

《様式B》

研究テーマ「ゲノム編集による高効率で正確な長鎖 DNA ノックイン技術の開発」

研究責任者 所属機関名 岐阜薬科大学

官職又は役職 准教授

氏 名 本田 岳夫 メールアドレス honda-ta@gifu-pu.ac.jp

共同研究者 所属機関名 愛知県医療療育総合センター発達障害研究所

官職又は役職 室長

氏 名 田畑 秀典

(令和3年度募集) 第34回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1,000字程度)

※産業技術として実用化の可能性や特許出願(予定も含む)の有無についてもご記載ください。

CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術の急速な発展は生物・医学研究に衝撃的な技術革新をもたらしている。基礎研究の分野では遺伝子機能解析の為にノックアウトマウス作製や、タンパク質発現部位解析の為に短鎖DNAノックインマウス等は非常に高効率且つ簡便に作製出来るようになった。しかしながら、蛍光タンパク質等の長鎖DNAの挿入は、現在でも非常に困難な状況である。長鎖DNAの挿入技術は基礎研究分野だけでなく、遺伝子治療技術として等、様々な分野で開発が試みられている。

我々は脳での神経細胞移動制御機構の研究を進めており、関連遺伝子解析の為にノックインマウスの作製を試みてきた。マウスでの長鎖DNAノックインにおいては、受精卵へのマイクロインジェクションが主に用いられ、高額装置と高度な技術を要する。我々はマイクロインジェクションを用いずにDNAをマウス受精卵に導入する技術と、DNA組換え酵素を用いることで長鎖DNAを高効率に導入することに成功した。しかしながら、挿入部位に予期せぬ変異が導入されていることが明らかとなった。そこで本研究では、新たに開発された長鎖DNAのノックイン技術を最適化し、マウス受精卵での高効率で正確、簡単な長鎖DNAノックイン技術を確立することを目指し研究を行った。

変異導入の原因としては、用いたDNA組換え酵素の性質として組換えの正確性が低い可能性等が考えられた。そこで、本研究では高効率で正確なDNA組換えを起こすことが報告されている他の2種類のDNA組換え酵素の検討を行った。

両酵素共に HEK293T 細胞中におけるプラスミド DNA 間組換え反応においては、正確な DNA 組換え反応が生じていることが示されたが、受精卵においては 5'側の DNA 組換え部位に一部配列の欠損が生じることが明らかになった。本研究計画の着想に至った DNA 組換え酵素を用いた実験においても 5'側領域の DNA 組換え部位に同様な領域の欠損が認められたことから、共通メカニズムによる DNA 欠損が生じている可能性が示唆された。一方、これら欠損部位は共通して組換え反応を起こす標的配列の中に生じていることが明らかになった。一つの DNA 組換え酵素については再現性良く欠損が起こっていることが明らかになっており、他の DNA 組換え酵素についても今後確認予定である。標的配列中の特定の DNA 配列の欠損が決定出来れば、これを加味したノックイン配列の設計が可能であり、遺伝子治療や組換え動物の作製などへの応用が期待される。本研究をさらに発展させることにより、特許出願を目指していく予定である。

2. 実施内容および成果の説明 (A 4 で、5 ページ以内)

DNA 組換え酵素を用いたプラスミド DNA 間組換え反応の検証

高効率に長鎖 DNA のノックインを起こすことが出来た DNA 組換え酵素 A の標的配列を野生型に近い長さに変更することで DNA 組換え反応が正確に生じるかを、マウス受精卵を用いて検証するにあたり、まずプラスミド DNA 間において組換え反応が正確に生じるかを検証することにした。また同時に、別の DNA 組換え酵素 B と C についても、その標的配列を持つプラスミド DNA 間で、DNA 間組換え反応が正確に起きるか検証を行った。

プラスミド DNA 間組換え反応の検証にあたっては、組換えが生じたことを EGFP の蛍光シグナルとして検出する為、CAG プロモーターの下流に DNA 組換え酵素の標的配列を持つプラスミド DNA と DNA 組換え酵素の標的配列と Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) を発現するプラスミド DNA、DNA 組換え酵素を発現するプラスミド DNA を HEK293T 細胞にトランスフェクションすることで行った。コントロール実験としては、DNA 組換え酵素を発現するプラスミド DNA の代わりに、それらの cDNA を持たない empty ベクターを加えた。DNA 組換え酵素が存在しない場合、プラスミド DNA 間の組換え反応が起こらないが、DNA 組換え酵素存在下では DNA 組換え反応により、分子間組換えが生じ、EGFP の cDNA カセットが CAG プロモーター下に挿入されることにより、EGFP の発現が起こり、蛍光シグナルが観察されることが期待される (図 1A)。

その結果、DNA 組換え酵素存在下でのみ EGFP の蛍光が観察され、DNA 組換え酵素に依存したプラスミド間 DNA 組換え反応が生じていることが推定された (図 1B)。また、組換え効率を簡易的に推定する為に EGFP の蛍光量を測定し、比較したところ、DNA 組換え酵素 A 及び C が DNA 組換え酵素 B に比べて高い組換え効率を有することが示された (図 1C)。

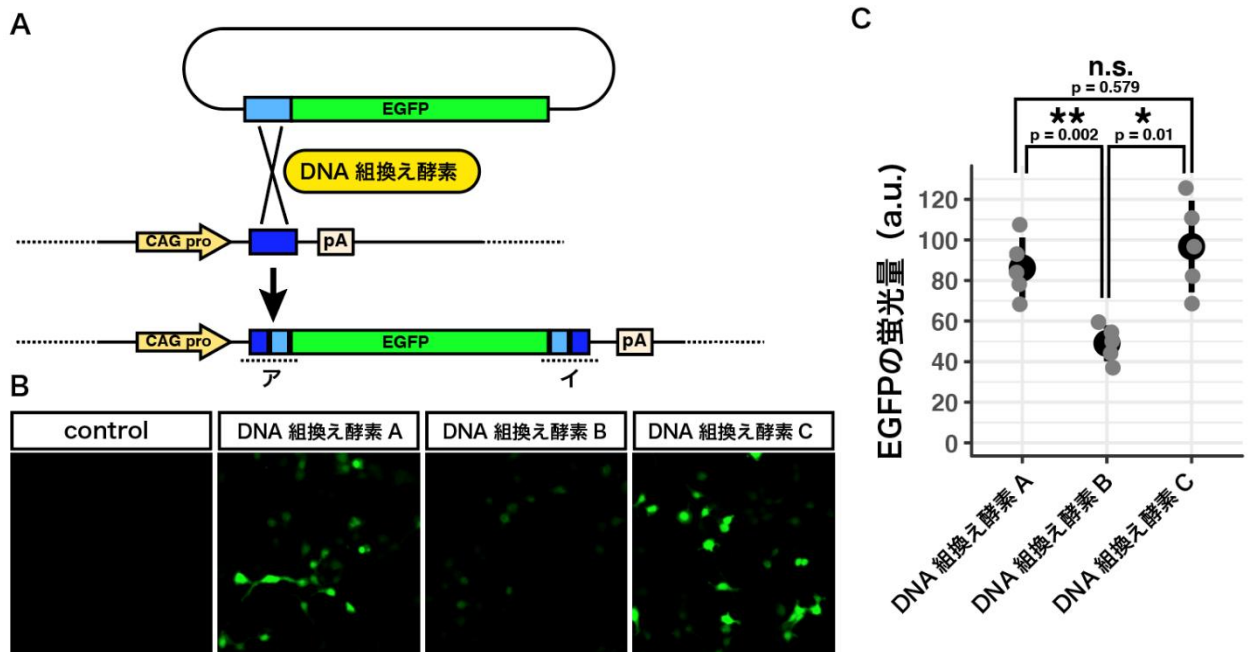


図 1: DNA 組換え酵素によるプラスミド DNA 間組換え反応の検証

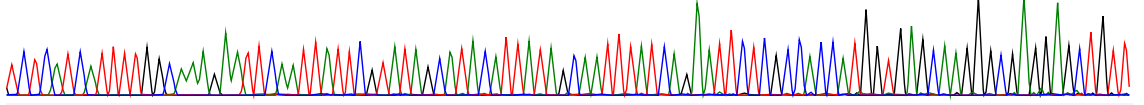
(A) CAG プロモーターを持つプラスミド DNA と EGFP を持つプラスミド DNA の組換え反応の模式図。DNA 組換え酵素依存的に X で示された部位で組換え反応が起こる。組換えが起こると EGFP が CAG プロモーター下に挿入される為、EGFP の転写が起こる。最下段の点線部分ア、イは配列を決定した組換え部位 (図 2 参照)。(B) DNA 組換え酵素依存的に EGFP の発現が生じることを検証する為、HEK293T 細胞に DNA 組換え酵素発現ベクター及び組換え反応を起こす為のプラスミドベクターを導入した。DNA 組換え酵素 A、B、C それぞれの発現で組換え反応に依存した EGFP の発現を確認した。(C) プラスミド間 DNA 組換え反応の効率測定。

次に、組換え反応が正確に行われているかを検証するため、図 1A の下段、ア及びイの領域を PCR により増幅し、増幅産物を用いて DNA の塩基配列決定を行った (図 2)。図 1 ア及びイ両方の領域で正確な DNA 組換え反応が生じていることが確認された。

アの領域

正確に組換えが起こった際の配列

TCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCAATTATTCGTATAGCATACATTATAGCAATTTATCAGAATTCTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT

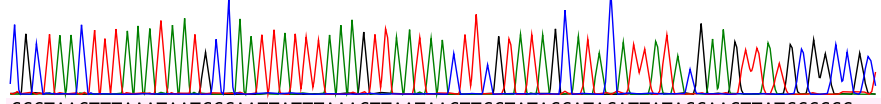


プラスミド間DNA組換え体から得た配列

イの領域

正確に組換えが起こった際の配列

CGCTAACTTTAAATAATGCCAATTATTTAAAGTTAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGCGGCCgc



プラスミド間DNA組換え体から得た配列

図 2： DNA 組換え反応によって生じた組換え部位の塩基配列

正確な DNA 組換え反応が起こることを確認する為、図 1 の点線アおよびイで示された領域の塩基配列の決定を行った。DNA 組換え酵素 3 種類全てで正確な組換え反応が生じていることを確認した。図では組換え酵素の一つを用いた際に生じた組換え部位の配列を例として示す。

DNA 組換え酵素の標的配列を持つノックインマウスの作製

DNA 組換え酵素を使用したプラスミド DNA 間組換え反応は正確に生じることが検証された。マウス受精卵においても正確な DNA 組換え反応が生じることを検証する為、DNA 組換え酵素の標的配列をノックインしたマウスの作製を行った。作出においては、i-GONAD 法(図 3)を用い、DNA

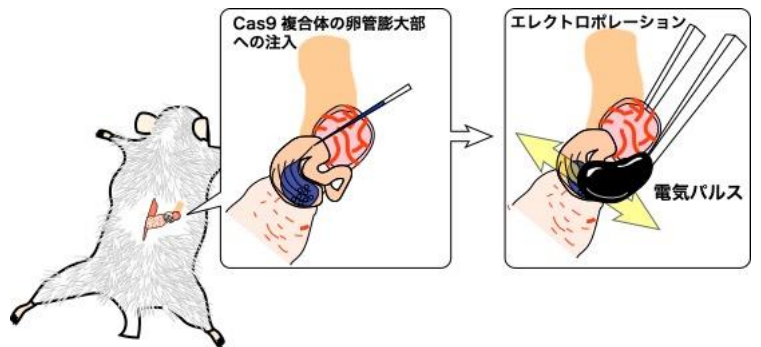


図 3：i-GONAD 法による DNA 組換え酵素標的配列のノックイン
卵管膨大部に Cas9 複合体とノックイン用の single strand oligo DNA を注入し、エレクトロポレーションによって受精卵に導入した。

組換え酵素の標的配列を持つ一本鎖オリゴ DNA、及び Cas9/crRNA/tracrRNA 複合体を 1 細胞期受精卵に導入し、ノックインを行った。得られた産仔を個体識別後、尻尾の一部からゲノム DNA を抽出し PCR を行い、PCR 産物を制限酵素により切断し、電気泳動により DNA 断片の解析を行った。野生型アレルからは 600 bp 付近、ノックインアレルからは 650 bp 付近の大きさに PCR 産物がそれぞれ増幅される。また、ノックインアレル由来の PCR 産物を制限酵素によって切断した場合には、300 bp 付近の断片が生じる。

図 4 矢印で示すように、ノックインが起こったときに観察される DNA 断片が観察され、これらのマウスについて PCR 産物をクローニングし、正確なノックインが行われているこ

とを確認した。図 4 では 3 系統作製したノックインマウスのうち 1 系統の解析結果の一部を示す。

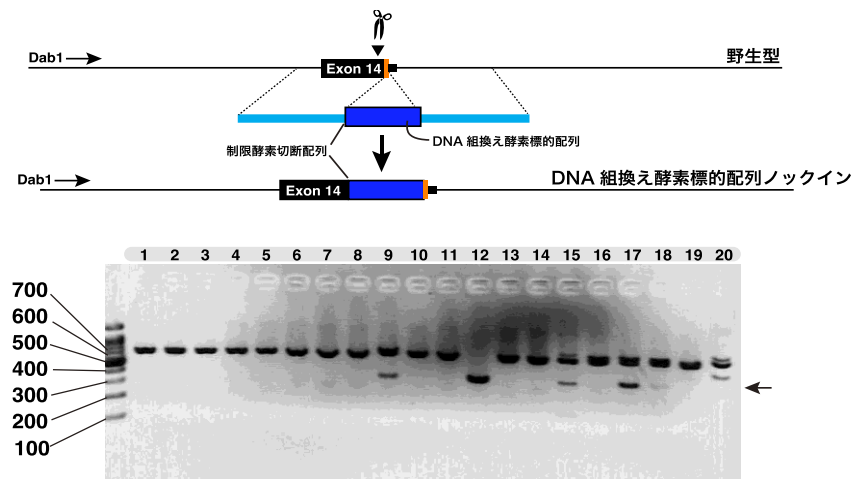


図 4：DNA 組換え酵素標的配列のノックインとノックインマウスの同定

(上) DNA 組換え酵素標的配列ノックインマウス作製過程を示した概念図。dab1 遺伝子の Exon14 を Cas9 で切断し、DNA 組換え酵素標的配列のノックインを行った。導入される DNA には制限酵素切断配列が含まれる。(下) i-GONAD 法により得られた産仔の遺伝子型判定結果。矢印はノックインが起こった時に検出されるバンドの位置を示す。

マウス受精卵を用いた長鎖 DNA のノックイン

次にマウス受精卵を用いて長鎖 DNA のノックインを試みた (図 5)。過排卵処理を行った 4 週齢のメスマウスを DNA 組換え酵素 B あるいは C の標的配列をノックインしたマウスと交配させ、翌日に受精卵を回収した。長鎖 DNA を含むプラスミド DNA を受精卵に導入後、DNA 組換え酵素 B あるいは C を発現させた。受精卵は胚盤胞期まで発生させ、ゲノム DNA の抽出後、PCR 法によって長鎖 DNA のノックインの有無を確認した。その結果、DNA 組換え反応が生じる部位で DNA 配列の一部欠損が確認された (図 5B では DNA 組換え酵素 B を用いた結果を示す)。本研究では DNA 組換え酵素 B 及び C についてそれぞれの標的配列を作成し、長鎖 DNA のノックインを行ったが、そのどちらもで、DNA 組換えが生じる領域での一部 DNA 配列の欠損が確認された。本研究計画の着想に至った DNA 組換え酵素 A を用いた実験においても 5' 側領域の DNA 組換え部位に同様な領域の欠損が認められたことから、共通したメカニズムによる DNA 欠損が生じていることが示唆された。DNA 組換え酵素 A については生じる欠損が共通の配列であることを明らかにしていることから、欠損する配列を考慮したノックインを計画することで望み通りのノックインが可能となる。DNA 組換え酵素 B、C についても現在再現性を確認しているところである。今後、今回得られた知見を加え、再設計されたベクターを用いることで、高効率で正確なノックインを行うことができると考えられる。

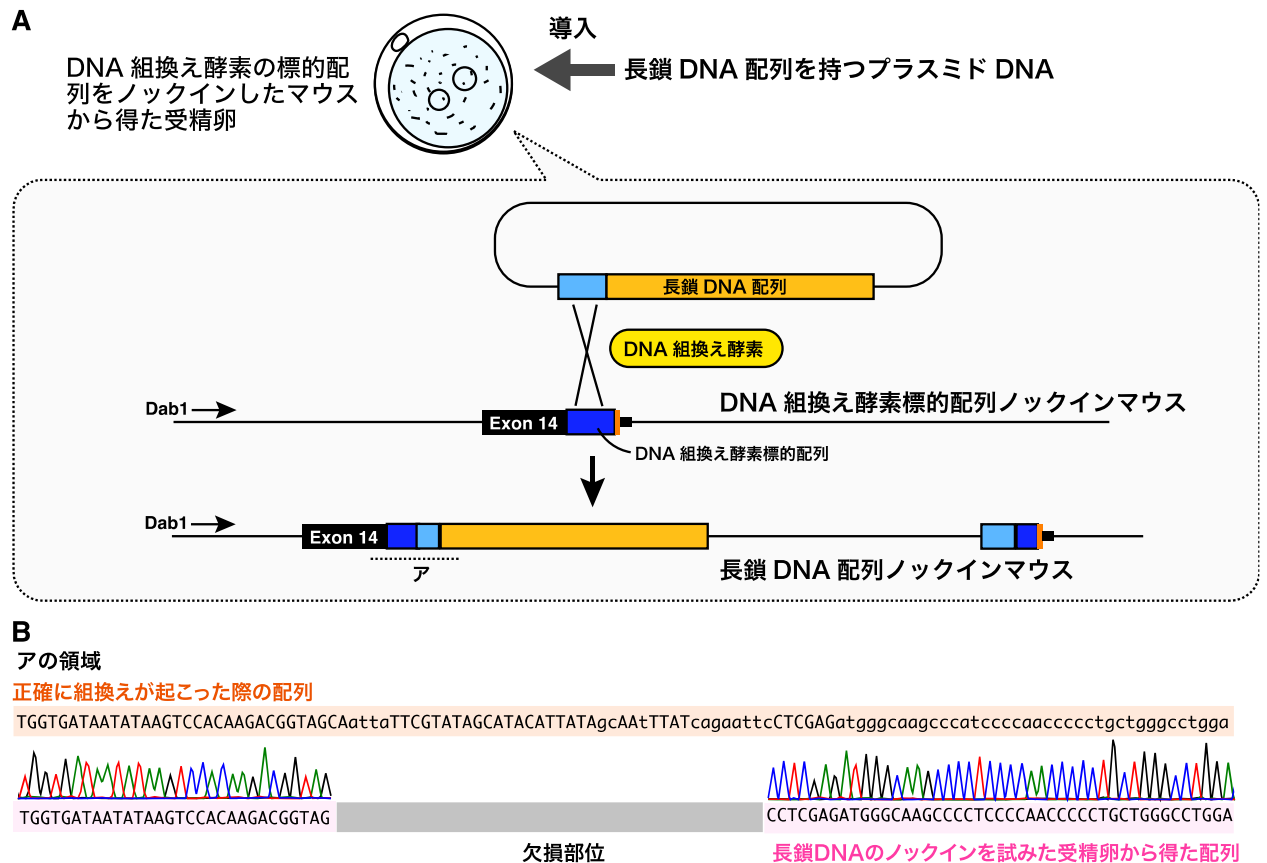


図 5：長鎖 DNA 配列を DNA 組換え酵素 B を用いてマウス受精卵にノックインする際のストラテジー
 (A) DNA 組換え酵素標的配列を持つノックインマウスから採取した受精卵に長鎖 DNA 配列を持つプラスミド DNA を導入し、DNA 組換え酵素 B により長鎖 DNA のマウスゲノムへのノックインを試みた。長鎖 DNA 配列は *dab1* の Exon14 に挿入される。(B) A の点線アで示された領域について塩基配列の決定を行った。A で青と水色のボックスで示された DNA 組換えが生じる部位に DNA 配列の一部欠損が観察された。

発表論文

Heterozygous *Dab1* Null Mutation Disrupts Neocortical and Hippocampal Development. Takao Honda, Yuki Hirota, Kazunori Nakajima, *eNeuro*, 10(4), 2023

謝辞

本研究を遂行するにあたりまして、多大なるサポートをして頂きました一般財団法人東海産業技術振興財団様、並びに関係者の皆様には深く感謝を申し上げます。また、共同研究者の愛知県医療療育総合センター発達障害研究所、田畑秀典先生、慶應義塾大学医学部解剖学教室、仲嶋一範先生、岐阜薬科大学分子生物学研究室、福光秀文先生、池見俊樹君にも感謝申し上げます。