

学位論文の要旨

大規模遺伝子領域を標的とした多重化 CRISPR-Cas9 を用いた マイクロホモロジー媒介遺伝子置換に関する研究 (Study on microhomology-assisted gene replacement using multiplexed CRISPR-Cas9 targeting large gene region)

氏名 松崎 周

ゲノム編集は、CRISPR-Cas9 などの人工 DNA 切断酵素による部位特異的な DNA 二本鎖切断 (DSB) の導入と、細胞に備わっている DSB 修復経路を利用した遺伝子改変技術である。DSB 修復経路には、主に非相同末端結合 (non-homologous end-joining: NHEJ)、相同組換え修復 (homologous recombination: HR)、マイクロホモロジー媒介末端結合 (microhomology-mediated end-joining: MMEJ) の 3 つの経路があり、これらの修復経路を利用することで標的部位に外来配列を挿入する遺伝子ノックインが可能となる。遺伝子置換法は、一般的にゲノム DNA 上の 2 ヶ所に DSB を導入し、標的配列を意図した配列に置換する遺伝子ノックイン手法の 1 つである。DSB の位置により標的とする領域を調節できるため、中規模から大規模なゲノム領域の改変を行うことが可能である。そのため、遺伝子全長をヒト遺伝子で置き換えたヒト化モデルマウスや染色体異常のような大規模な変異に対する遺伝子治療など遺伝子挿入法では難しい大規模遺伝子領域に対して有用な手段である。しかしながら、大規模領域を標的とした既存技術の多くは HR を利用した遺伝子置換であり、修復頻度が低く、細胞種や生物種によっては効率の悪い HR は汎用性が低い。そこで本研究では、大規模遺伝子領域を標的としたマイクロホモロジー媒介遺伝子置換法の開発を目指し、新規遺伝子置換法の哺乳類培養細胞における有用性の検証およびその効率化に向けた検証を行った。

研究1: マイクロホモロジーを介した大規模遺伝子置換システムの開発 序論

PITCh (Precise Integration into Target Chromosome)法は、MMEJ を利用した遺伝子ノックイン法である。MMEJ は、5-40 bp の相同配列を介した修復経路であり、HR と比較して修復頻度が高いことから、様々な細胞種および生物種において高効率なノックインが報告されている。また、相同配列が短いためベクター構築が簡便であり汎用性が高い。しかし、MMEJ を利用した遺伝子置換法の報告は少なく、一部のエクソン領域の置換など小規模領域に限られている。そのため、大規模領域における PITCh 法を用いた遺伝子置換法を開発することは、標的選択の自由度高め、遺伝子置換法の技術基盤の確立の一助になると考えられる。そこで研究1では、MMEJ を利用した大規模遺伝子置換法の開発を試みた。まず、一般的な遺伝子置換法である dual-sgRNA を用いた CRISPR-Cas9 と PITCh 法を利用した PITCh-replacement システムを開発し、ノックインクロンの作製を試みた。さらに、multiplex-sgRNA による多重化 CRISPR-Cas9 を用いた新規遺伝子置換法として replacement with multiplex overdigestion (REMOVED)-PITCh システムを開発し、ノックインクロンの作製を試みた。標的遺伝子には、遺伝子疾患であるムコ多糖症の原因遺伝子 *GUSB* 遺伝子および *ARSB* 遺伝子を選定し、それぞれ約 20 kb と約 200 kb の遺伝子体領域へのカセット置換を行った。ノックイン戦略としては、遺伝子座の開始コドン下流と終止コドン上流の sgRNA による遺伝子体の除去と、PITCh ドナーから切り出された標的遺伝子の CDS 配列-T2A-NeoR カセットの MMEJ を介した置換から成り、正

しくノックインされると内在プロモーターから導入遺伝子発現が誘導されるデザインを採用した。

材料および方法

(1) PITCh-replacement によるノックインクロンの作製

PITCh-replacement による遺伝子置換のために、標的遺伝子およびドナーベクターを標的とした計 3 つの sgRNA と SpCas9 を含むオールインワンベクターを構築した。作製した Cas9-sgRNA 発現ベクターおよび PITCh ドナーを HCT116 細胞株に共導入し、約 10 日間の薬剤選抜とシングルセルクローニングによりノックイン細胞のクローンを獲得した。標的領域へのカセット置換は、クローンから抽出したゲノム DNA を用いたゲノム PCR およびカセット連結部のシーケンス解析により確認した。

(2) REMOVER-PITCh によるノックインクロンの作製

REMOVER-PITCh には(1)の sgRNA に加えてイントロン上に設計した sgRNA を搭載した multiplex CRISPR ベクターを構築した。*GUSB* 遺伝子座のイントロン上には 5 つ、*ARSB* 遺伝子座には 7 つの sgRNA を設計した。(1)と同様に HCT116 細胞株を用いてノックイン細胞のクローンを単離し、ジェノタイピングによりカセット置換を確認した。

結果と考察

(1)PITCh-replacement によるノックインクロンの作製

GUSB 遺伝子座、*ARSB* 遺伝子座ともにノックインカセットの連結部の増幅は確認できたが、標的領域への単一カセットの置換を示すアレルを有するクローンは得られなかった。特に標的領域サイズが大きい *ARSB* 遺伝子座では、切り出した遺伝子断片とドナーカセットが複雑に連結しており、不完全なノックインが生じていた。つまり、遺伝子断片が置換効率の低下に寄与していることが示唆された。

(2)REMOVER-PITCh によるノックインクロンの作製

(1)の結果に基づいて、標的遺伝子座を多重切断する遺伝子置換法 REMOVER-PITCh を開発した。REMOVER-PITCh によるノックインの結果、*GUSB* 遺伝子座の約 20 kb を標的として、6.0%の効率でカセット置換を達成し、少なくとも片アレルにカセットを有する 4 クローンの樹立に成功した。一方で、より大規模な約 200 kb の *ARSB* 遺伝子座では、カセット置換クローンの樹立には至らなかった。これは、標的遺伝子領域が大きい場合、細胞にとって有害な DSBs を即座に修復するために、細胞周期のほとんどの段階で活性が高く、修復速度のはやい NHEJ が MMEJ に比べて優位に生じていることが原因の 1 つであると考えられた。

研究2:LoAD システムを用いた REMOVER-PITCh による置換効率の向上

序論

第一章の結果、標的遺伝子領域が大きい場合、標的遺伝子とカセット間の MMEJ 修復より修復速度の速い NHEJ が優先的に生じている可能性が示唆された。そのため、MMEJ の修復効率を高めることで、REMOVER-PITCh による大規模遺伝子置換が可能になると考えた。LoAD (The local accumulation of DSB repair molecules)システムは、当研究室で開発された MS2-MCP 相互作用を利用した因子集積システムであり、sgRNA のステムループに付与した MS2 配列を介して DSB 周辺に MCP 融合修復因子を集積することで修復効率を向上することができる。実際に、MMEJ 修復関連因子 CtIP を集積することで MMEJ の修復精度の向上が報告されている。そこで研究 2 では、LoAD システムの併用により大規模領域における REMOVER-PITCh による遺伝子置換効率の向上を試みた。

材料および方法

(1)LoAD システムを併用した REMOVER-PITCh によるノックインクロンの作製

標的遺伝子の CDS およびドナーベクター上の sgRNA を、MS2 配列を付与した改変型 sgRNA に変更した multiplex CRISPR vector を構築した。作製した Cas9-sgRNA 発現ベクターおよび PITCh ドナー、CtIP-MCP 発現ベクターを HCT116 細胞株に共導入し、薬剤選抜とシングルセルクローニングにより

クローンを単離した。クローンのゲノム DNA からゲノム PCR およびカセット連結部のシーケンス解析により標的領域へのカセット置換を確認した。

(2) オフターゲット解析

オフターゲットの検索ツール(COSMID)により選定された上位7ヶ所の候補部位に対して Cel-I assay およびシーケンス解析によってオフターゲット切断が生じているか確認した。

結果と考察

(1) LoAD システムを併用した REMOVER-PITCh によるノックインクローンの作製

GUSB 遺伝子座では、28 クローン中 2 クローンでカセット置換を達成し、7.1%の置換効率でクローンの樹立に成功した。さらに、200 kb の領域を標的とした *ARSB* 遺伝子座においても、35 クローン中 3 クローンにおいてカセット置換を達成し、8.6%の置換効率でクローンの樹立に成功した。CtIP の集積により相同配列を介した修復に必要な DSB 末端の削り込みが促進されたことで、MMEJ が NHEJ より優勢になり、カセット置換の成功につながったと考えられる。

(2) オフターゲット解析

樹立したクローンにおいてオフターゲット解析を行った結果、全てのクローンでオフターゲット切断は確認されなかった。つまり、個々の sgRNA はオフターゲット切断の可能性が限りなく低いことが示された。しかし、本手法は簡便かつ限定的な解析法であり、複数同時切断のリスクや切断断片の非特異的挿入など網羅的かつ詳細な解析が必要となる。

総括

本研究では、マイクロホモロジーを介した新規大規模遺伝子置換法として REMOVER-PITCh システムの開発を試みた。その結果、*GUSB* 遺伝子座の約 20 kb の標的領域に対するカセット置換クローンの樹立を通して、哺乳類培養細胞における本システムの有用性を証明した。MMEJ を利用した本システムを使用することで遺伝子置換の標的領域を拡大することに成功した。さらに、LoAD システムによる CtIP の集積によって *ARSB* 遺伝子座の約 200 kb の領域へのカセット置換を達成し、より大規模領域への遺伝子置換が可能であることを証明した。今後は、このシステムをより効率的かつ安全性が高いものにするため改良型 Cas の利用および gRNA 数の最適化が必要となる。これらの改良によって安全性を高めることができれば、哺乳類培養細胞における大規模遺伝子置換法として広く利用されることが期待される。