

学位論文要旨

Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells using TALENs and CRISPR/Cas9

(細胞における TALEN や CRISPR/Cas9 を用いたドナーDNA のマイクロホモロジー媒介末端結合依存的な挿入)

広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻

氏名 中出 翔太

ゲノム編集法は、人工 DNA 切断酵素がゲノム上の特定の配列を認識して DNA に二本鎖切断 (DNA double-strand break: DSB)を導入することにより、標的遺伝子の破壊 (ノックアウト)や外来遺伝子の挿入 (ノックイン)を行う方法である。このうちゲノム編集法を用いたノックインでは、導入された DSB が姉妹染色分体を鋳型として修復する相同組換え (Homologous recombination: HR)を利用して、外来遺伝子を挿入するのが一般的な手法である。しかしながら、この手法では HR 頻度が細胞種によって著しく異なるため、高効率にノックインが可能な種類が限定される。また、ドナーベクターに 1 kb 程度の相同配列を付与しなければならないため、構築に時間と労力を要する。そこで本論文では、HR とは異なった DSB 修復経路の一つである Microhomologies-mediated end-joining (MMEJ)を利用した簡便かつ高効率なノックイン法を開発し、この方法を (Precise Integration into Target Chromosome) PITCh 法と命名した。

MMEJは、DSB末端の近傍に存在する 5-25bpの短い相同配列 (マイクロホモロジー)が連結することによって修復される DNA 修復経路である。MMEJ を利用したノックインで優れているのは、HR は細胞周期が S/G2 期でしか生じないのに対して、MMEJ は S/G2 期以外のすべての細胞周期で生じる点にある (Taleei & Nikjoo, 2013)。これにより、HR を利用した方法と比較してノックインのための修復頻度が上昇し、細胞分裂の頻度が低い細胞でもノックイン効率が改善できると予測される。また、MMEJ を用いればドナーベクターに要求される相同配列が格段に短くなるため、その構築も格段に簡便になると考えられる。

本研究では、人工 DNA 切断酵素によって、ゲノムと PITCh 用ドナーベクターの両方に DSB を導入し、これによって露出したマイクロホモロジーを介して MMEJ を利用した正確な連結を行う新規ノックイン方法 (PITCh 法)の開発を試みた。まず私は、PITCh 法の実用性を証明するため、人工 DNA 切断酵素の一つである transcription activator-like effector nucleases (TALEN) を用いた実験を行った (TAL-PITCh 法)。TALEN は、標的配列に結合する TALE ドメインと、DNA を切断する制限酵素 FokI ドメインから構成され、FokI が二量体を形成することによって DSB を導入する。そのため、TAL-PITCh 用ベクターには、TALEN の標的配列を一つ組み込み、二量体を形成するために必要な領域 (スペーサー配列)にマイクロホモロジーを適用することで、プラスミド全体が挿入できるように設計した。この設計によって、ノックインが生じるとスペーサー配列が消失するため、再切断が生じなくなる。また、ドナーベクターの余分な配列を除いた発現カセットのみを挿入する場合は、発現カセットの両端に標的配列を二つ組み込むことも可能である。ここでは、正確なノックインが生じたことを簡便に確かめるために、TAL-PITCh ドナーベクターに緑色蛍光タンパク質 (mNeonGreen)遺伝子と puromycin 耐性遺伝子を組み込み、核小体に局在する fibrillarin (*FBL*)遺伝子の C 末端コード領域に mNeonGreen 遺伝子が挿入されるように設計した。MMEJ によってドナーベクターが正しく挿入されると、*FBL* の内在プロモーターによって mNeonGreen が発現し、緑色蛍光が核小体に局在するとともに、puromycin 耐性となる。

作製した TALEN 発現ベクターと TAL-PITCh ドナーベクターを HEK293T 細胞に共導入したところ、72 時間後に核小体に緑色蛍光が観察され、さらに 7 日間の薬剤選抜とシングルセルクローニングによってノックイン細胞のクローンを得ることができた。クローンのゲノム DNA からノックイン配列の連結部を genomic PCR すると、67%のクローンで連結部が正しく増幅され、シーケンス解析によって、すべてのクローンにおいて MMEJ によって正確に挿入されていることがわかった。また、TAL-PITCh 法

によって β -Actin (*ACTB*) 遺伝子座においても正確なノックインが可能であることも確認した。ゲノムへのランダムなドナーの挿入が生じているかどうかをサザンブロット解析により調べたところ、標的遺伝子座のみへのドナーの挿入が確認され、ランダムな挿入は見られなかった。さらに、HR を利用した従来法と PITCh 法の薬剤選抜後のコロニー数を比較したところ、PITCh 法では約 2.5 倍のコロニーが観察された。これにより、PITCh 法は従来法よりも高効率であることが証明された。

次に、現在最も汎用的に用いられる人工 DNA 切断酵素である clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated 9 (Cas9) を利用した PITCh 法が可能かどうかを、TAL-PITCh 法と同様の方法で確認した (CRIS-PITCh 法)。CRISPR/Cas9 は guide RNA (gRNA) によって標的配列を認識するため、同時に複数の標的を設定できる。そのため、CRIS-PITCh ドナーベクターでは、挿入したい配列の両端に CRISPR/Cas9 の標的配列と 10 bp 程度のマイクロホモロジーを付加し、ドナーベクターの余分な配列を除いたカセットを *FBL* の C 末端に挿入できるよう設計した。また、同法ではノックインが起こると gRNA の標的配列が消失するため、再切断が起こらない。作製した CRISPR/Cas9 ベクターと CRIS-PITCh ドナーベクターを HEK293T 細胞に導入したところ、TAL-PITCh 法と同様に緑色蛍光が核小体に局在するとともに、薬剤耐性を示すクローンが得られた。クローンのゲノム DNA からノックイン配列の連結部を genomic PCR したところ、80% のクローンで正しく増幅された。しかしながら、シーケンスによってこれらの配列を確認したところ、連結部の 5' 側は 40% のクローンのみで正確な挿入が観察され、3' 側についてはすべてのクローンに欠失や挿入が見られた。

そこで、CRIS-PITCh 法に改良をすることにより、高効率かつ正確性が高い CRIS-PITCh(v2) 法の開発を試みた。Xiong らは (2015)、DSB 末端より内側のマイクロホモロジーを介して生じる MMEJ (Distal-MMEJ) が、直近で生じる MMEJ (proximal-MMEJ) と比較して効率が低いことを報告している。そこで、これまでの CRIS-PITCh 法で CRISPR/Cas9 の標的配列の直近にマイクロホモロジーを設計していたのに対して、CRIS-PITCh(v2) 法では標的配列よりも内側にマイクロホモロジーを設計した。さらに、上記の設計を用いることによって、ベクターの gRNA 標的配列とマイクロホモロジーを分離できるため、挿入したい遺伝子座によってドナーベクターの標的配列を変更する必要がなく、マイクロホモロジーの長さの延長が可能となった。そこで CRIS-PITCh(v2) 法では、マイクロホモロジーを 20 bp と 40 bp に延長し、さらに CRIS-PITCh(v2) ドナーベクター全体と発現カセットのノックインを試みた。CRISPR/Cas9 ベクターと CRIS-PITCh(v2) ドナーベクターを HEK293T 細胞に導入したところ、ドナー全体と発現カセットの両方で核小体に局在した緑色蛍光が確認された。また、これらのノックインの連結部の正確性は 80% 程度であり、通常の CRIS-PITCh 法と比較して格段に向上していることがわかった。一方、20 bp と 40 bp のマイクロホモロジーでは連結部の正確性に大きな差は見られなかった。これらの結果から、Distal-MMEJ を利用することにより連結部の正確性は上昇することが示唆された。

最後に、PITCh 法により作製したノックイン細胞において、標的配列以外への変異導入 (オフターゲット作用) が生じているかどうかを確認した。PROGNOS tool を用いて TALEN によるオフターゲット配列を検索し、このうち第 6 候補までをクローンのゲノム DNA からシーケンスによって確認した。また、CRISPR/Cas9 についても、CRISPR design tool を用いて検索したオフターゲット配列を第 3 候補まで選び、同様にシーケンスによって確認した。その結果、すべての候補でオフターゲット作用は確認されなかった。

以上の結果より、私は、MMEJ を利用して従来法より簡便で高効率なノックイン法である PITCh 法を開発することに成功した。今回の PITCh 法によるノックインでは、5' 側の連結部の正確性が 3' 側よりも高いことがわかった。これは、5' 側にフレームシフト変異が生じると、その下流の挿入配列にコードされた puromycin 耐性遺伝子の機能が損なわれることが原因と推測される。3' 側の連結部に正確な挿入を行うためには、MMEJ 関連遺伝子を共発現して、MMEJ 効率を上昇させるなどの改良が必要と考えられる (Truong et al., 2013; Benardo et al., 2009)。また、MMEJ を含む DNA 修復経路は互いに拮抗的に作用しているため、他の DNA 修復経路に関連する因子群の阻害も効率上昇に有効である可能性が考えられる。これらの改良によって正確性を高めることが実現できれば、PITCh 法はヒト培養細胞における一般的なノックイン法として広く利用されることが期待される。