

「ゲノム編集法のモデル動物作製と遺伝子治療等への応用を目指した研究」

【研究概要】

CRISPRゲノム編集技術は、標的とするゲノムDNA配列を自在に改変することを可能とする技術として幅広い分野に応用されているが、いくつかの解決すべき課題も残されている。例えば、標的配列だけでなく標的配列に類似した配列まで切断してしまうオフターゲット切断が大きな問題点の一つである。また、CRISPRゲノム編集技術を用いて新しいDNA配列の挿入（ノックイン）を行う際には、オフターゲット切断の他に、ゲノム上の標的領域以外の箇所へのドナーDNAの挿入（ランダム挿入）も問題となる。一般的には、二本鎖DNA (dsDNA) よりも一本鎖DNA (ssDNA) のドナーを用いた方がランダム挿入の頻度が少ないと考えられている。我々はこれまでに、長鎖ssDNAをドナーDNAとして用いた高効率ノックイン法であるEasi-CRISPR法を開発し、それを用いて数多くのモデル動物を作製してきた。現在Easi-CRISPR法は、国内外で多数利用されているポピュラーな手法の一つとなっているが、ssDNAをドナーに用いた場合でもランダム挿入が生じることが分かってきた。我々の実験において作製したレポーターマウスにおいても、ドナーDNAのランダム挿入の存在が示唆された。しかしながら、ssDNAドナーを用いた際に、どのような機序でランダム挿入が起こるのか、および挿入部位や挿入のされ方の特徴に関しては、これまでにあまり知られていない。

今回我々は、次世代シーケンス (NGS) 技術を活用し、Mmp9レポーターマウス作製時 (稲垣豊教授との共同研究) に得たファウンダーマウスにおけるオフターゲット候補部位 (OCS) の探索、およびドナーDNAのランダム挿入部位 (ICS) の探索と特徴づけ、を行なった。その際に、Cas9切断箇所付近に近接した配列を解析できるCIRCLE-seq法を独自に改良した方法 (CRISPR-KRISPR法と命名) を用いた (図1)。なお、本研究は生命科学統合支援センターのメンバー (写真) を中心として共同研究として進められたものである。

【研究成果】

独自のCRISPR-KRISPR法を、レポーターマウス作出実験で得たファウンダーマウス個体におけるOCS探索およびICS探索に適用した (図1)。CIRCLE-seq法と異なる点はゲノムの断片化処理の部分であり、CIRCLE-seq法では超音波破碎による物理的なDNA切断方法を用いているのに対し、CRISPR-KRISPR法では酵素切断法を用いる。これにより、より少量のゲノムDNA量 (3µg) で一連の実験を行うことができる (CIRCLE-seq法では25µg以上を必要とする)。また、本手法ではDNA断片化装置が不要であると言った利点もある。

野生型マウスおよびMmp9レポーターマウス作出実験で得た11個体のファウンダーマウスを供試し、CRISPR-KRISPR法により802箇所のOCSと23箇所のICSを見出した。選抜した50箇所のOCSについてアンプリコンシーケンシングにより検証したところ、ファウンダーマウスにおいてオフターゲット変異は認められなかった。またICSに関しては、PCR法と塩基配列確認により最終的に6箇所のランダム挿入部位を検出したが、その配列を詳細に解析したところ、これらの配列はゲノムの欠失や重複、レトロトランスポゾンなどのリピート配列を伴って挿入されていることが明らかとなった (図2)。検出されたOCSとICSのオーバーラップは観察されず、Cas9によるオフターゲット切断と関係なくランダム挿入が生じている可能性が示唆された。

CRISPR-KRISPR法は、従来のCIRCLE-seq法に要するDNA量より少量のDNAでも実施可能であり、耳片由来のDNAでも十分に解析できる手法である。CRISPRゲノム編集によって得られたサンプルに存在するオフターゲット部位とランダム挿入部位を同じ手順で解析することが可能である。これにより、意図しない編集を有したファウンダー個体を除外して適切なファウンダー個体を選別することなどに活用できる。

【今後の展望】

CRISPR-KRISPR法は、loxPのようなタグ配列の挿入やアデノ随伴ウイルス (AAV) による遺伝子デリバリー実験におけるAAVベクター挿入など、各種ゲノム編集実験の評価に利用できるものと考えられる。今回使用したNGSのリード長は短いものであったことから (150bp)、現時点では短い領域の配列の解析にしか用いていないが、今後、本手法にロングリードシーケンサーを活用することで、LINE配列のような重複配列や長いホモロジーアームを含むドナー配列のランダム挿入部位の検出にも適用可能であると考えられ、より多くのゲノム編集実験の評価や品質管理に応用可能な手法となると期待される。

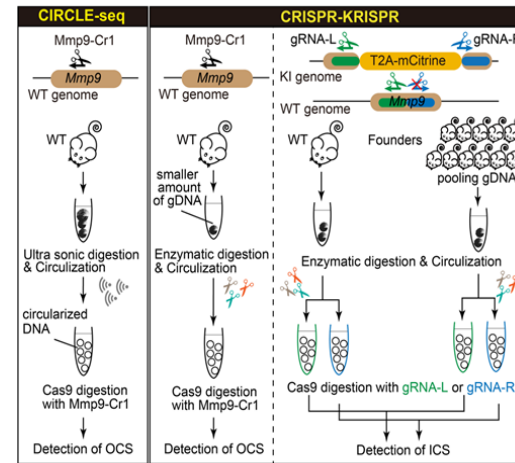


図1 : CIRCLE-seq法とCRISPR-KRISPR法の比較
 オリジナルのCIRCLE-seqは、25ugのゲノムDNAを超音波破碎により断片化し、環状化DNAを作成する (左パネル)。CRISPR-KRISPRは、~3ugのゲノムDNAを用いてDNA断片化酵素により断片化する (右パネル)。CRISPR-KRISPRは、同一の方法でOCS検出とICS検出が可能な手法である。ICS検出に適用するにはドナーDNA上にgRNAを設計する。

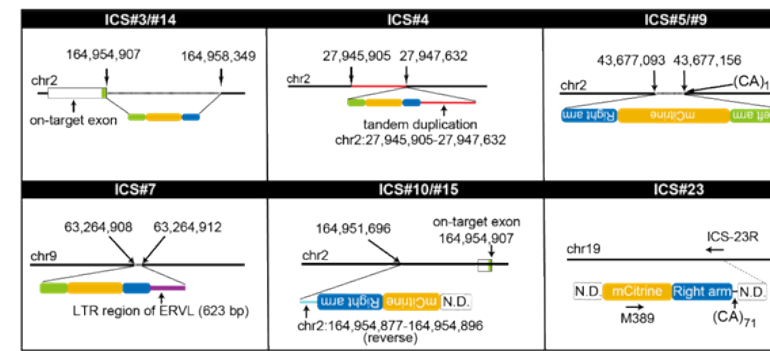
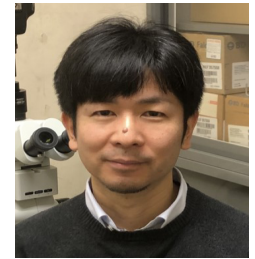


図2 : PCR断片のシーケンシングにより確認されたランダム挿入箇所の構造

Selected Papers

- Sato M., Nakamura A., Sekiguchi M., Matsuwaki T., Miura H., Gurumurthy C.B., Kakuta S. and Ohtsuka M. Improved Genome Editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery (i-GONAD): Protocol Steps and Additional Notes. *Methods in Molecular Biology*, 2631:325-340. (2023)
- Kobayashi R., Kawabata-Iwakawa R., Sugiyama M., Oyama T., Ohtsuka M., Horii T., Morita S., Nishiyama M. and Hatada I. Multiplexed genome editing by in vivo electroporation of Cas9 ribonucleoproteins effectively induces endometrial carcinoma in mice. *International Journal of Cancer*, Jun 1;152(11):2331-2337 (2023)
- Tanaka M., Yokoyama K., Hayashi H., Isaki S., Kitatani K., Wang T., Kawata H., Matsuzawa H., Gurumurthy C.B., Miura H. and Ohtsuka M. CRISPR-KRISPR: a method to identify on-target and random insertion of donor DNAs and their characterization in knock-in mice. *Genome Biology*, 23, 228 (2022)
- Takahashi R., Takahashi G., Kameyama Y., Sato M., Ohtsuka M. and Wada K. Gender-difference in hair length as revealed by CRISPR-based production of long-haired mice with dysfunctional FGF5 mutations. *Int. J. Mol. Sci.* 23(19), 11855 (2022)
- Gurumurthy C.B., Quadros RM. and Ohtsuka M. Prototype mouse models for researching SEND-based mRNA delivery and gene therapy. *Nat Protoc* 17, 2129–2138 (2022)
- Hasegawa A., Mochida K., Nakamura A., Miyagasako R., Ohtsuka M., Hatakeyama M. and Ogura A. Use of anti-inhibin monoclonal antibody for increasing the litter size of mouse strains and its application to in vivo-genome editing technology. *Biol Reprod.* 9;107(2):605-618 (2022)
- Niwa Y., Kamimura K., Ogawa K., Oda C., Tanaka Y., Horigome R., Ohtsuka M., Miura H., Fujisawa K., Yamamoto N., Takami T., Okuda S., Ko M., Owaki T., Kimura A., Shibata O., Morita S., Sakai N., Abe H., Yokoo T., Sakamaki A., Kamimura H., Terai S. Cyclin D1 Binding Protein 1 Responds to DNA Damage through the ATM–CHK2 Pathway. *Journal of Clinical Medicine.*11(3):851.(2022)
- Sato, M., Ohtsuka, M., Inada, E., Nakamura, S., Saitoh, I., & Takabayashi, S. Recent Advances in In Vivo Genome Editing Targeting Mammalian Preimplantation Embryos. edited by Yuan-Chuan Chen, *CRISPR Technology IntechOpen*. (2022) <https://doi.org/10.5772/intechopen.106873>



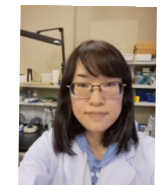
プロジェクトリーダー:大塚正人
Ohtsuka Masato
医学部医学科基礎医学系分子生命科学 教授



黒崎亜希
Kurosaki Aki
分子生命科学 実験補助員



三浦浩美
Miura Hiromi
分子生命科学 助教



横山圭子
Yokoyama Keiko
生命科学統合支援 技術職員



夜久優夢
Yaku Yumu
分子生命科学 大学院生



田中政之
Tanaka Masayuki
生命科学統合支援 技術職員