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 和文

松寄健一郎助教（大阪大学蛋白質研究所）および寺澤匡博特任助教（大阪大学蛋白質研究所）と共に、非相同末端結合(NHEJ)に欠損を示す遺伝子変異あるいは分裂時細胞、また DNA 損傷応答経路の活性阻害条件下においてゲノム編集効率およびその IN/DEL による導入変異が対照群とは異なり、より広範囲の欠失・挿入配列を伴うことを明らかにした。

手法としては、我々が独自開発したヒト細胞内における CRISPR/Cas9 によるゲノム編集効率のアッセイ系を用いて、ゲノム編集効率とそのゲノム編集の質について、さまざまな細胞内条件下において遺伝子解析から評価を行った。まず、遺伝的背景を HCT116 細胞株に統一したヒト培養細胞変異株の中から、DNA 二重鎖切断修復経路である非相同末端結合(NHEJ)に関わる遺伝子を破壊した株、あるいは相同組換え(HR)に関わる遺伝子を破壊した細胞株を用いて解析を行い、比較検討を行った。その結果、非相同末端結合に欠損を持つ変異細胞株ではゲノム編集によって得られた細胞株のほとんどで親株である HCT116 細胞では見られない、大きな欠失を伴うゲノム編集が高頻度で起きていることを明らかにした。このことは正確な NHEJ が機能しない細胞条件下では、CRISPR/Cas9 によりゲノムの目的部位に導入された DNA 二重鎖切断末端が修復されず、ヌクレアーゼにより単鎖化された DSB 末端が蓄積することで、より大きな変異を伴うゲノム編集に効率よく利用されていることを示唆している。一方で、相同組換えに欠損をもつ変異細胞株では、ゲノム編集効率、その産物の質とも親株との間で有為差は見られず、相同組換え欠損によってもたらされる DSB 単鎖末端はゲノム編集効率に影響を与えないことを明らかにした。さらに、我々の以前の研究結果(Terasawa, M., *PLoS Genetics*, 2014)から、分裂期細胞では正確な NHEJ 活性が低下することを見出しており、その分子メカニズムについてもすでに明らかにしている。そこで、ヒト培養細胞において分裂期特異的に CRISPR/Cas9 を機能させ、そのゲノム編集効率について解析を行ったところ、より大きな欠失を伴う変異がゲノム上の目的部位に導入されることを見出した。本結果は、NHEJ 因子の外的要因による抑制が細胞内のゲノム編集効率の向上に寄与することを示している。

一方で、酵母を用いた我々の先行研究(Iwasaki, D. *et al.*, *PLoS Genetics*, 2016, Seeber, A. *et al.*, *Mol Cell*, 2016)から DNA 損傷応答シグナル経路を阻害した場合にも、修復の経路選択が不正になることでゲノム編集効率に影響を与える可能性があることを示す結果が得られている。そこでヒト細胞において、DNA 損傷応答シグナル経路の活性化を阻害剤によって部分的に低下させた条件でゲノム編集効率とその質について解析を行ったところ、ゲノム編集効率の頻度は対照軍と比較して阻害の程度に比例して低下するものの、編集部位に不特定の DNA 断片を挿入した産物が多く観察されることを明らかにした。

これらの結果は、ゲノム編集に様々な特性を付与する細胞環境を人工的に作り出すことができることを示しており、今後はこれらの細胞環境を外的要因によって制御する方法の探索が必要である。

英文

I, in cooperation with my colleagues, Dr. Kenichiro Matsuzaki (Research Assistant of Institute for Protein Research, Osaka University) and Dr. Masahito Terasawa (Specially Appointed Assistant Professor of Institute for Protein Research, Osaka University), elucidated that genome editing is carried out with larger deletions or insertions in human cells which are defective in

non-homologous end joining (NHEJ), under inactivation of DNA damage response pathway, or in mitotic phase.

For this fiscal year project, we analyzed the efficiency and quality of genome editing at objective gene loci by using a unique assay system in human cells under various mutation backgrounds or several conditions, which are known to influence DNA damage repair systems. First, we decided to carry out this analysis in the uniformed cell background, HCT116 and its derivatives. We prepared null mutant cells which have a defect in each DNA double-strand break repair pathway; non-homologous end joining (NHEJ) or homologous recombination (HR). Then, in the mutant cell line defective in the NHEJ pathway, we observed high frequency of genome rearrangements associated with larger deletions or insertions at targeted junctions in the recovered cells after gene editing compared to that in the parental cell line. This suggests that a defect in the accurate NHEJ pathway causes accumulation of processed DSB ends at the target site which would be produced through nuclease activity, and then contribute to induce larger genome rearrangements. On the other hand, in the mutant cells with a defect in the HR pathway, there were no distinguishable differences in the efficiency or quality of genome editing compared to that in the parental cell line. This indicates that the accumulation of single-stranded DSB ends caused by defective HR reaction would not be useful for a gene editing reaction. In addition, our previous studies (Terasawa, M., *PLoS Genetics*, 2014) revealed that accurate NHEJ reaction is suppressed during mitosis in human cells, and the molecular mechanism of suppression is already known. Then, we analyzed gene editing in mitosis by expressing CRISPR/Cas9 specifically in the mitotic cells, and we observed genomic rearrangements associated with larger deletions at the objective gene loci. From these, it would be possible to promote genome editing by repression of accurate NHEJ and/or enhancement of imprecise NHEJ through external factors.

Moreover, from our previous studies in yeast (Iwasaki, D. *et al.*, *PLoS Genetics*, 2016, Seeber, A. *et al.*, *Mol Cell*, 2016), it is shown that inhibition of DNA damage response pathway also can promote genome editing through the increase of imprecise repair of DSBs. Next, we analyzed gene editing in the cell under partial inactivation of DNA damage response pathway by the addition of inhibitors in human cells. We observed that gene rearrangements which are associated with various insertions of unspecified DNA sequences, but the frequency of gene editing was slightly reduced than that in non-treated control in dose-dependent manner.

Overall, our result indicates that we can characterize genome arrangements through the CRISPR/Cas9 system through the inner-cellular environments that are made artificially by some external factors. We need to look for the concrete way to control the environment as the next step.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 1件）

1. Seeber A., A. M. Hegnauer, N. Hustedt, I. Deshpande, J. Poli, J. Eglinger, P. Pasero, H. Gut, **M. Shinohara**, K-P. Hopfner, K. Shimada, S. M. Gasser, *RPA mediates recruitment of MRX to forks and double-strand breaks to hold sister chromatids together. Mol Cell*, **64**, 951-966 (2016)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. **Shinohara, M.**, Eviction of Ku from single-stranded DSB ends through Tel1/ATM activity is essential to ensure NHEJ fidelity., The 10th International 3R Symposium, 2016.11.15, Matsue, 口頭発表, 国際シンポジウム.
2. **篠原美紀**, “Eviction of Ku from single-stranded DSB ends through Tel1/ATM activity is essential to ensure NHEJ fidelity.” 第39回日本分子生物学会年会 シンポジウム「遺伝情報の維持と進化のトレードオフ」, 2016.11.30-12.2, パシフィコ横浜, 口頭発表, 国内学会シンポジウム.
3. **篠原美紀**, 孫筱丁, 谷郷花圭, 不正確な DNA 二重鎖切断修復経路の抑制メカニズム, 第34回染色体WS 第15回核ダイナミクス研究会, 2017.1.11, かずさアカデミアホール, 口頭発表, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. ヒト細胞におけるゲノム安定化の仕組み, **篠原美紀**, 福井大学生命医科学フューチャーグローバルサイエンティスト育成プログラム, 実験講座・講義・ラウンドテーブルディスカッション, 2016.12.23-24, 大阪大学蛋白質研究所, 国内.
2. うま味を科学的に見よう!, **篠原美紀** [他学生 TA3名], 豊中市サイエンスフェスティバル, 実験講座, 2017.1.28, 豊中市教育センター, 国内.
3. JST 女子中高生理系進路選択支援事業「第11回女子中高生のための関西科学塾」, メンター 研究発表指導, 2017.3.25-26, 大阪大学 MO ホール他, 国内.

(4) 特許出願

該当なし