

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) ナショナルバイオリソースプロジェクト
(英語) National Bioresource Project

補助事業課題名： (日本語) ゲノム編集技術を用いた効率的遺伝子ノックインシステムの開発
(英語) Development of easy protocols for efficient gene knock-in using
genome editing technology

補助事業担当者 (日本語) 国立大学法人広島大学 大学院理学研究科 教授 山本 卓
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Science, Hiroshima University,
Professor, Takashi Yamamoto

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) ラットにおける 2H2OP 法の最適化とヒト疾患モデルとしての遺伝子改変動物の作製

分担課題名： (英語) Establishment of 2H2OP methods in rats and generation of genetically
modified animals as human disease models

補助事業分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 医学系研究科 准教授 真下 知士
所属 役職 氏名： (英語) Osaka University Graduate School of Medicine, Associate Professor,
Tomoji Mashimo

分担研究 (日本語) ゲノム編集技術を用いた効率的遺伝子ノックインシステムの開発
分担課題名： (英語) Development of efficient targeted knock-in system using genome
editing technologies

補助事業分担者 (日本語) 山梨大学大学院総合研究部 医学教育センター・教授・川原敦雄
所属 役職 氏名： (英語) Center for Medical Education and Sciences, Graduate School of Medical
Science, University of Yamanashi・Professor・Atsuo Kawahara

II. 成果の概要 (総括成果報告)

(日本語)

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。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(FO)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。FO 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、非相同末端結合 (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。

(英語)

Gene knock-in strategies, which can precisely insert a desired modification into any target site in a genome, are extremely powerful to create specific mutant lines. However, current knock-in protocols are unsatisfactory because they are inefficient and highly laborious. In this study, we developed simple protocols for efficient gene knock-in, which can be applied to various model organisms using two techniques: precise integration into target chromosome (PITCh) system based on microhomology-mediated end joining repair, and a two-hit two-oligo (2H2OP) system using single-stranded oligonucleotides as ‘paste’. We optimized these two techniques to increase knock-in efficiency and reduce mosaicism and off-target effects in three model animals, rat (*Rattus norvegicus*), frog (*Xenopus tropicalis*), and zebrafish (*Danio rerio*). In *X. tropicalis*, we optimized the PITCh protocol for precise gene knock-in using recombinant CRISPR-associated protein 9 (Cas9) to improve its efficiency. We also developed a trap vector containing a red fluorescent protein reporter driven by the crystallin

promoter to easily screen knock-in founders. Using this protocol, we knocked in a human disease gene cDNA. Precise knock-in of the new trap vector into a target site was confirmed by genotyping. Moreover, mRNA expression of this human cDNA was detected by RT-PCR. These results demonstrate that the improved PITCh protocol is useful for gene knock-in in *X. tropicalis*. In *R. norvegicus*, although 2H2OP can knock-in a large DNA fragment such as a bacterial artificial chromosome vector requiring no homology sequences in the donor vector, there is room for improvement including precision of the junction sequence, mosaicism, and random integration. Therefore, we optimized 2H2OP and PITCh in *R. norvegicus* to address these issues. We examined the efficiency of recombinant Cas9 in these protocols and analyzed off-target effects. Then, we generated human-disease model rats using these improved protocols. In *D. rerio*, we developed a novel knock-in method that employed a reporter gene consisting of the heat shock protein promoter (hsp) and enhanced green fluorescent protein (eGFP) gene integrated around the ATG codon of the targeted gene. *pax2a* (*Paired box gene 2a*) encodes a transcription factor expressed in the midbrain-hindbrain boundary (MHB), and its disruption leads to loss of the MHB. We found eGFP expression at the MHB, and that the MHB was formed normally in heterozygous embryos, whereas loss of the MHB was observed in homozygous embryos. These results suggest that this method is useful to investigate both gene expression profiles and loss-of-function phenotypes. We also found that the hsp-eGFP reporter could be integrated at targeted sites by non-homologous and microhomology-mediated end joinings.

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 4 件、国際誌 1 件）
1. 山本卓 編、ゲノム編集入門－ZFN・TALEN・CRISPR-Cas9－、裳華房、2016 年
 2. 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.
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
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
 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
 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, ポスター, 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
 4. Yuto Sakane, Mitsuki Shigeta, Miyuki Suzuki, Keiko Kashiwagi Akihiko Kashiwagi, Takashi

Yamamoto, Ken-ichi T Suzuki. ポスター, 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.

5. Mitsuki Shigeta, Yuto Sakane, Miyuki Suzuki, Keiko Kashiwagi Akihiko Kashiwagi, Takashi Yamamoto, Ken-ichi T Suzuki. ポスター, 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.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) ナショナルバイオリソースプロジェクト
(英語) National Bioresource Project

補助事業課題名 : (日本語) 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
(英語) Development of easy protocols for efficient gene knock-in using genome editing technology

補助事業担当者 (日本語) 国立大学法人広島大学 大学院理学研究科 教授 山本 卓
所属 役職 氏名 : (英語) Graduate School of Science, Hiroshima University,
Professor, Takashi Yamamoto

実施期間 : 平成 28 年 10 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) ラットにおける 2H2OP 法の最適化とヒト疾患モデルとしての遺伝子改変動物の作製

分担課題名 : (英語) Establishment of 2H2OP methods in rats and generation of genetically modified animals as human disease models

補助事業分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 医学系研究科 准教授 真下 知士
所属 役職 氏名 : (英語) Osaka University Graduate School of Medicine, Associate Professor,
Tomoji Mashimo

分担研究 (日本語) 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
分担課題名 : (英語) Development of efficient targeted knock-in system using genome editing technologies

補助事業分担者 (日本語) 山梨大学大学院総合研究部 医学教育センター・教授・川原敦雄
所属 役職 氏名 : (英語) Center for Medical Education and Sciences, Graduate School of Medical
Science, University of Yamanashi・Professor・Atsuo Kawahara

II. 成果の概要 (総括成果報告)

補助事業代表者：国立大学法人広島大学・大学院理学研究科・山本 卓 総括成果報告を参照。

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 4件、国際誌 2件）

1. 真下知士、ヒト疾患モデルとしてのラットの利点、マウス表現型解析スタンダード、実験医学別冊、羊土社、2016年、P68-69
2. 宮坂佳樹、真下知士、哺乳類でのゲノム編集の利用、ゲノム編集入門－ZFN・TALEN・CRISPR-Cas9－、裳華房、2016年、P136-159
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. 真下知士、竹田潤二 監修、生涯教育講座「ゲノム編集革命！」、大阪大学医学部学友会会誌、公益財団法人医学振興银杏会、2016年、Vol. 36、p49-90
5. Quek H, Luff J, Cheung K, Kozlov S, Gatei M, Lee CS, Bellingham MC, Noakes PG, Lim YC, Barnett NL, Dingwall S, Wolvetang E, Mashimo T, Roberts TL, Lavin MF. J Rats with a missense mutation in Atm display neuroinflammation and neurodegeneration subsequent to accumulation of cytosolic DNA following unrepaired DNA damage. *Leukoc Biol.* 2017 101(4):927-947.
6. Quek H, Luff J, Cheung K, Kozlov S, Gatei M, Lee CS, Bellingham MC, Noakes PG, Lim YC, Barnett NL, Dingwall S, Wolvetang E, Mashimo T, Roberts TL, Lavin MF. A rat model of ataxia-telangiectasia: evidence for a neurodegenerative phenotype. *Hum Mol Genet.* 2017 26 (1): 109-123.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 次世代ゲノム編集ラットの作製支援事業、口頭、真下知士、第3回 KBRP ワークショップ、熊本、熊本大学生命資源研究支援センター、2017年3月10日、国内
2. ゲノム編集による再生医療モデル動物の開発、口頭、真下知士、第16回日本再生医療学会総会シンポジウム<ゲノム編集と遺伝子治療>、仙台、仙台国際センター、2017年3月9日、国内
3. ゲノム編集技術によるモデル動物の作製支援事業、口頭、真下知士、大阪大学大学院医学系研究科共同研附属ゲノム編集センター第1回セミナー、大阪大学大学院医学系研究科臨床研究棟3階、2016年12月14日、国内
4. CRISPR/Cas9と長鎖一本鎖DNAによる超簡単ノックイン法、口頭、真下知士、第38回日本分子生物学会バイオテクノロジーセミナー、横浜、パシフィコ横浜、2016年12月1日、国内
5. 哺乳動物におけるゲノム編集技術の開発、口頭、真下知士、第39回日本分子生物学会、横浜、パシフィコ横浜、2016年12月1日、国内
6. ゲノム編集時代における実験動物業者のあり方について、口頭、真下知士、日本実験動物協同組合関西支部支部会研修会、メルパルク京都、2016年11月25日、国内
7. モデル動物作製のための最先端 CRISPR 技術、口頭、真下知士、BioJapan 2016 World Business Forum、パシフィコ横浜、2016年10月14日、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. ノーベル賞候補「ゲノム編集」とは？ 大阪大学に研究センター開設、真下知士、読売テレビ「ニュース ten」、2016年12月14日、国内
2. ゲノム編集学会、ゲノム編集センター、その先に！、真下知士、日経バイオテク ONLINE 新春展望 2017 アカデミック版、2017年1月3日、国内
<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/column/16/112500015/123100052/>
3. ことしにかける、真下知士、NHK 大阪 ニュースほっと関西、2017年1月4日、国内
4. ゲノム編集ーその可能性の先にあるものとは、真下知士、ナレッジキャピタル超学校 MOU-ICHIDO 自分進化論、大阪、グランフロント大阪北館ナレッジキャピタル 1F、2017年2月25日、国内
5. テルモ生命科学芸術財団生命科学 DOKIDOKI 研究室 2017年4月1日、今注目の最先端研究・技術探検！医療・創薬から食料・エネルギー生産まで、ゲノム編集が世界を変える!？
<http://www.terumozaidan.or.jp/labo/technology/34/index.html>

(4) 特許出願

なし

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) ナショナルバイオリソースプロジェクト
(英語) National Bioresource Project

補助事業課題名： (日本語) 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
(英語) Development of easy protocols for efficient gene knock-in using genome editing technology

補助事業担当者 (日本語) 国立大学法人広島大学 大学院理学研究科 教授 山本 卓
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Science, Hiroshima University,
Professor, Takashi Yamamoto

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 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
分担課題名： (英語) Development of efficient targeted knock-in system using genome editing technologies

補助事業分担者 (日本語) 山梨大学大学院総合研究部 医学教育センター・教授・川原敦雄
所属 役職 氏名： (英語) Center for Medical Education and Sciences, Graduate School of Medical Science, University of Yamanashi・Professor・Atsuo Kawahara

分担研究 (日本語) ラットにおける 2H2OP 法の最適化とヒト疾患モデルとしての遺伝子改変動物の作製
分担課題名： (英語) Establishment of 2H2OP methods in rats and generation of genetically modified animals as human disease models

補助事業分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 医学系研究科 准教授 真下 知士
所属 役職 氏名： (英語) Osaka University Graduate School of Medicine, Associate Professor, Tomoji Mashimo

II. 成果の概要 (総括成果報告)

補助事業代表者：国立大学法人広島大学・大学院理学研究科・山本 卓 総括成果報告を参照。

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 2件）

1. 川原敦雄, 東島眞一. ゼブラフィッシュでのゲノム編集. 実験医学増刊. 2016, 90-97.
2. Ota S, Taimatsu K, Yanagi K, Namiki T, Ohga R, Higashijima SI, Kawahara A. Functional visualization and disruption of targeted genes using CRISPR/Cas9-mediated eGFP reporter integration in zebrafish. Scientific Reports. 2016, 34991.
3. Morita H, Taimatsu K, Yanagi K, Kawahara A. Exogenous gene integration mediated by genome editing technologies in zebrafish. Bioengineered. 2017, 1300727.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ゲノム編集技術を活用したレポーター遺伝子の部位特異的挿入, 口頭, 川原敦雄, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/2, 国内.
2. Targeted gene disruption driven by the CRISPR-mediated reporter integration, poster, Atsuo kawahara, The 7th Strategic Conference of Zebrafish Investigators, 2017/1/15, USA 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし