

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 25～27 年度総合分担研究報告書

遺伝子改変法の確立と標準化に関する研究

研究分担者 山本 卓 広島大学大学院 理学研究科

研究要旨

本研究では、部位特異的ヌクレアーゼの 1 つである Transcription activator-like nuclease (TALEN) の DNA 結合モジュールを改変した高活性型 TALEN (Platinum TALEN) を開発し、その作製システム (Platinum Gate System) を確立した。このシステムを用いることによって、高活性型 TALEN の効率的な作製が可能になった。ヒト培養細胞およびアフリカツメガエル卵において Platinum TALEN は効率的に目的の遺伝子に変異を導入することが示された。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、Platinum TALEN と CRISPR-Cas9 を用いて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に成功した。さらに連結部分の正確性を向上させる目的で、DSB 末端より内側のマイクロホモロジー配列を利用する MMEJ 経路である distal MMEJ 介して連結することにより正確な遺伝子ノックインが可能であることを示した。

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

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、より安全で効率の高い部位特異的ヌクレアーゼの作成が求められている。そこで、本研究では、1 年目に部位特異的ヌクレアーゼの 1 つである Transcription activator-like effecto nuclease (TALEN)

を改良した高活性型 TALEN (Platinum TALEN) の開発、Platinum TALEN 作製の標準システムの開発、モデル生物 (本実験ではアフリカツメガエル) での標的遺伝子の破壊を行なった。2 年目には 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。3年目には、PITCh 法のシステム改良を行い、培養細胞での正確な挿入を可能にする CRISPR-Cas9 を用いた改良型 PITCh 法の開発をおこなった。さらに、安全性を調べるために類似配列への変異導入の可能性 (off-target 作用) について検討した。

B. 研究方法

1. 高活性型 TALEN (Platinum TALEN) の開発

これまで広く利用されている Golden Gate 法で作製された TALEN (Golden TALE: ミネソタ大学 Voytas 博士が開発) の DNA 結合モジュールを改良した高活性型 TALEN の開発を行なった。TALEN の結合力を高める方法として、結合モジュールのアミノ酸配列に着目し、アミノ酸配列の改変を行なった。結合モジュールは 34 アミノ酸からなり、12 番目と 13 番目のアミノ酸は、塩基特異的な結合を担う多型配列 (RVD) として知られている。自然界の TALE のアミノ酸配列を調べたところ、この RVD 以外に 4 番目と 32 番目のアミノ酸に多型のあることがわかった。そこで、この 4 番目と 32 番目の多型 (non-RVD variation) を利用した新しい TALEN の作製システムの確立を試みた。

1) RVD の改変と Platinum TALEN の作製

Non-RVD variation をもつモジュールを化学合成によって作製し、pBSK ヘサブクローニングすることによってモジュールプラスミド (p1HDp4HD, p1NGp4NG,

p1NI-p4NI, p1NN-p4NN) を作製した。また、Golden Gate 法による受け手ベクターを pFUS2 および pTALEN_v2 をベースとして作製した。これらのプラスミドを用いて、Golden Gate 法 (Sakuma et al., Genes to Cells, 2013) をベースとした Platinum TALEN の構築法を確立し、培養細胞での評価に用いた。

2) 作製した Platinum TALEN の活性評価

① Single strand annealing (SSA) アッセイ

構築した TALEN の活性を SSA アッセイにより評価した。HEK293T 細胞を 10%FBS の DMEM で培養した。50,000 細胞に 200 ng の TALEN 発現ベクターと 100 ng の SSA のレポーターベクターと 20 ng の pRL-CMV ベクターをリポフェクション法によりトランスフェクションした。24 時間後に Dual-Glo luciferase assay system を用いて活性を評価した。

USA)

② Cell アッセイ

Sakuma らの方法 (Genes to Cells, 2013) の方法に従って Cell アッセイを行なった。約 30,000 の HEK293T 細胞に 200 ng の TALEN 発現ベクターをトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収し、ゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を鋳型として、標的配列をはさむプライマーを作製し、KOD FX Neo を用いて標的配列部分を PCR 増幅した。その後、Cell スクレアーゼにより PCR 産物を反応させ、アガロースゲル電気泳動によって切断の有無を確認した。

2. Platinum TALEN を用いたツメガエルでの標的遺伝子破壊

Platinum TALEN の動物個体における効果を調べる目的で、アフリカツメガエルでの標的遺伝子破壊を試みた。本研究では、表現型を容易に観察できる色素合成に関わるチロシナーゼ遺伝子を破壊し、その効果を観察した。

1) mRNA 合成とカエル卵への顕微注入

アフリカツメガエルのチロシナーゼを破壊する TALEN を上記の方法により構築し、mMessage mMachine T7 Ultra Kit 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 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。

2) RFLP 解析

Platinum TALEN を導入したカエル胚からキアゲン社の Blood and Tissue kit を用いてゲノム DNA を抽出した。標的配列を含む領域を PCR によって増幅し、PCR 産物を制限酵素 *HinfI* で消化し、アガロースゲル電気泳動によりバンドパターンを調べた。

3. 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 5~25bp 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(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。

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。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 遺伝子の蛍光局在が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。

2 つの遺伝子を破壊する Platinum TALEN を mMessage mMachine T7 Ultra Kit 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。

4. 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。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。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。

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

MMEJ は 5~25bp 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、標的遺伝子を切断するための 1 種類の sgRNA とドナーベクターの 2 箇所を切断する 1 種類の sgRNA を利用し、切断面から内側に

生じるマイクロホモロジー(20bp)を利用して標的遺伝子座へのレポーター遺伝子の挿入を試みた。

改良型 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 CRISPR-Cas9 と改良型 PITCh 用ベクターの作製を行なった。FBL の C 末端をコードするエキソンを標的とする複数の sgRNA を発現する all-in-one vector 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。改良型 PITCh 用ベクターには、哺乳類ゲノムには類似配列の存在しない人工の標的サイトを付加し、distal-MMEJ で修復されると 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。CRISPR 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、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。

6. ゲノム編集の安全性評価 (Off-target 解析)

CRISPR デザインツールを用いてヒトゲノム配列中の CRISPR-Cas9 のオフターゲット配列を検索し、上位 3 候補を選抜した。この配列を含む領域を増幅する PCR プライマーをそれぞれ作製し、クローン化したノックイン細胞のゲノム DNA を鋳型

として PCR により増幅した。この増幅産物をシーケンスすることによって類似配列への変異導入の有無を解析した。

C. 研究結果

高活性型 TALEN (Platinum TALEN) の開発

我々は、以前 6 モジュール法によって TALEN を作製する方法を報告している (Sakuma et al., Genes to Cells, 2013)。今回、我々は、4 つのモジュールを連結する方法を採用し、この方法で non-RVD variation をもった TALEN (Platinum TALEN) の効率的な作製方法 (Platinum Gate TALEN construction system) を確立した (図 1)。基本的な方法は、既存の Golden Gate 法と同様であるが、第一段階の連結を 4 モジュールに制限することで、成功率を向上させることに成功した。オリジナルの 10 モジュール法での成功率は 10% 程度であったが、4 モジュールでの成功率は 100% であった。

ヒト HPRT1 遺伝子座を切断する Platinum TALEN を作製し、SSA アッセイおよび Cell アッセイにより、活性を評価したところ、これまでの TALEN に比べて、高い活性を示した。また、ヒト ataxia telangiectasia mutated (ATM) と adenomatous polyposis coli (APC)、および eGFP 遺伝子に関して SSA アッセイを、ATM 遺伝子と APC 遺伝子に関しては Cell アッセイによって活性が十分高いことを確認した (図 2)。

Platinum TALEN を用いたツメガエルでの標的遺伝子破壊

Platinum TALEN の動物個体での遺伝子破壊効果を調べるために、アフリカツメガエルのチロシナーゼ遺伝子(*tyr*)破壊を試みた。受精卵に Platinum *tyr* TALEN を顕微注入したところ、多くのカエル胚でアルビノとなることが示された (図 3 B)。加えて、毒性も低下し、これまでの TALEN で見られたいた奇形胚は、Platinum TALEN 導入胚ではほとんど見られなかった。さらに、RFLP 解析によって、ほぼ 100% で変異導入されていることが明らかになった (図 3 D)。

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 4)。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 5)。

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 CRISPR/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 6)。この all-in-one CRISPR/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 7)。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。

CRISPR-Cas9 を用いた distal-MMEJ を介した遺伝子ノックイン法の開発

FBL 切断および改良型 PITCh 用ドナーを切断する sgRNA を設計し (図 8)、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 と同程度の高い活性を示した。これらの sgRNA と Cas9 の発現ベクターと改良型 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 タンパク質の核小体に局在を蛍光で観察することができた (図 9)。さらに、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、5'側では 80%、3'側では 50%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 (図

9)。

ゲノム編集の安全性評価 (off-target 解析)

CRISPR-Cas9 を用いた改良型 PITCh 法で作製した遺伝子ノックイン細胞のクローンを樹立し、そのゲノムを用いて類似配列の候補について変異が導入されていないかどうかをシーケンス解析したところ、3種類の sgRNA に対して3箇所ずつ合計9箇所に変異は導入されていないことがわかった (図 10)。

D. 考察

本研究の結果から、no-RVD variation の利用によって TALEN の活性を高めることが示された。これまで、多くのグループが N 末や C 末の構造やヌクレアーゼ部分の改変を行なってきたが、DNA 結合モジュールの構造改変による活性上昇の報告は、本研究が初めての報告である。しかしながら、non-RVD variation が結合活性を上昇させる機構については明らかにされていない。今後、X 線結晶解析などの構造解析によって、その原理を明らかにする必要がある。

これまで、TALEN の作製には Vytas 博士によって提供されている Golden Gate キットが主に使われて来た。この方法は、2 スップの安定した作製システムである一方、研究室によって作製効率が大きく異なることが知られていた。その原因は、第一段階で 10 個のモジュールを同時に連結する成功率が、研究室によってばらつくことにあると考えられる。今回、我々は同時に 4 個のモジュールを連結する方法に改良したことで、多くの研究者が失敗する

ことなく TALEN を作製できるシステムへ改良できたと考えている。作製できるモジュール数は、これまでの 31 モジュールから 21 モジュールと制限されるが、15-20 モジュールの TALEN で高い特異性を確保できるので問題とはならない。

様々な生物において、部位特異的ヌクレアーゼを用いた遺伝子改変が報告されているが、生物種や細胞種によっては毒性の高いことが報告されている。これは、切断効果をも高めるため、大量のヌクレアーゼを導入したことが原因である可能性が高い。本研究で開発した Platinum TALEN は、その活性の高さから、導入量を下げることが可能なことから毒性を下げることに成功した。

さらに本開発によって、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も多く、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 20-40bp 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。

また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。これまでの PITCh 法でつなぎ目の配列について不正確なものが多かったが、これは切断面の短い配列を利用した proximal-MMEJ を利用していたことが原因で、今回 distal-MMEJ を利用する改良型を利用することによって、ノックイン効率と正確性が向上した。今後は、マイクロホモロジー配列の長さの最適化などを行い、培養細胞および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、高活性型の部位特異的ヌクレアーゼの開発と作製システムの確立に成功した。さらに、このシステムで作製した Platinum TALEN は培養細胞や動物個体において高い変異導入効果を持つことが示された。

また、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。さらに、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 法を改良することによって正確性の高い方法の確立に成功した。さらに、この方法での改変によって、予期せぬ変異導入は低いことが示された。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki KI, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S and Yamamoto T. Efficient TALEN construction and evaluation methods for humancell and animal applications. *Genes Cells*, 18: 315-326, 2013
- 2) Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, Suzuki K, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S and Yamamoto T. Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Scientific Reports*, 3: 3379, 2013
- 3) Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Kudo Y, Asami K, Ogawa A, Watanabe A, Kajii T, Yamamoto T and Matsuura S. TALEN-mediated single-base pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 1461-1466, 2014
- 4) Sakane Y, Sakuma T, Kashiwagi K, Kashiwagi A, Yamamoto T and Suzuki K. Targeted mutagenesis of multiple and paralogous genes in *Xenopus laevis* using two pairs of TALENs. *Dev Growth Differ*, 56: 108-114, 2014
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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

- 8) Sakuma T, Nakade S, Sakane Y, Suzuki KT and Yamamoto T. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nature Protocols*, 11: 118–133, 2016
- 筋ジストロフィー患者由来 iPS 細胞のゲノム手術、第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ「ゲノム編集研究の新展開」、神戸、2013
- 7) 山本 卓, 高活性型 TALEN の開発と哺乳類培養細胞および動物での標的遺伝子改変、第 65 回日本生物工学会シンポジウム「次世代植物バイオテクノロジー」、広島、2013

学会発表

- 1) 山本 卓, Platinum TALEN の開発と様々な動物におけるゲノム編集、理研シンポジウム「ゲノムデザイン技術と疾患モデル研究」、つくば、2013
- 2) Yamamoto T, Targeted genome editing using highly-active TALENs、京都大学 iPS 研究所セミナー、京都、2013
- 3) Sakuma T, Woltjen K, Hosoi S, Suzuki K, Kawahara A, Okada Y, Ochiai H, Matsuura S and Yamamoto T, Improved TALEN construction and evaluation methods for animal and human cell applications, Genome Engineering-Research & Applications, Italy, 2013
- 4) Sakuma T and Yamamoto T, Platinum Gate TALEN: Establishment of highly-active TALEN construction system, 46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, Matsue, 2013
- 5) 山本 卓, 鈴木賢一、相田知海、田中光一、佐久間哲史、高活性型 TALEN を用いたゲノム編集、第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ「ゲノム編集研究の新展開」、神戸、2013
- 6) 李 紅梅, 藤本直子, 笹川典子, 白井紗矢, 山本 卓, Woltjen Knut, 櫻井英俊, 山中伸弥, 堀田秋津. TALEN や CRISPR/Cas9 を用いたデュシエンヌ型
- 8) 山本 卓, ゲノム編集技術を利用した培養細胞および動物個体での標的遺伝子改変、奈良県立医科大学講演会、橿原、2013
- 9) 山本 卓, ゲノム編集革命-人工ヌクレアーゼを利用した遺伝子改変技術の開発、平成 25 年度広島バイオフィォーラム「ここまで進んだゲノム科学とその活用」、広島、2013
- 10) 山本 卓, ゲノム編集技術を利用した培養細胞や動物での遺伝子改変、第 15 回京都心血管代謝セミナー、京都、2013
- 11) 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
- 12) 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.
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) Yamamoto T. Genome editing cultured cells and animals and 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) Yamamoto T. Genome editing in cultured cells and animals using site-specific nucleases, The 8th meeting of Bone Cartilage Frontier, Tokyo, 2014
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 山本 卓. ゲノム編集の応用と将来. 平成27年度広島バイオフォーラム, 広島, 2015.
- 25) 山本 卓. ゲノム編集の基本原則と医学分野での可能性. 日本人類遺伝学会第60回対会, 東京, 2015.
- 26) 山本 卓. ゲノム編集技術の開発と応用 (基盤技術から遺伝子治療・生物育種まで). 平成27年度先端技術研修 (特許庁), 東京, 2015.
- 27) 山本 卓. ゲノム編集が生命科学に革新を起こす. 読売フォーラム, 東京, 2015
- 28) 山本 卓. ゲノム編集研究の現状と可能性, 第17回KNU研究推進セミナー (金沢医科大学), 金沢, 2015
- 29) 山本 卓. TALENやCRISPR/Casを用いたゲノム編集研究の現状と動向, 遺伝子デリバリー研究会第15回シンポジウム, 東京, 2015
- 30) 山本 卓. 部位特異的ヌクレアーゼを用いた培養細胞や動物でのゲノム編集, 第62回日本実験動物学会総会シンポジウム, 京都, 2015
- 31) 山本 卓. ゲノム編集の基本原則と研究の現状, 第88回日本内分泌学会, 東京, 2015

G. 知的所有権の出願・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】

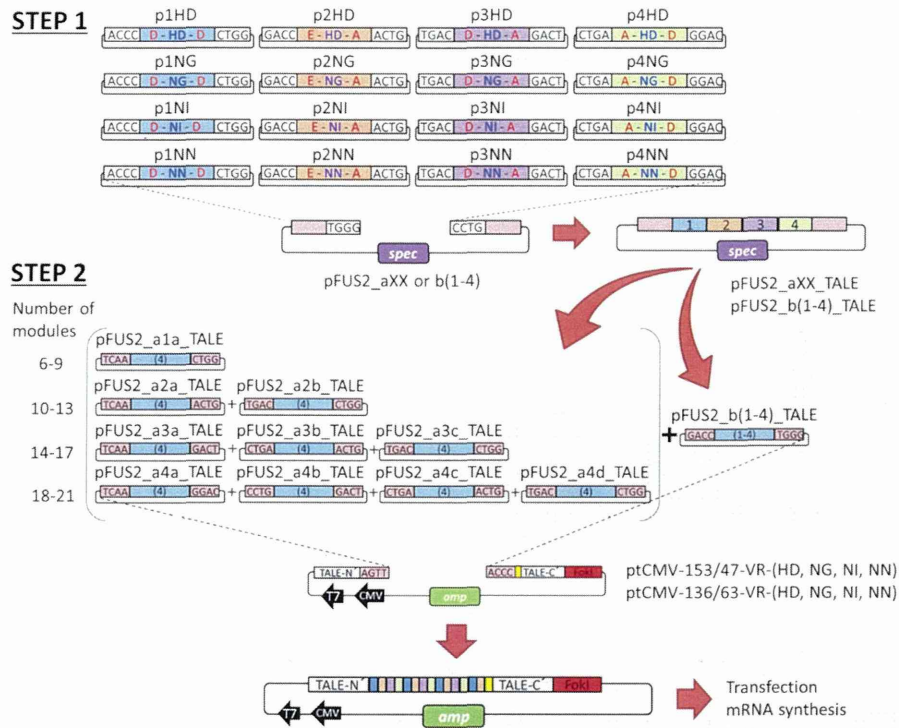


図1. 4モジュール連結を基盤とした Platinum Gate TALEN 作製システム

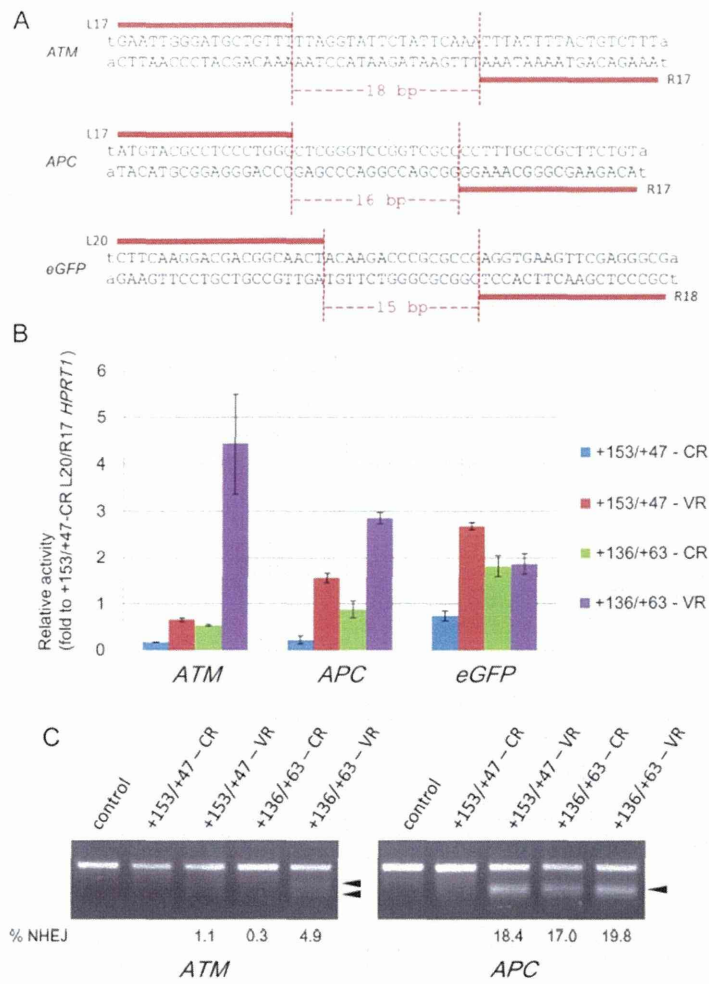


図2. Platinum TALENのSSAアッセイおよびCeIIアッセイによる活性評価

A: 3種類の遺伝子のTALEN標的配列とスペーサーの長さ

B: Golden TALENとPlatinum TALENのSSA活性の比較

C: Golden TALENとPlatinum TALENのCeII活性の比較

矢印のバンドが活性の高さを示す。

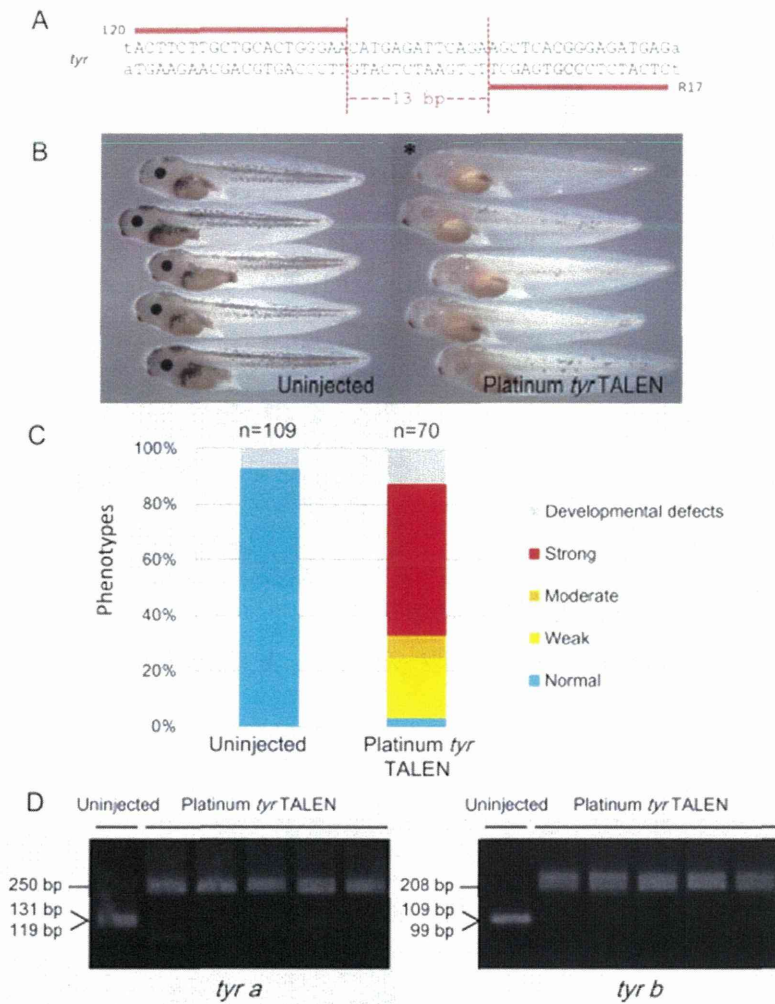


図 3. Platinum TALEN を用いたツメガエル標的遺伝子の破壊

A: *tyr* 種類の遺伝子の TALEN 標的配列とスペーサーの長さ

B: *tyr* TALEN を導入した胚の写真

C: アルビノ胚の比率

D: RFLP による変異導入効率の解析

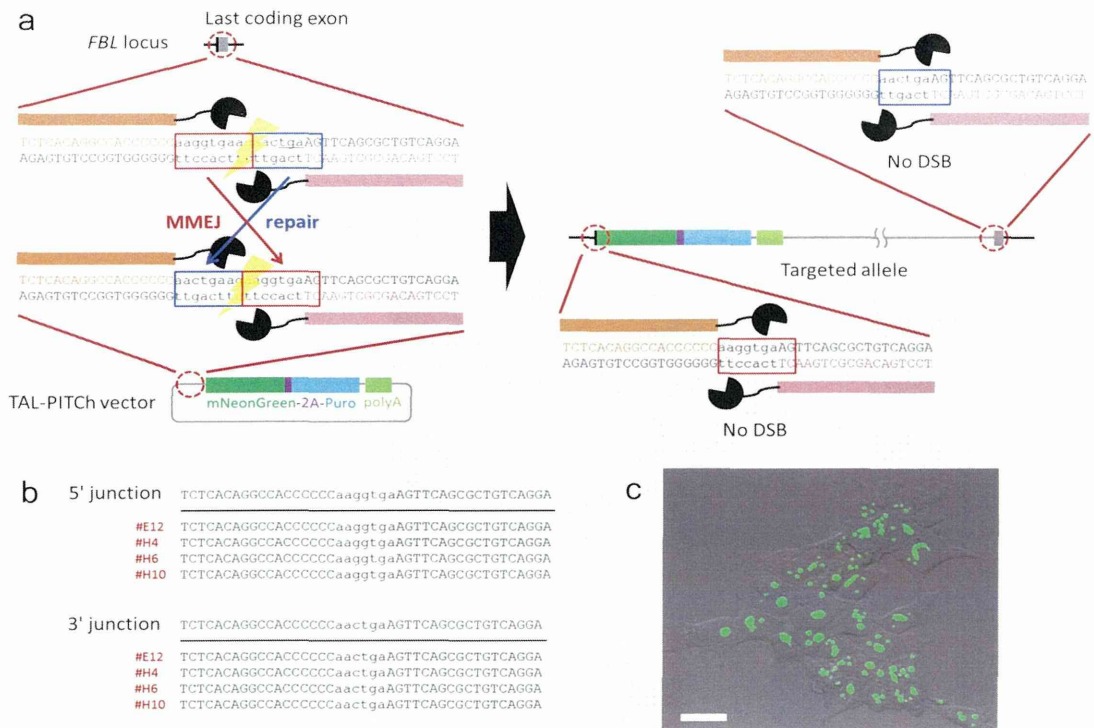


図4. TAL-PITCh 法によるヒト FBL 遺伝子座への遺伝子ノックイン

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

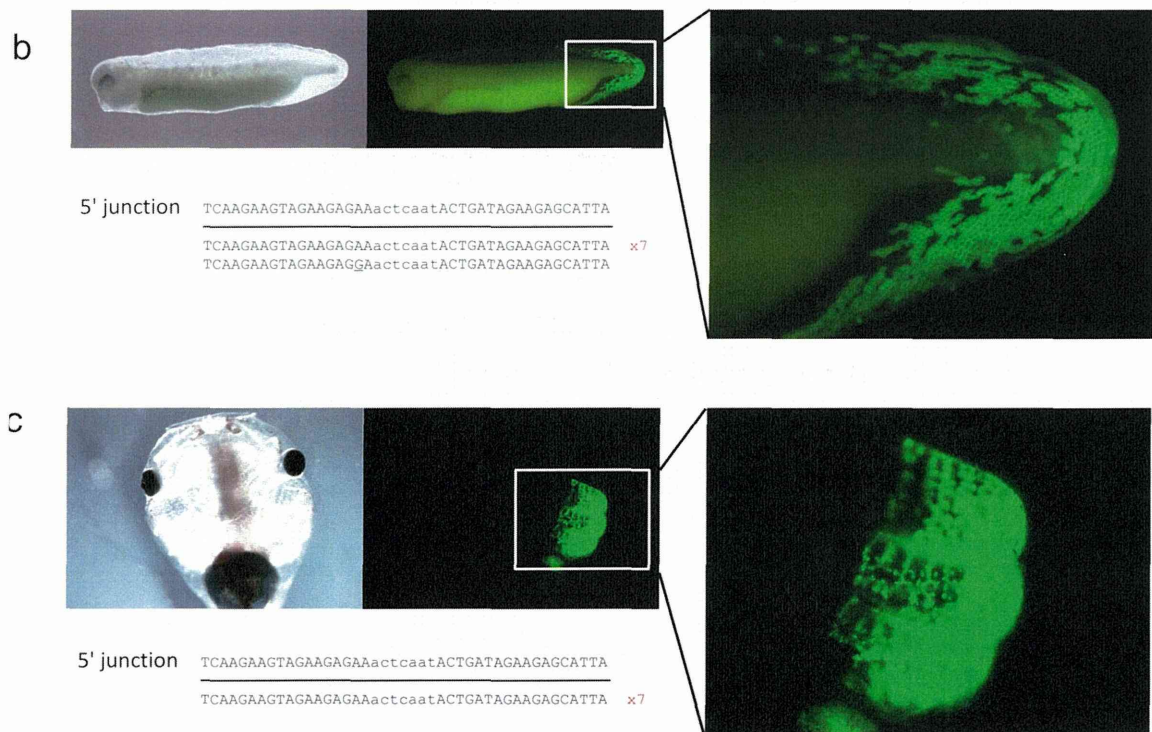


図5. TAL-PITCh 法によるツメガエルケラチン遺伝子座への遺伝子ノックイン

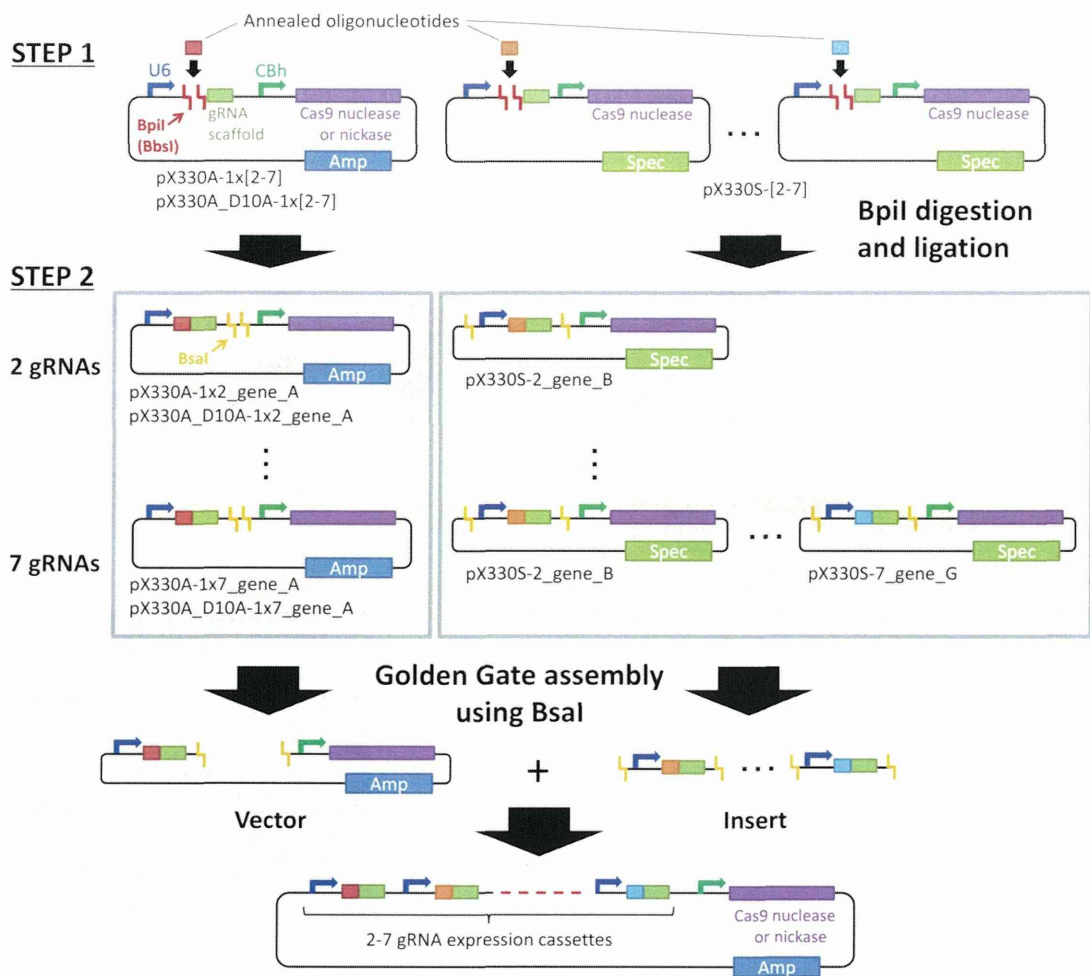


図 6. all-in-one CRSIPR/Cas9 ベクターシステム

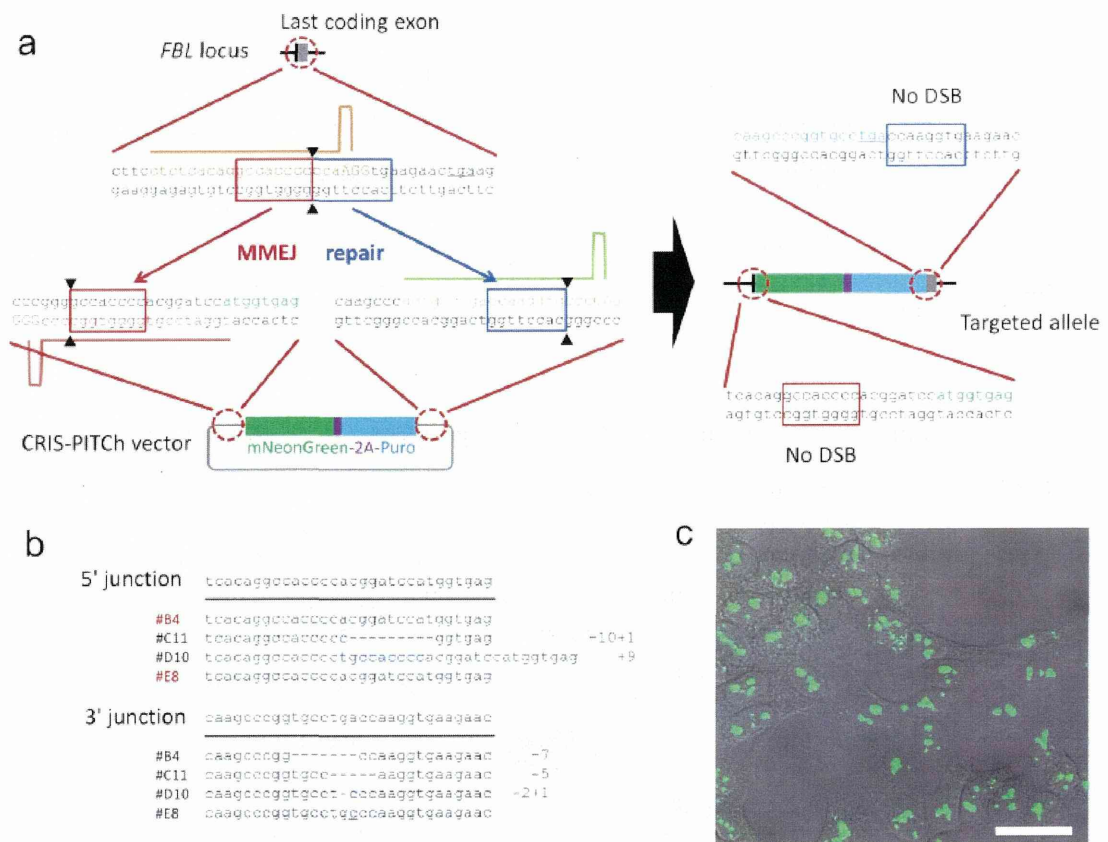


図7. CRIS-PITCh法によるヒト *FBL* 遺伝子座への遺伝子ノックイン

a. CRIS-PITCh ベクターと標的遺伝子座へのノックイン、b. 配列解析 c. 蛍光観察

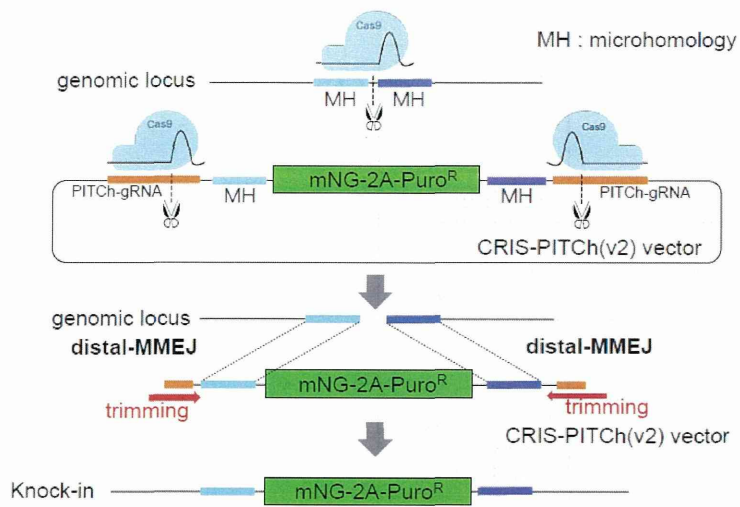


図 8. 改良型 PITCh 法の原理

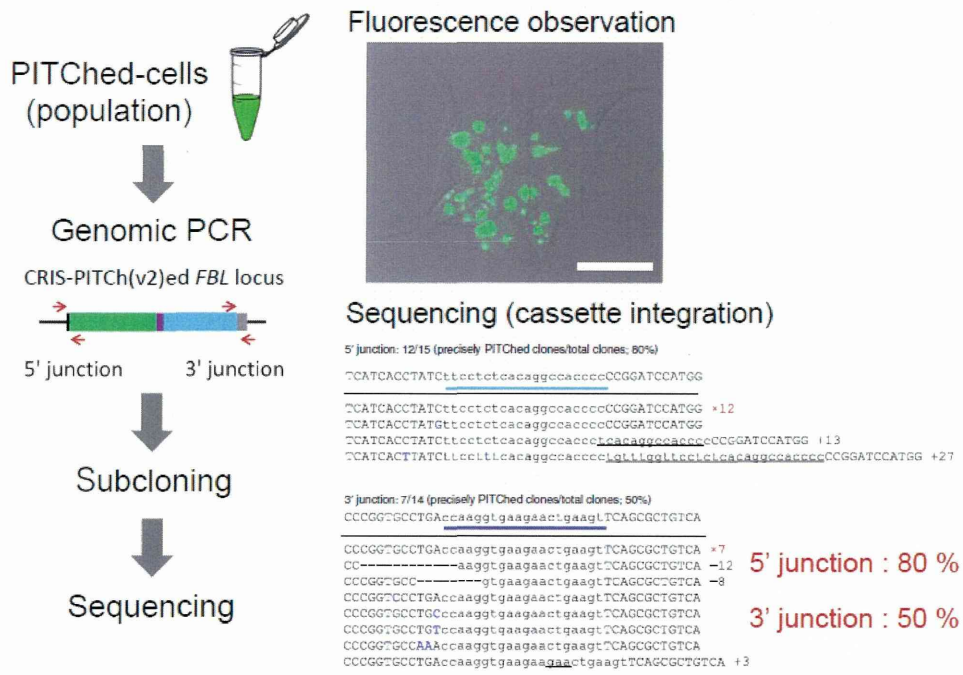


図 9. 改良型 PITCh 法による FBL 遺伝子座への遺伝子ノックイン