

201426028A

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の
安全性確保に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書
(H25-食品-一般-015)

研究代表者 近藤一成

平成27(2015)年 5月

目 次

I. 総括研究報告書

次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究

近藤 一成 3

II. 分担研究報告書

1. Platinum TALEN 作製システムの確立とツメガエルでの遺伝子改変

山本 卓 13

2. 次世代遺伝子組換え技術に関する調査研究

近藤 一成 23

3. 次世代バイオ技術を応用した生物の表現系解析と検出技術の開発

中村 公亮 53

4. 統合型遺伝子組換え食品データベース作成・次世代遺伝子組換え技術を用いた
作物と非食用組換え作物の検知技術の開発

吉松 嘉代

4-1 統合型遺伝子組換え食品データベース作成に関する研究 77

4-2 NBT を用いた作物と非食用遺伝子組換え作物の検知技術の開発 91

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 109

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究」

総括研究報告書

研究代表者 近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者 山本 卓 広島大学大学院理学研究科
研究分担者 吉松嘉代 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター
研究分担者 中村公亮 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

近年の遺伝子組換え技術の急速な進歩に伴い、遺伝子組換え技術の痕跡がゲノム DNA 上に残らない手法が登場してきた。植物 RNA ウイルスを用いた開花促進遺伝子導入により品種改良の大幅な期間短縮を目的とした方法、遺伝子組換え台木の接ぎ木による穂木への師管輸送を介した RNA サイレンシング誘導、動物・植物への TALEN, CRISPR/Cas9 技術を用いた任意の標的配列に対するゲノム改変など進んでいる。これら次世代遺伝子組換え技術は、痕跡が残らないと考えられてものの、技術的には確立されたとは言えず、その特徴や宿主に起こり得る現象、オフターゲット効果などについては十分な検討が必要である。一方で、近い将来これらの技術が、食品分野においても応用されることが予測されているものの、こうして作出された生物の取り扱いや GM 生物の規制の在り方、GM 生物として申請がされた場合の検討項目、さらに、検知の可能性や検知可能な場合のその方法に関する検討がなされておらず、急務となっている。本研究では、これら多様な次世代遺伝子組換え技術について、技術開発と標準化を行い、文献調査するとともに実際に様々な生物に適用した時の技術的な問題点や生物細胞内で起こる現象について研究を行った。また、検知可能性についての基礎的な検討を行った。具体的には、(1) 技術開発について、遺伝子ノックインを簡便に行う新規手法 (PITCH 法) を開発しカイコなどの動物細胞に適用した。また、ジャガイモに TALEN を適用して目的遺伝子のノックアウトを行った。(2) 安全性について、TALEN および CRISPR/Cas9 を用いた時のオフターゲット効果は、エキソン領域のみの解析ではあるが、自然界で起きる変異以上の変化はなかった。染色体構造上の有意な変化は認められなかった。リコンビナント Cas9 タンパクの消化管内安定性のための分解性試験を行い、素早く分解し、毒性やアレルギー性を示す可能性は低いことを明らかにした。(3) 組換え食品を想定して、遺伝子ノックインによる周辺遺伝子発現量の変化を調べたところ、最大 2 桁変化することが示され、挿入位置の重要性が示唆された。また、次世代シーケンサーを用いてアグロバクテリウム法由来の短いボーダー配列等を指標に導入遺伝子の解明を可能にした (4) イネを用いて TALEN による変異体作製を行った。(5) 情報収集について、次世代遺伝子組換え技術を用いた動物および植物について検索した結果、ヤギ、ヒツジ、ニジマス、サケなどの動物のほか、小麦、トウモロコシにも適用され始めており商業化も今後進んでいくことが考えられた。ゲノム編集技術では、CRISPR/Cas9 の適応が多く、イネ、コムギ、トウモロコシ、トマトなど多くの作物に実施されていた。国別ではアメリカと中国の研究が大部分であった。また、オリゴヌクレオチド指向型変異導入法 (ODM) を用いたナタネがアメリカで市場に出始めた。

A. 研究目的

近年、遺伝子組換え (GM) 技術が急速に発展し、ZFN (Zinc-Finger Nuclease) に始まり 2010 年頃に登場した TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)、さらに、2013 年に報告された CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) などの次世代遺伝子組換え技術が、疾患研究などの基礎研究のみならず食品分野でも応用されるようになってきた。また、リンゴ RNA ウイルスを用いた開花促進、接ぎ木や RdDM (RNA-directed DNA Methylation) の機構を用いた遺伝子サイレンシングにより、ゲノム上での改変を行わずに組換え生物の作成が可能になってきた。TALEN や CRISPR 用いて、遺伝子上の任意の位置を人工的かつ改変した痕跡を残すことなく意図的に組換え生物を作成可能である可能性があることから、これらの組換え体をどのように扱うかを議論することが近々の課題として求められている。

次世代遺伝子組換え技術には、人工ヌクレアーゼである ZFN, TALEN, CRISPR 法のほか、RdDM や接ぎ木による RNA 輸送による遺伝子サイレンシングを用いたもの、植物 RNA ウイルスを用いたものなどが存在する。それらについて、安全で高効率な遺伝子改変技術を確立するとともに、それぞれの技術ごとに整理し、その原理や作用機構について実際の文献情報から得られた結果や本研究での実験から得られた結果を基に、改変後の遺伝子配列の違いなどを調査・研究して、どのようなことが想定されるか、どのような場合に遺伝子組換え体 (GMO) として扱うか、GMO として扱う場合に新たに安全性審査に加える項目はあるか、などを考える必要がある。また、次世代遺伝子組換え技術

を用いて作成された生物は、どこまで検知が可能かどうかについても検討を行うことが必要である。

遺伝子塩基配列上の変化については、意図しない領域での非特異的な改変 (オフターゲット、off-target 効果) がどの程度起きるか、どの程度の改変であれば自然界と区別するのか、について、改変が欠失、置換、挿入に分けて整理して考える必要がある。

そこで、本研究では、次世代遺伝子組換え技術の中で、特に進歩が著しい TALEN, CRISPR/Cas システムを中心に、上記観点から調査研究を行った。また、最近開発された食用遺伝子組換え生物の文献調査を行う。さらに、各国の規制に対する考え方、アジア地域での開発状況についても調査した。

B. 研究方法

次世代組換え技術に関する研究について、分担研究者の山本卓らのグループは、TALEN の安全で高効率でゲノム DNA 上の標的部位でゲノム編集が可能なシステムとして、Platinum TALEN の開発と評価をこれまでに行った。TALEN および CRISPR/Cas9 を用いた新しい遺伝子ノックイン手法を開発して、細胞及び生物に応用した。近藤一成らのグループは、CRISPR/Cas9 システムを培養細胞に用いてその特性を評価した。リコンビナント Cas9 タンパクのアレルゲン性について検討した。また、遺伝子組換え動物の文献調査も行った。中村公亮らは、外来遺伝子を導入した時に起きる現象、ゲノム構造と周辺遺伝子発現に与える影響を検討した。吉松嘉代らのグループは、植物を対象に (特にイネを標的として) TALEN を用いた時の変異解析を行うために、Platinum

TALEN の設計を行い、イネに遺伝子導入した。次世代組換え技術を用いた植物の世界各国の開発状況について、および医薬品用途の遺伝子組換え植物の調査を継続して行った。次世代遺伝子組換え技術の特徴や問題点、各国の規制に対する情報や開発状況は、初年度から継続して近藤、中村で行った。

1. 次世代遺伝子組換え技術の開発

1) Platinum TALEN を用いた MMEJ (Microhomology-Mediated End Joining) を介した遺伝子ノックイン法 (TAL-PITCh 法)の開発

標的遺伝子とドナーベクターを同一の Platinum TALEN で切断することによって、切断面に生じるマイクロホモロジー(8bp)を利用した標的遺伝子座へのレポーター遺伝子の挿入を試みた。PITCh 法を評価する目的で、ヒト *FBL* 遺伝子座への蛍光遺伝子

(mNeonGreen) の挿入を行った。TALEN 発現ベクターと PITCh ベクターをヒト HEK293 細胞にトランスフェクションし、ピューロマイシンによって選抜し、蛍光遺伝子の発現と局在を観察した。*FBL* 遺伝子の蛍光局在が観察された細胞からゲノム DNA を抽出し、ゲノミックスザン解析と蛍光遺伝子の挿入配列について PCR による増幅と塩基配列の解析をおこなった。また、動物個体における標的遺伝子へのノックインが PITCh 法で可能かどうかを検討するために、アフリカツメガエルのチロシナーゼ遺伝子およびケラチン遺伝子への蛍光遺伝子の挿入を試みた。蛍光が観察できたカエル胚からゲノム DNA を抽出し、標的遺伝子座を PCR 増幅し、塩基配列を決定した。

2) CRISPR/Cas9 を用いた MMEJ (Microhomology-Mediated End Joining) を介した遺伝子ノックイン法 (CRIS-PITCh 法)の開発

CRISPR/Cas9 を利用した発現カセットのノックイン法を開発をした。ガイド RNA (gRNA) 発現ベクターの構築と SSA アッセイによる機能評価を行なった後、*FBL* 遺伝子座へのワンステップでのノックインを試みた。ノックインが成功した細胞を単離した後、ゲノム DNA の抽出と標的遺伝子座の PCR 増幅と塩基配列の解析を行った。

2. ゲノム編集技術による標的配列の切断およびゲノムに与える影響

ニワトリ DT40、ヒト TK6、ラット PC12 など動物培養細胞を用いて、複数の標的配列の CRISPR/Cas9 用 gRNA を設計してピューロマイシンをコードするプラスミドに挿入した。プラスミドを細胞に導入して変異パターンの解析を行った。標的配列は、ゲノム環境の異なると考えられる領域 (*AIFM1*, *Rosa26*, *TK1*) を用いた。リポフェクションまたはエレクトロポレーション法で遺伝子導入を行い、ピューロマイシンで選抜した後、ゲノム DNA をカラム抽出した。目的領域周辺を PCR 増幅して、クローニングベクターに組込み、コロニー化した後に各コロニーをシーケンス解析して変異パターンを調べた。また、ヒト TK6 由来の TSCE5 細胞を用いた *TK1* 遺伝子を指標にした TK アッセイを行い、低頻度で他の方法では解析することが難しい大きな変異を中心に解析した。変異発生率は情報により求めた。大きな変異を含む細胞を、トリフルオロチミジン (TFT) で選抜して、高精製度のゲノム DNA

を抽出した。この DNA を、次世代シーケンサー Illumina HiSeq および HumanOmni ビーズアレイ解析を行い、変異パターン解析、コピー数多型解析 (CNV)、一塩基変異 (SNV) 検出を行った。

3. Cas9 の毒性およびアレルゲン性

リコンビナント Cas9 を作製した。活性を確認するために、Cas9、gRNA、標的としてのプロトスペーサー2 プラスミドを加えて反応を開始し、経時的にサンプリングして電気泳動で分析した。人工胃液中での分解性試験は、崩壊試験第 1 液にペプシンを添加して人工胃液とした。37°C でインキュベートし、経時的にサンプリングして電気泳動後 CBB 染色により分析した。また、アレルゲンデータベースを用いて、既知のアレルゲンと相同性の有無を調べた。哺乳類に最適化した Cas9 配列は参考文献から得た。センス鎖およびアンチセンス鎖から 6 つの読み枠でアレルゲンになりうるペプチドとしてアミノ酸残基 20 mer 以上の長さの物を選んで検索を行った。

4. 文献調査 (次世代組換え技術を含む組換え動物)

3 つのデータベース (SciFinder、Google Scholar、PubMed) を利用した。本年度は 2011 年に発表された論文や特許などを調査した。ジンクフィンガーヌクレアーゼ (以下 ZFN)、TALEN、CRISPR が利用されて作成された組換え動物についての論文や特許を SciFinder、PubMed を利用して調べた。

5. 次世代遺伝子組換え技術の規制についての諸外国の状況調査

次世代組換え技術の規制に関する情報を収集するために、ドイツ、オーストリア、オランダ、イギリス、カナダ、アメリカ、オーストラリア、ニュージーランドの GM 規制に関与する機関の報告書等を調査した。また、最近の科学論文から次世代遺伝子組換え生物に関する報告を調査して、技術的な問題点、開発状況、規制の考え方および検知の可能性についてまとめた。

6. 遺伝子ノックインによる周辺遺伝子の発現量変化

TALEN を利用してニワトリゲノムの α グロビン遺伝子クラスター領域をモデルに、動物細胞内で構成的にかつ大量の転写産物の発現を可能にする汎用性の高い Cytomegarovirus (CMV) 及び Simian virus 40 (SV40) ウィルスプロモーター遺伝子発現カセットを導入し、内在性遺伝子発現量、ゲノム構造及びエピゲノムに及ぼす影響に関して解析した。遺伝子発現の定量化は、リアルタイム PCR を用いて行った。ゲノム構造の解析には、Chromosome conformation capture (3C) 解析を行った。得られた DNA を鋳型にリアルタイム PCR を実施した。

7. 次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立

未知の遺伝子組換え作物を検知するためには、わずかな情報から導入された遺伝子カセットを明らかにする必要がある。遺伝子組換えパイヤをモデル植物として、次世代シーケンサーを用いてゲノム解析を行い、わずかな情報プロモーター配列やアグロバクテリウム由来

のボーダー配列を手掛かりに導入遺伝子配列を明らかにすることを試みた。

8. 統合型遺伝子組換え食品データベース作成に関する研究

薬用 GM 植物、環境浄化用 GM 植物、工業用（食用作物）GM 植物に関する情報を、文献データベース (Scifinder®、検索語「transgenic plant」)、関連学会講演要旨集等を用いて調査した。得られた情報は、カテゴリ別に整理し、それぞれの一覧表を作成した。

9. 次世代遺伝子組換えモデル植物の作製

次世代応用植物の検知法等の開発の基盤整備を行うため、イネの FLO2 遺伝子を標的にして、この遺伝子変異体 flo2 変異体) の 1 つである EM37 変異体を用いてゲノム編集した。また、機能評価のための評価系を構築した。

10. 次世代遺伝子組換え技術を用いた作物の文献調査

ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 に絞って調査した。検索結果から、植物を対象として遺伝子編集を実施した論文のみを抽出し、リスト化した。また、作成したリストについて発表年別、国別、技術カテゴリー別等に集計し、開発動向の解析を行った。

C. 研究結果、考察および結論

1. 次世代遺伝子組換え技術の開発

HEK293細胞を用いた場合、ランダム挿入が起きていない、蛍光遺伝子の挿入されたものを解析したところ、67%のクローンにおいて正確に挿入されていることが示された。ツメガエ

ルでのTAL-PITCh法による遺伝子ノックインでは、顕微注入を行なった約10%の幼生において、蛍光遺伝子 (mKate2) の蛍光がチロシナーゼを発現する網膜上皮細胞などで検出された。次に、ツメガエルにおいてPITCh法を用いた内在遺伝子の可視化が可能であるかどうかを、ケラチン遺伝子を対象としたGFP遺伝子ノックインにより確認した。ケラチンの発現するエラおよびヒレにおいて特異的にGFP蛍光を発する幼生が複数観察された。

CRISPR/Cas9を用いた遺伝子ノックイン法 (CRIS-PITCh法) では、HEK293 細胞へ導入したところ、FBLタンパク質の局在を示す核小体での蛍光が観察された。DNAを解析したところ、予期せぬ欠失や挿入が見られるものの正確につながったクローンが含まれていた。

本法によって、これまで困難であった比較的大きいサイズのDNAを正確に挿入することが可能になった。培養細胞においては、HR との効率比較においても MMEJ での効率が 2-3 倍であることから、実用レベルの方法であると考えられた。

2. ゲノム編集技術による標的配列の切断およびゲノムに与える影響

ニワトリ DT40 細胞、ヒト TK6 細胞、ラット PC12 細胞を用いて、ゲノム環境の異なる複数の標的配列に対する CRISPR/Cas9 による DNA2 本鎖切断後の変異パターン解析を行った。転写活性が弱い AIFM1 遺伝子では、内部エキソンは切断できなかったが、第一エキソンは 3 または 4 塩基の小さな欠失が中心であった。遺伝子ノックインに用いられる Rosa26 領域では、7 から 103 塩基のやや大きい欠失とともに、1 または 2 塩基挿入が認められた。また、

TK6 細胞で、*TK1* 遺伝子を指標にした低頻度で起きる変異を次世代シーケンサーで解析し、10 kb 以上の欠失がメガヌクレアーゼ I-SceI や CRISPR/Cas9 処理で見られた。標的部に起きるのは違って、もし、このような複数の遺伝子にまたがる大きな欠失が予測できないゲノム上の領域に生じた場合は、解析が困難と考えられた。

3. Cas9 の毒性およびアレルゲン性

リコンビナント Cas9 を作製し、活性を保持しているか確認した。この Cas9 を用いて、人工胃液中での安定性（分解性）について検討したところ、1 分以内に速やかに分解されることが判明し、消化管から吸収されて毒性やアレルゲン性を示す可能性は低いことが示唆された。また、アレルゲンデータベースを用いて Cas9 の既知アレルゲンとの相同性を検索したところ、該当するものは存在しなかった。

4. 文献調査（次世代組換え技術を含む組換え動物）

3 つのデータベース（SciFinder、Google Scholar、PubMed）を利用して行った。

その結果、開発国は圧倒的に中国が多かった。また、導入遺伝子はミオスタチン、*fat-1*、リゾチーム、ラクトフェリン、成長ホルモンが多くつかわれていた。中国は、幅広く動植物にゲノム編集を含めて遺伝子改変を行っており、今後も監視をする必要がある。

5. 次世代遺伝子組換え技術の規制についての諸外国の状況調査

EU 各国、オーストラリア、ニュージーランド、カナダなどの次世代遺伝子組換え技術に関

する報告を調査し、ODM は、ゲノム編集のような DNA2 本鎖切断を伴わない場合には、GM 規制から除外すべきと考える国が多かった。ゲノム編集技術は、数塩基以内の小さな欠失、挿入、変異は自然界でも起きることから GM 規制外と考えてもいいとの立場をとっている国が多いが、標的外で大きな欠失等の可能性もあり、オフターゲットをどのように判断するかがポイントであるが、そこまで突っ込んだ議論はどの国もされていない。今後も継続して、多くの情報を収集するとともに実験結果から科学的な知見をもとに判断することが重要である。

6. 遺伝子ノックインによる周辺遺伝子の発現量変化

導入された遺伝子発現カセットの周辺に存在する内在性遺伝子の発現量を定量したところ、遺伝子発現カセットが導入された配列の 20 kb 内にかつ遺伝子クラスター内で同じゲノムループ内で構成する π と αD 遺伝子の発現量の変化が顕著であった。野生型と比較すると、 π 遺伝子 homo 型で 2 オーダー、 αD 遺伝子は homo 型で 1 オーダーの違いであった。ゲノム上には、多くのトポロジカルドメインが存在していることから、遺伝子ノックインした場合は、周辺遺伝子への影響は無視できないと考えられた。

7. 次世代シーケンサーを使用した未承認遺伝子組換え作物検知法の確立

GM パパイヤをモデル作物として、次世代シーケンサー Miseq を用いて、アグロバクテリウム法由来のボーダー配列など短い配列情報を指標に、導入遺伝子カセットを解明することを検討した。その結果、Ti ベクター由来の

Right border と Left border 配列 (19 bp) をアンカーに GM パパイアの系統特異的配列を見出すことができた。また、GM パパイアに汎用される遺伝子発現用プロモーター (P35S) をアンカーに GM パパイアの構造特異的配列を得ることができた。本手法を用いることで、次世代組換え技術を用いた作物を含めて、未知の遺伝子組換え体の特定と検知法開発に有効な手段であると考えられた。

8. 統合型遺伝子組換え食品データベース作成に関する研究

2014年に国内学会で公表・出版された GM 植物及び NBT に関する論文等から、19 件の情報が得られ、NBT に関連した研究・開発が最も多かった。また、2) 2014 年の国際学会 (IAPB2014) での NBT 研究・開発状況調査から、39 件の情報が得られ、機能性食品と NBT がいずれも 12 件と最も多かった。国別集計では、オーストラリアでの開催のため、オーストラリアが 12 件と最も多く、次いで米国 10 件、ドイツ 6 件であった。作物別集計では、食用作物はイネ 6 件が最も多かった。国内外で NBT に関する研究・開発が増加しており、本分野において、中国での研究開発が、昨年度と同様に活発であることが判明した。

9. 次世代遺伝子組換えモデル植物の作製

イネの *FLO2* 遺伝子を標的とした TALEN 遺伝子を構築した。この遺伝子の開始コドン領域などにも標的部位を設定し、それぞれの部位でのゲノム編集が可能な TALEN 遺伝子構築を行った。構築した *FLO2* を標的とする TALEN 遺伝子を用いて、イネの形質転換を開始した。

今後は、TALEN の活性の検定を行い、標的部位の解析を行う。

10. 次世代遺伝子組換え技術を用いた作物の文献調査

NCBI PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) で各 NBT について検索した。TALEN は、2011 年からモデル植物をはじめ、実用作物である穀類へと広く適用されており、その報告数は、2011 年の 2 件から、2012 年の 3 件、2013 年は 7 件、そして 2014 年は 6 件と推移している。また、2014 年以降は CRISPR との比較研究も行われるようになってきている。中国においては主食作物に NBT を適用し、機能改変を達成している。CRISPR/Cas9 は、2013 年から 2015 年までのわずか 2 年あまりで 31 報の実施例が確認された。適用された植物種は、シロイヌナズナ、イネ、タバコ (*N. tabacum*)、*N. benthamiana*、小麦、ソルガム、トウモロコシ、ゼニゴケ、オレンジ、グループフルーツ、トマトと計 11 種となった。

また、研究が実施された国別で見ると、TALEN 及び CRISPR については、TALEN では米国と中国が全体の 71%、CRISPR では米国と中国で全体の 74% と、米国と中国が 2 大開発国となっている。中国の開発動向について、TALEN、CRISPR 両技術の適用対象植物としてイネがそれぞれ 4 割を占めており、主食作物であるイネに対する遺伝子改変の取り組みが盛んであることが明らかになった。

D. 健康危機情報

特になし

E. 研究発表

各分担研究報告欄に記した。

F. 知的財産権の出願。登録状況

- 1) DNA結合ドメインを含むポリペプチド、国際出願

PCT/JP2014/062518（平成26年5月9日）

- 2) 核酸挿入用ベクター、国際出願

PCT/JP2014/079515（平成26年10月24日）

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究」
分担研究報告書

Platinum TALEN 作製システムの確立とツメガエルでの遺伝子改変

研究分担者	山本 卓	広島大学大学院理学研究科
研究協力者	鈴木賢一	広島大学大学院理学研究科
研究協力者	佐久間哲史	広島大学大学院理学研究科

研究要旨

本研究では、申請者が開発した高活性型 TALEN (Platinum TALEN) を用いて、培養細胞や動物個体において効率的に遺伝子を挿入する方法を開発した。このシステムを用いることによって、これまで困難であった動物個体での標的遺伝子のノックインが可能となった。これまで遺伝子ノックインには、相同組換え (HR) を利用した方法が主流であったが、HR は細胞種や動物によって効率が低く、HR を介した遺伝子ノックインは限られた種においてのみ利用可能であった。そこで本研究では、マイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) を利用した新しい方法 (PITCh 法) を開発し、培養細胞と動物個体での遺伝子ノックイン効率を調べた。その結果、ヒト培養細胞およびカエル個体においてワンステップでの遺伝子ノックインが観察され、PITCh 法の有効性が示された。

A. 研究目的

人工ヌクレアーゼなどの部位特異的ヌクレアーゼを利用した遺伝子改変技術 (ゲノム編集) によって、様々な生物における目的の遺伝子改変が可能となってきた。しかしながら、対象とする生物によってゲノム改変効率は大きく異なり、特に相同組換え (HR) を介した遺伝子ノックインは、内在の HR 活性に依存することから動物個体ではほとんど成功していない。そこで本研究では、我々が開発した高活性型 TALEN (Platinum TALEN) で効率的な標的遺伝子の切断とマイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) を組み合わせることによって、新しい遺伝子ノックイン法である PITCh (Precise Integration into Target Chromosome) 法を開発し、PITCh 法によるヒト培養細胞と動物個体での効果を調べた。さらに、CRISPR/Cas9 を用いた PITCh 法によってヒト培養細胞において遺伝子ノックインを試みた。

B. 研究方法

A. Platinum TALEN を用いた MMEJ (Microhomology-Mediated End Joining) を介した遺伝子ノックイン法 (TAL-PITCh 法) の開発

MMEJ は 5~25 bp の短い相同配列を介した修復経路であり、様々な細胞周期で利用可能である。そこで本研究では、標的遺伝子とドナーベクターを同一の Platinum TALEN で切断することによって、切断面に生じるマイクロホモロジー (8 bp) を利用した標的遺伝子座へのレポーター遺伝子の挿入を試みた。

1) ヒト FBL 遺伝子座への蛍光遺伝子 (mNeonGreen) の挿入

PITCh 法を評価する目的で、核小体に局在する FBL の C 末に mNeonGreen を融合するための Platinum TALEN と PITCh 用ベクターの作製を行なった (図 1)。FBL の C 末端をコードするエキソンを標的とする Platinum TALEN を Sakuma らの方法 (Scientific

Reports, 2013)によって作製し、Single strand annealing (SSA) アッセイにより活性を評価した。PITCh 用ベクターには、FBL 遺伝子の TALEN 標的サイトを付加し、inframe で mNeonGreen が融合し、2A 配列と薬剤耐性遺伝子が発現する構造とした。TALEN 発現ベクターと PITCh ベクターをヒト Hek293 細胞にトランスフェクションし、ピューロマイシンによって選抜し、蛍光遺伝子の発現と局在を観察した。さらに、FBL 遺伝子の蛍光局在を観察された細胞からゲノム DNA を抽出し、ゲノミックサザン解析と蛍光遺伝子の挿入配列について PCR による増幅と塩基配列の解析をおこなった。

2) カエル胚における PITCh 法による遺伝子ノックイン

動物個体における標的遺伝子へのノックインが PITCh 法で可能かどうかを検討するために、アフリカツメガエルのチロシナーゼ遺伝子およびケラチン遺伝子への蛍光遺伝子の挿入を試みた。チロシナーゼ遺伝子切断用の Platinum TALEN の作製を行なった後、SSA アッセイによって活性評価を行なった。PITCh 用ベクターは、チロシナーゼの第一エクソンに inframe で蛍光遺伝子をノックインし、チロシナーゼ遺伝子の破壊とノックインを同時に実現する設計とした。これによって、色素が合成される細胞での色素の欠失とその細胞での蛍光の局在が予想される。

カエルのケラチン遺伝子は、オタマジャクシ幼生のヒレとエラの細胞に発現する細胞骨格タンパク質をコードしている。本研究では、ケラチンタンパク質の C 末端に inframe で GFP 遺伝子が融合することによってケラチン遺伝子の発現の可視化を目的とした (図 2)。

2 つの遺伝子を破壊する Platinum TALEN を mMessage mMachine T7 Ultra Kit (ライフテクノロジーズ) のキットを用いて、mRNA を試験管合成した。ツメガエル受精卵は、ヒト絨毛性ゴナドトロピンを投与することで採取した。卵を 2% システイン溶液で脱ゼリーし、

3% Ficoll in 0.36 X Marc's modified Ringer's (MMR) へ移した。約 250 pg の TALEN mRNA をナノジェット I (Drummond, Broomall, PA, USA) を用いて顕微注入した。顕微注入卵は、ゲンタシンを含む 0.16 X MMR 中で、胞胚から遊泳オタマジャクシ幼生まで飼育した。カエルの飼育については、広島大学のガイドラインに従って行なった。

蛍光が観察できたカエル胚からゲノム DNA を抽出し、標的遺伝子座を PCR 増幅し、塩基配列を決定した。

B. CRISPR/Cas9 を用いた MMEJ (Microhomology-Mediated End Joining) を介した遺伝子ノックイン法 (CRIS-PITCh 法) の開発

TAL-PITCh 法では、ベクター全長の配列が挿入されるため、CRISPR/Cas9 を利用した発現カセットのノックイン法の開発を試みた。CRISPR/Cas9 によって標的配列の切断とベクターの発現カセットの切り出しを同時に行なう。そのため、標的遺伝子に対して gRNA を 1 種類、ベクターに対して 2 種類の gRNA を必要とする。これら 3 種類の gRNA を発現するために Golden Gate Assembly を利用した all-in-one ベクターシステムの確立を試みた (図 3)。さらにこのシステムを利用した 3 種類の gRNA 発現ベクターの構築と SSA アッセイによる機能評価を行なった後、FBL 遺伝子座へのワンステップでのノックインを試みた (図 4)。ノックインが成功した細胞を単離した後、ゲノム DNA の抽出と標的遺伝子座の PCR 増幅と塩基配列の解析を行なった。

C. 研究結果

MMEJ を介した TALEN を用いた遺伝子ノックイン法の開発

FBL 切断用の Platinum TALEN を作製し、SSA アッセイにより活性評価を行なったところ、ポジティブコントロールの ZFN より高い活性を示した。この Platinum TALEN の発現

ベクターとPITCh用ベクターをヒトHek293細胞へ共導入した後、ピューロマイシンによる選抜を行なった。その結果、複数の耐性クローンが得られた。これらのクローンではFBLタンパク質の核局在を蛍光で観察することができた(図1)。さらに、ゲノミックサザン解析によって、ランダム挿入がおきていないことがわかった。蛍光遺伝子の挿入されたつなぎ目部分をPCRで増幅し、塩基配列を解析したところ、67%のクローンにおいて正確に挿入されていることが示された。

ツメガエルでのTAL-PITCh法による遺伝子ノックインの有効性を示す目的で、チロシナーゼ遺伝子への蛍光遺伝子(mKate2)の挿入を行なった。チロシナーゼ遺伝子切断用のPlatinum TALENのmRNAとPITChベクターをツメガエルの受精卵に顕微注入し、オタマジャクシ幼生での蛍光を観察した。その結果、顕微注入を行なった約10%の幼生において、mKate2の蛍光がチロシナーゼを発現する網膜上皮細胞などで検出された。

次に、ツメガエルにおいてPITCh法を用いた内在遺伝子の可視化が可能であるかどうかを、ケラチン遺伝子を対象としたGFP遺伝子ノックインにより確認した。TALEN mRNAとPITChベクターを顕微注入したところ、ケラチンの発現するエラおよびヒレにおいて特異的にGFP蛍光を発する幼生が複数観察された。この蛍光は、細胞骨格に局在することから、内在性のケラチンの局在とよく一致していることが確認された。ゲノムDNAを回収し、挿入部分の配列を解析したところ、5'部分は解析した全ての配列で正確に挿入されていることが確認された(図2)。

MMEJを介したCRISPR/Cas9を用いた遺伝子ノックイン法の開発

TALENを用いたPITCh法では、ベクター全長が挿入されるため、HRを介した方法のように発現カセットのみを正確に挿入する方法が必要と考えられた。そこで、CRISPR/Cas9

を利用した、MMEJでの遺伝子ノックイン法の開発を行なった。この方法を実現するためには、複数のgRNAを1つのベクターで発現するシステムの確立が不可欠と考え、まずはじめにall-in-one CRSIPR/Cas9システムを確立した。この方法は、TALENの構築で採用されているGolden Gate Assemblyを利用した方法で、一度に複数のgRNAの発現ベクターを1つに統合することができる。そこで1つのgRNAとCas9を発現するpX330ベクターを改良し、7つのgRNAが発現するベクターに統合できるシステムを開発した(図3)。このall-in-one CRSIPR/Cas9システムを用いて3つのgRNA(FBL遺伝子の1ヶ所およびPITChベクターの2ヶ所を標的)を発現するベクターを構築した。このベクターとCRIS-PITChベクターをHek293細胞へ今日導入し、薬剤選抜によって挿入クローンを得た。得られた薬剤耐性クローンでは、FBLタンパク質の局在を示す核小体での蛍光が観察された(図4)。さらに、ゲノムDNAを解析したところ、つなぎ目では予期せぬ欠失や挿入が見られるものの正確につながったクローンが含まれていた。

D. 考察

本開発によって、これまで困難であった比較的大きいサイズのDNAを正確に挿入することが可能になった。培養細胞においては、HRとの効率比較においてもMMEJでの効率が2-3倍であることから、実用レベルの方法であることが証明されている。また、同時に薬剤選抜が可能であること、これまでの長いホモロジーアームをもったベクターの構築が必要ないことから、簡便なノックイン法となることが期待される。特に、個体レベルにおいては、これまでES細胞を介した方法しかなく、標的遺伝子座への遺伝子ノックインはマウスでしか成功していなかったため、PITCh法の有用性は高い。さらにCRISPR/Cas9を利用した方法では、HRと同じく、必要な配列のみを挿入できる点でも

有効である。しかしながら、つなぎ目の配列については不正確なものが多く、これはマイクロホモロジー配列が短いことが原因と考えられる。実際、共同研究者が20-40 bpのマイクロホモロジー配列を用いてノックインを行なったところ、正確性と効率が向上したことを報告している。今後は、マイクロホモロジー配列の最適化などを行い、培養細胞と個体での汎用技術に発展させて行くことが必要とされる。

E. 結論

本研究によって、HR に依存しない MMEJ を利用した遺伝子ノックイン法である PITCh 法を確立した。さらに、この方法と Platinum TALEN および CRISPR/Cas9 を組み合わせることによって培養細胞や動物個体において正確な遺伝子ノックインや内在遺伝子の可視化が可能であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watabnabe A, Sakurai H, Yamamoto T, Yamanaka S and Hotta A. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*, 4: 143-154, 2015
- 2) Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, Yamamoto T, Sakuma T and Suzuki K. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nature Communications*, 5: 5560, 2014
- 3) Ochiai H, Sugawara T, Sakuma T and Yamamoto T. Stochastic promoter activation affects Nanog expression variability in mouse

embryonic stem cells. *Scientific Reports*, 4: 7125, 2014

- 4) Ninagawa S, Okada T, Sumitomo Y, Kamiya Y, Kato K, Horimoto S, Ishikawa T, Takeda S, Sakuma T, Yamamoto T and Mori K. EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step. *Journal of Cell Biology*, 206: 347-356, 2014
 - 5) Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K and Yamamoto T. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Scientific Reports*, 4: 5400, 2014
- ### 2. 学会発表
- 1) Yamamoto T, Suzuki K and Sakuma T. Targeted genome editing using Platinum TALENs. 第47回日本発生生物学会, 名古屋, 2014
 - 2) 山本 卓. ゲノム編集を利用した培養細胞や動物での標的遺伝子改変. 第10回肝免疫・ウイルスフロンティア, 東京, 2014.
 - 3) Yamamoto T. Genome editing using Platinum TALENs, Technical Symposium. Application of haploid cell lines and innovative genome-editing technologies in cell biology. 第66回日本細胞生物学会, 奈良, 2014
 - 4) 山本 卓. ゲノム編集の基本原則と研究の現状. 第87回日本生化学会フォーラム次世代ゲノム編集技術の展開, 京都, 2014
 - 5) 山本 卓. ゲノム編集を利用した培養細胞や動物での遺伝子改変, 平成26年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム, 東京2014
 - 6) 山本 卓. ゲノム編集技術の基本原則と現状. 第6回遺伝子組換え実験安全研修会, 東京, 2014

- 7) Yamamoto T. Genome editing cultured cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas. 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, Kyoto, 2014
- 8) 山本 卓. ゲノム編集研究の現状と可能性、第12回日本再生歯科医学会学術大会総会教育講演、徳島、2014
- 9) Yamamoto T. Genome editing in cultured cells and animals using TALENs. JARI & ISEV Japan 6th Annual meeting, Genome editing makes new RNA world, Hiroshima, 2014
- 10) 佐久間哲史, 中出翔太, 西川綾美, 茶山一彰, 鈴木賢一, 山本 卓. マルチgRNAシステムを用いたCRISPR/Cas9によるゲノム編集, 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014
- 11) Yamamoto T. Genome editing in cultured cells and animals using site-specific nucleases, The 8th meeting of Bone Cartilage Frontier, Tokyo, 2014
- 12) Yamamoto T. Targeted Genome Editing in Cultured Cells and Animals. Genome Editing Technology; its Current State-of-Art and Application to Brain Research, Niigata, 2015
- 13) 山本 卓. ゲノム編集研究の現状と可能性. 第20回分子複合医薬研究会, 大阪, 2015

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) DNA結合ドメインを含むポリペプチド、国際出願PCT/JP2014/062518（平成26年5月9日）
- 2) 核酸挿入用ベクター、国際出願PCT/JP2014/079515（平成26年10月24日）

【資料】

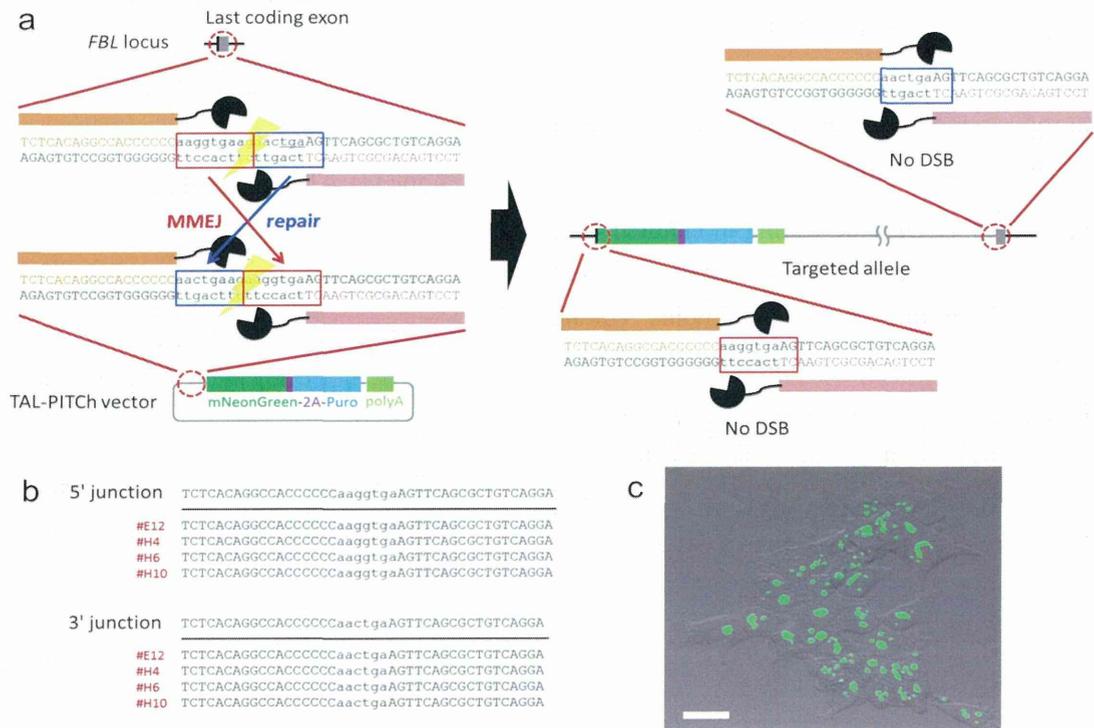


図1. TAL-PITCh 法によるヒト *FBL* 遺伝子座への遺伝子ノックイン (Nakade et al., 2014)
a. TAL-PITCh ベクターの設計と標的遺伝子座へのノックイン、b. 配列解析、c. 蛍光観察

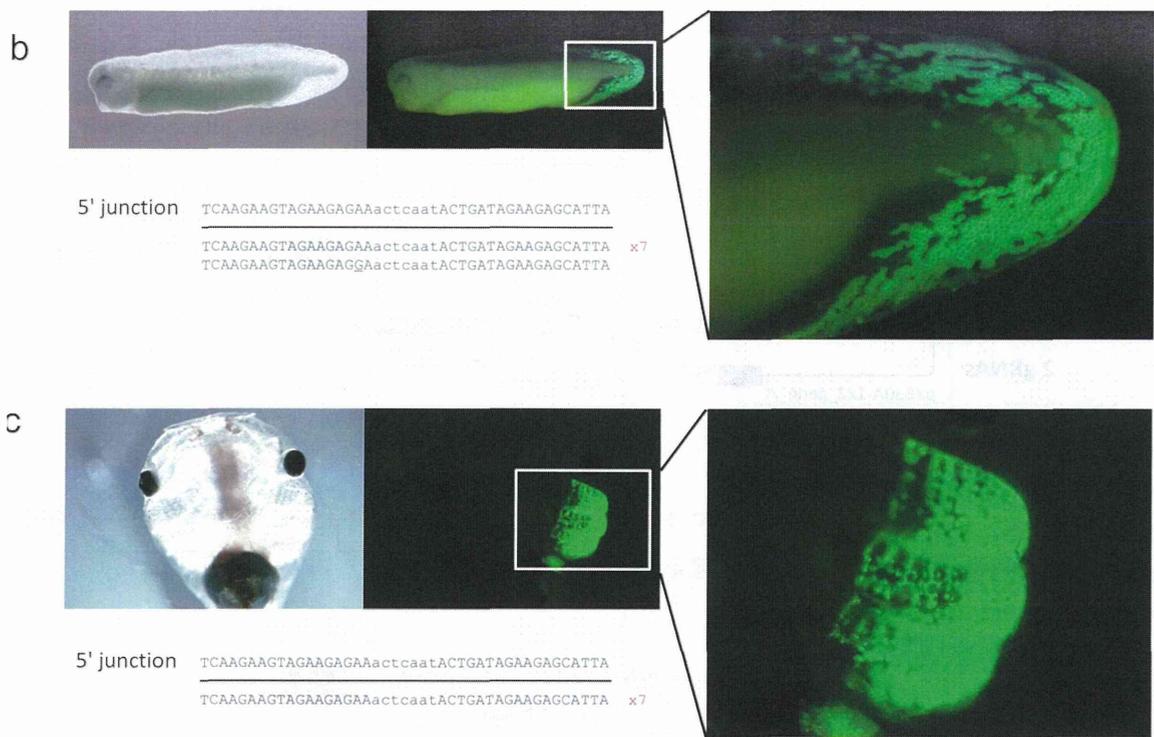


図 2. TAL-PITCh 法によるツメガエルケラチン遺伝子座への遺伝子ノックイン (Nakade et al., 2014)

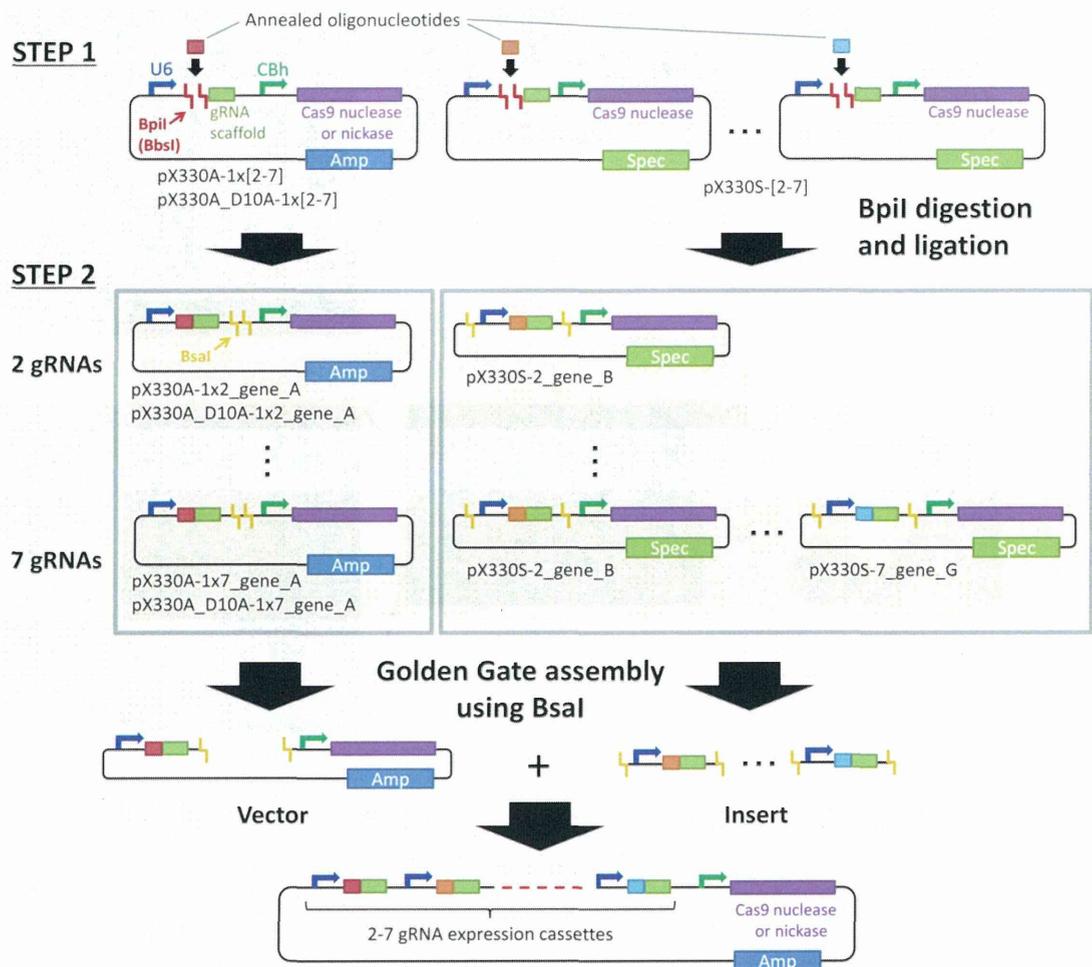


図 3. all-in-one CRSIPR/Cas9 ベクターシステム(Sakuma et al., 2014)