

Topics 7

CRISPR/Cas システムを用いたマウスゲノム編集

増子 大輔 / 伊川 正人

要旨：人工制限酵素を用いたゲノム編集技術が注目を集めている。これまでは主に、DNA 結合ドメインに FokI エンドヌクレアーゼをつないだ融合蛋白質である ZFN、TALEN が用いられてきたが、これらは任意の標的遺伝子座へのアクセスが可能とされるものの、DNA 結合ドメインのデザインが難しく手間とコストがかかるものであった。一方、RNA により標的 DNA 配列を認識する CRISPR/Cas システムは、安価で簡単にベクターが構築できることから、特に哺乳類の遺伝子改変で効果を発揮している。本稿では、我々が構築した評価システムと、遺伝子改変マウス作製や遺伝子治療への応用など、新しい展開について紹介する。

キーワード：ゲノム編集、ノックアウト、ノックイン、点変異、疾患モデル

Genome editing, Knockout, Knockin, Point mutation, Disease model

連絡先：伊川 正人
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-1
大阪大学微生物病研究所
(E-mail: ikawa@biken.osaka-u.ac.jp)

人工制限酵素の開発

生物の細胞内では DNA が切断された場合に修復が起こる。しかしこの修復も完全ではない。たとえば非同末端結合による修復では、切断を受けた DNA 末端を直接つなぎ合わせるが、主に数塩基の欠失や挿入など、一定頻度でエラーが起こることが知られている。また相同組換えによる修復では、姉妹染色体などを参照するのでエラーは少ないが、似た配列として一本鎖 DNA や、二本鎖 DNA を人為的に導入しておくとしてゲノム内に取り込まれることがある。ゲノム編集技術では、これらの DNA 切断と修復エラーをうまく利用して遺伝子改変を行う。

ゲノム編集には特異的な DNA 配列の切断が不可欠であるが、 3×10^9 塩基対といわれるゲノム上の 1ヶ所を規定するためには計算上、最低でも 16 塩基が必要となる ($4^{16} = 4.3 \times 10^9$)。当初は長鎖 DNA 配列を特異的に認識するメガヌクレアーゼの可能性も検討されたが、任意の配列を切断するメガヌクレアーゼをデザインすることはできなかった。そこで 1モチーフで 3塩基の認識をする zinc finger モチーフを複数用いて DNA の結合ドメインとし、さらに FokI をつなぐことで、長鎖 DNA を認識できる人工制限酵素として ZFN (zinc finger nuclease) がつくられた (図 1A)¹⁾²⁾。その後、1モチーフで 1塩基の認識をする TALE モチーフを用いた TALEN (transcription activator-like effector nuclease) が開発された (図 1B)³⁾。しかしながら、いずれも DNA 結合ドメインに FokI エンドヌクレアーゼをつないだ融合蛋白質として機能させる必要があるために、発現ベクターの作製には高度な技術と労力が必要とされた。

人工制限酵素をさらに身近にしたのが、regularly interspaced, short palindromic repeat (CRISPR)/Cas システムである (図 1C)⁴⁾⁵⁾。このシステムでは、標的配列を決める guide RNA (gRNA) と CAS9 nuclease を発現させるだけで標的の DNA 配列を切断、破壊できる (図 1C)。オリゴ DNA を合成してプラスミドに入れるだけでベクター構築できるので、前述の ZFN や TALEN と比較してデザイン、作製が簡便であり、瞬く間に利用が広がった。

本稿では、CRISPR/Cas プラスミドをマウス受精卵の前核に顕微注入することで、簡易、迅速かつ高効率にゲノム編集ができる我々のシステム⁶⁾⁷⁾についてプロトコ

ル形式で概説するとともに、最近の CRISPR/Cas を用いた研究の発展について紹介する。

CRISPR/Cas プラスミドの構築

CRISPR/Cas 法では、標的とする DNA 20 塩基の後ろに PAM 配列 (NGG : N は A, T, G, C のいずれか) を含む必要がある。遺伝子破壊が目的であれば、標的遺伝子の翻訳開始点 (ATG) の下流におけるフレームシフトをねらう、もしくは活性ドメインを破壊するなどのアプローチが考えられる。我々は標的領域内に PAM 配列を探し、その上流の 20 塩基を pX330 プラスミド (Zhang により開発され、gRNA と Cas9 発現カセットを 1つのプラスミド内に含む。Addgene [http://www.addgene.org/crispr/zhang/] より入手できる) の BbsI 制限酵素サイトに挿入している (図 2A, 下)。プライマーのセンス鎖とアンチセンス鎖の 5' 側にそれぞれ CACC, AAAC を付加して BbsI 切断末端と相補させることで、向きを決めて挿入することができる。

我々はオフターゲット (本来の標的ではないが、gRNA 配列が似ているために誤って切断する可能性のある遺伝子座) を切断するリスクを軽減するために、gRNA 設計の段階で候補配列を 8 つ程度選び、Bowtie などのソフトウェアを用いてゲノム上の相同配列を検索し、候補数の少ない方から 4 つを作製している。Unix/Linux の知識が必要な Bowtie に対し、簡易法として、Zhang 研究室の CRISPR Design tool (http://www.genome-engineering.org/crispr/⁸⁾) や BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) などの Web ベースでの検索方法がある。オフターゲットの詳細については後述する。

In vitro における DNA 切断活性評価系の開発

ZFN/TALEN の活性評価には主に、ミスマッチがあると切断を起こす CELI ヌクレアーゼなどを用いて、変性・再アニールさせた PCR 産物を処理し、切断産物と非切断産物の濃度比により切断効率を算出するアッセイが用いられてきた。我々は哺乳類への応用を目指していたこと、簡便に活性評価したいということから、HEK293T 細胞を用いて green fluorescent protein (GFP) 蛍光回復を

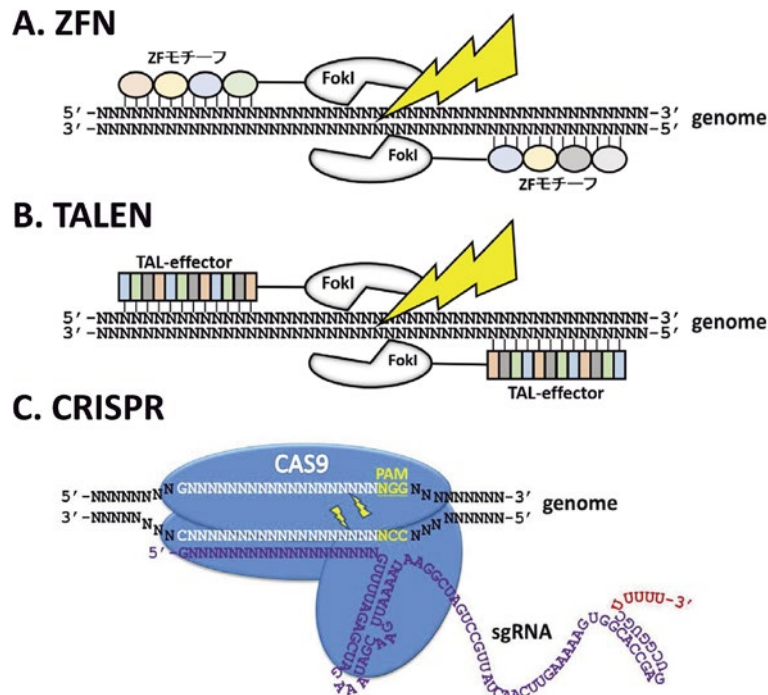


図1 ZFN, TALEN, CRISPRの比較. (A) 人工制限酵素ZFN. 1モチーフで3塩基を認識する zinc finger は, その組み合わせによってアフィニティが異なるために活性の良いZFNを作製することは難しかった. (B) 人工制限酵素TALEN. 1モチーフで1塩基を認識するTAL-effectorは, 組み合わせによるアフィニティ低下の問題を解決したが, 標的配列ごとに多くのモチーフを組み合わせる煩雑な作業が必要であった. (C) CRISPR/Cas システム. gRNAにより相補的な配列を捕捉するので, オリゴDNAを挿入するだけでベクターが構築できる.

指標に活性評価する系を構築した. まず, CAGプロモーターの下流にenhanced GFP (EGFP) の前半の約2/3と後半の約2/3を挿入したプラスミド, pCAG-EGxxFPを構築した(図2A, 上)(<http://www.addgene.org/50716/>). 次に, 標的配列を中ほどに含んだ約500~1,000塩基の標的領域をPCRによって増幅して, EGFP断片間のmulti cloning site (MCS)に挿入し, pCAG-EGxxFP-targetを作製した. pCAG-EGxxFP-targetプラスミドと, 前述のpX330-targetプラスミドをHEK293T細胞に同時導入し(我々は安価なリン酸カルシウム法を用いているが, 市販の導入試薬でも問題ない), 2日後に緑色蛍光を観察することで活性を比較する. その原理は図2Bに示すように, pCAG-EGxxFP-targetはEGFPが分断されているのでこのままでは緑色蛍光を発しないが, pX330-targetから発現するgRNAとCAS9複合体により標的配列部分が切断されると, EGFPの前半部分と後半部分の1/3部分の相

同性を利用してEGFP配列が修復される. その結果, EGFP発現活性が機能して細胞が緑色蛍光を発するようになり, 蛍光細胞数を指標に活性を評価できる(図2C). 我々は実際にノックアウトマウスを得ることができたpX330-Cetn1(<http://www.addgene.org/50718/>)とpCAG-EGxxFP-Cetn1(<http://www.addgene.org/50717/>)の組み合わせをポジティブコントロール, pX330とpCAG-EGxxFP-targetをネガティブコントロールとして用いている. 図1Cに示すように, 蛍光顕微鏡観察により, 蛍光強度の暗いもの(スコア1)から明るいもの(スコア4)までを4段階に蛍光強度を分類している(先のポジティブコントロールはスコア3). 経験的に, pX330-targetを4つデザインすれば, 十分な活性を示すものが2~3個とれる. なおU6プロモーターの転写終了シグナルとなるTTTTT配列を含まないようにしている.

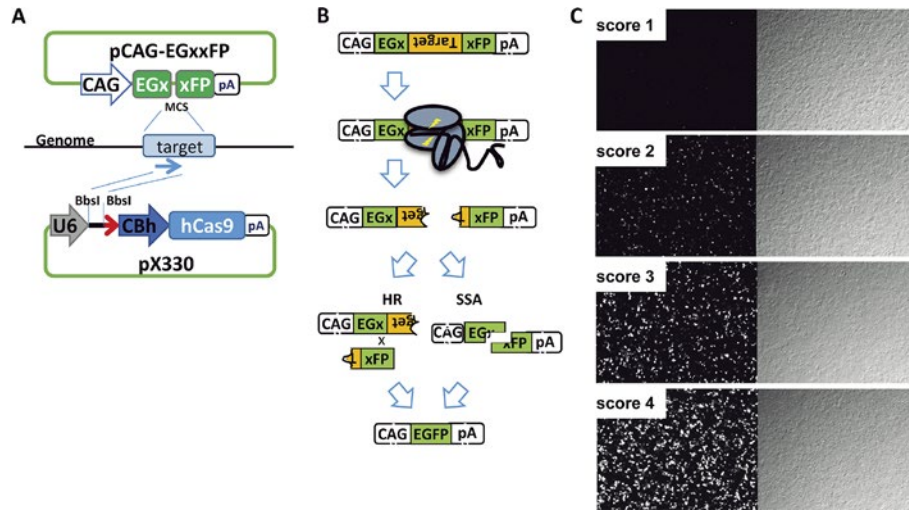


図2 ベクター構築と活性評価。(A) ベクター構築。上：活性評価用pCAG-EGxxFPベクター。ターゲット配列を中ほどに含む500~1,000 bpの配列をPCRによって増幅し、挿入する。下：ターゲット領域付近にPAM配列(NGG)を探し、その上流20塩基をBbsI切断サイトに挿入する。(B) 活性評価の戦略。Aで作製したベクターを細胞に導入すれば、発現したgRNA/CAS9複合体がpCAG-EGxxFP-targetを切断する。相同組換えによりEGFP配列の修復が起こると、蛍光が観測される。(C) 蛍光のクラス分け。細胞を用いた切断アッセイの後に蛍光を観測し、蛍光強度に応じてスコアをつける。pX330-Cetn1とpCAG-EGxxFPを導入したときの活性をスコア3としている。(Mashikoら⁷⁾より改変)

標的配列とPAM配列について

pX330はヒトU6プロモーターを用いてgRNAを発現する。pX330が開発された当初は、U6プロモーターが転写開始点としてGを好むことから、Gで始まる標的配列、もしくは標的配列の5'端にGを追加することが推奨されていた⁵⁾。しかしGFP蛍光を指標とした我々の*in vitro*評価系を用いて調べたところ、Gで始まらない標的配列でも高い活性が得られるケースや、むしろ最初にGを付加することで活性が低下するケースもみられた。このことから、現在は、標的配列の最初がGである必要はないと考えている。また、PAM配列(NGG)のNと活性の関係についても同様に調べたところ、A, T, G, Cの塩基において活性の差は認められなかった。現在は、単に標的領域内のNGGを探し、直前の20塩基を標的としている。

マウス受精卵への前核注入による遺伝子変異マウスの作製

ゲノム編集の利用法の一つとして、目的細胞に変異を導入して、遺伝子機能を解析する例があげられる。また変異を導入したES細胞やiPS細胞を試験管内で目的細胞に分化させることで、遺伝子機能や表現型を解析することもできる(図3A)。しかし、高次生命現象の多くは、個体レベルで解析を行わなければならないことも多い。もちろん変異を導入したES細胞からキメラマウスを作製し、交配により遺伝子破壊(ノックアウト)マウスをつくることもできるが、むしろCRISPR/Cas法を使うのであれば、受精卵にgRNAとCAS蛋白を発現させることで、短期間にノックアウトマウスを得る方法が利用できる。そのために我々は、受精卵の前核にpX330-targetプラスミドを環状のまま注入している(図3B)。一般的にはRNAを調製してから細胞質に注入する方法もとられているが、プラスミド載せ換えやRNA合成の手間、RNAハンドリングによる分解のリスクを軽減できる点

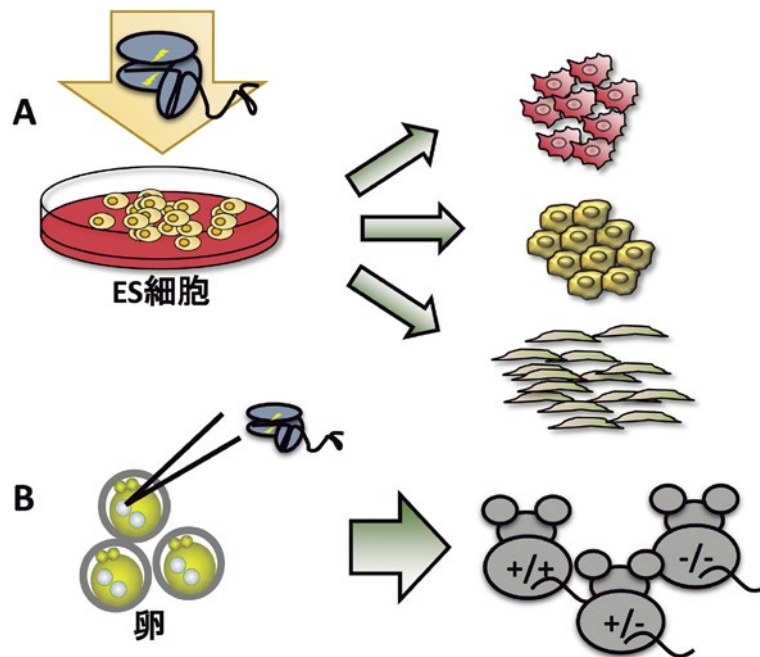


図3 CRISPR/Casシステムを用いた遺伝子機能解析。(A) ES細胞を用いた遺伝子機能解析. ES細胞にCRISPR/Casを導入し, 遺伝子破壊を起こしたうえで, さまざまな細胞に分化させ, 表現型を解析する。(B) 個体を用いた遺伝子機能解析. 細胞での解析だけでは知りえない機能を解析するために個体を作製する. マウス受精卵にpX330プラスミドを顕微注入して移植すれば, 高率にノックアウトマウスを得ることができる.

でプラスミドが優れている。

得られた産仔からゲノムDNAを抽出し, 標的配列領域をPCR増幅する(pCAG-EGFP-targetを作製するときに用いたプライマーセットを利用できる). PCR産物をダイレクトシーケンスすることで, 欠損や挿入が同定できる. ただし, 卵割後に変異が導入されている場合はモザイクになることや, PCR増幅によって特定のアリルが増幅されやすくなる可能性を考えて, 正確な判定は次世代で行うことが望ましい. なお一般に行われているRNA注入法と異なり, 我々の方法ではプラスミドDNAを注入するので, pX330-target配列そのものがゲノムに導入されることがある. 実際に環状プラスミドがゲノムに挿入されるリスクを調べると, 産仔の3%で挿入が起こっていた(直鎖DNAに比べて組み込み効率は約1/10程度). この問題はゲノムに挿入されなかった個体を利用する, もしくは交配により分離ができた個体を用いることで解決できると考える. 以下に遺伝子変異マウスの作製の応用例を示す.

CRISPR/Cas プラスミドによる遺伝子破壊

CAS9/gRNA複合体により標的遺伝子座が切断されると(PAM配列の上流3塩基と4塩基の間で切断される), 修復の過程で数ベースの欠損, 挿入が起こることがある. その際にフレームシフトすると, 目的蛋白質が作られないノックアウトとなる(図4A). 欠失や挿入が3の倍数になると塩基のフレームが通ってしまうので, 実験目的にあうマウスを選び, 交配によって殖やす必要がある. 我々のアプローチであれば, 活性評価の簡便さ, mRNA合成しないことなどの効率化が功を奏し, 立案からホモ欠損マウスの作製まで1ヶ月以内に行える. この方法を用いて我々は約半年の間に50系統のノックアウトマウスを作製した⁷⁾. 経験上, 得られた産仔の約半数で変異が確認され, その半数で両側染色体に変異が確認されている. CRISPR/Cas9システムを用いた遺伝子破壊の特徴として, 10塩基以内の欠失もしくは挿入が多くみられる. 我々

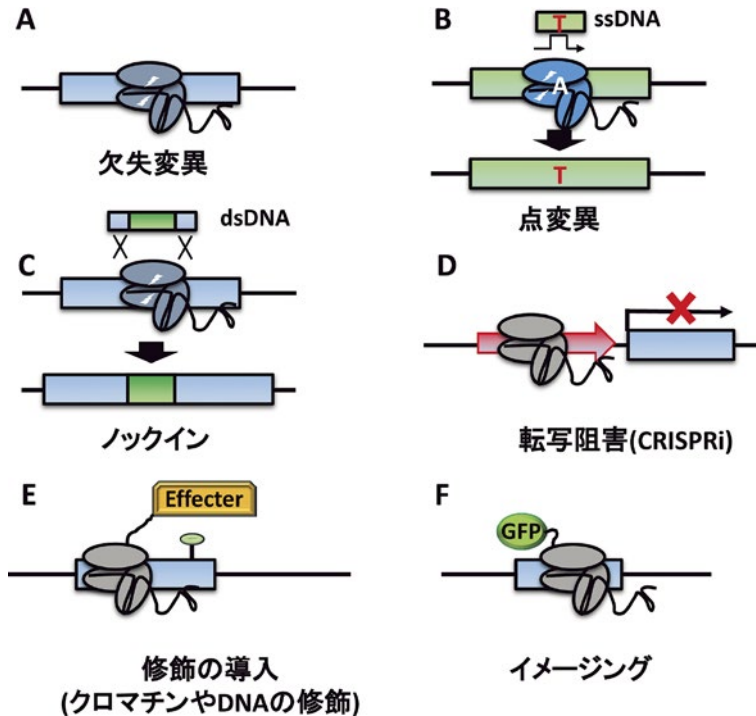


図4 CRISPR/Casシステムによるさまざまなゲノム編集/研究アプローチ。(A) 欠失変異。CRISPR/Casによる切断と修復エラーにより欠失変異を起こすことができる。(B) 点変異。CRISPR/Casと同時に、変異を入れた100 bpほどの一本鎖DNA (ssDNA) を導入すれば、ねらった位置に点変異を起こすことができる。図はA to T置換の例。(C) ノックイン。CRISPR/Casと同時に、両腕500 bpほどの二本鎖DNA (dsDNA) を導入すれば、ねらった位置にEGFPなどの長鎖DNAをノックインできる。(D) 転写阻害 (CRISPRi)。不活性型CAS9 (dCAS9) では切断が起こらず、DNAを認識したまま離れない状態になるので、転写阻害ができる。(E) 修飾の導入。DNA修飾酵素などをdCAS9との融合蛋白質として発現させれば、認識した部位の付近にエピゲノム修飾などを導入することができる。(F) イメージング。dCAS9にEGFPをつなげることで、認識した配列を可視化することができる。単分子では蛍光を観察することは難しいため、リピート配列を標的とすることが多い。

の経験では、10塩基以内の欠失が114個体の欠損のうち78個体でみられた(68.4%)。100塩基を超える欠失もみられているが、1割程度と少ないことから、長領域欠損を目的とする場合には後述のように2つのpX330を注入することをお勧めする。また切断部位の近辺に3塩基程度の相同性(マイクロホモロジー)があれば、それを利用した修復も多く、同一の変異が得られることも少なくない。

点変異マウスの作製

CRISPR/Casシステムを活用すれば、ヒトで報告されているSNP症例を模倣したマウスを比較的簡単につくることができる(図4B)。そのためにはpX330-targetと同時に、切断部位をカバーして点変異を有する一本鎖DNAを前核に注入する。その際に、標的変異の両側に約50塩基の相同領域をもった一本鎖DNAをともに注入することで点変異やFlagなどのタグ挿入も可能となる。しかし、我々の経験では、単なる遺伝子破壊に比べて効率は1/10~1/5と高くはない結果であった。なお導入するオ

リゴDNA鎖にgRNAがアニールしないように同じ向きにする, 点変異を導入した後にもう一度切断が起こらないようにssDNA内にサイレント変異を入れるなどの工夫が望ましい。

CRISPR/Cas システムにより 作製された変異マウスの オフターゲット検索

ZFN や TALEN が 12~18 塩基程度を認識するユニットを2つ必要とするのに対し, CRISPR/Cas システムは 20 塩基を1つのみ認識することから, オフターゲットの切断については注意が必要である。しかし, その候補検索の方法にはコンセンサスが取れていない。Wang らは Cell の論文⁹⁾において, Bowtie (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) を用いてオフターゲットの候補となる個所を探している。PAM配列の直近上流 13 塩基 (標的配列の3'側 13 塩基) と NGG (N: A, T, G, C) の配列を作製し, マウスゲノムにその配列が完全に合致するかどうかを調べる。この方法は PAM の上流の約 13 塩基が活性に大きく関わるといふ知見を反映している。我々も, 本法を踏襲してオフターゲット候補数の少ない標的を選んでいる (多くの場合で, 候補数 5 個以下を選択できる)。実際に得られた変異マウスについては, オフターゲット配列を中ほどに含むゲノム配列を UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) によって取得し, PCR増幅してシーケンスをすることで切断の有無を調べておくとよい。我々が *Prm1* 遺伝子に変異の入った 8 匹のマウスに対して 4ヶ所のオフターゲット候補を調べた場合にはオフターゲットの切断が起こってなかったが (0/32), *Cetn1* 遺伝子に変異の入った 16 匹のマウスにおいて 7ヶ所のオフターゲット候補を調べると 1 匹の 1ヶ所でオフターゲットの切断が観察された (1/112)⁶⁾。これらの結果より, オフターゲットが切断される確率は約 1% と低いと考えるが, 切断される可能性は否定できない。そこで複数ラインのマウスを解析したり, 交配によりオフターゲット変異を除いたりすることが望ましい。厳密にはオフターゲット配列が異なる gRNA を用いて追試することなどで, 十分な解決策となりうると考えられる。

医療への応用

CRISPR/Cas システムの医療への応用として, 「ゲノムに入っている変異を取り除く方法」, 「ウイルスや細菌などの DNA を切断することによる感染の予防, 治療」などが考えられる。変異を取り除く例としては, Fah5981SB チロシン血症モデルマウスの点変異による遺伝子治療が報告された¹⁰⁾。このマウスは FAH 蛋白を生成できないことからチロシンを分解できず, 肝障害を起こしてしまう。Fah を標的とした pX330 プラスミドとともに ssDNA を静脈注射によってモデルマウスの肝臓に一度導入することで一部の肝細胞の遺伝子変異を正常に戻すと, 1ヶ月後にはそれらが全肝細胞の 1/3 を占め, 投薬治療を行わなくてもマウスが生き残れるようになったと報告されている。また, ウイルスの DNA を切断する方法では, HIV-LTR を標的とした gRNA 導入による潜伏感染 HIV プロウイルスの破壊が報告されており¹¹⁾, この方法を用いることで潜伏 HIV の再活性化を抑制できる可能性が示唆されている。しかし医療応用に際しては, 先にも述べたオフターゲット切断については, より厳密に考慮されなくてはならないであろう。

CRISPR を用いた ゲノム編集技術の広がり

これまで CRISPR/Cas システムを用いたゲノム編集について述べてきた。このツールを用いることで, 今まではコストや時間の面から研究が進めにくかった SNP の個体レベルでの網羅的な解析や, 遺伝子破壊による疾患モデルマウスの作製を, 容易に行うことができるようになった。また, マウスに限らず, ラットやサルにおいて遺伝子破壊を試みがなされている¹²⁾¹³⁾。異なる使い方として, ノックイン (図 4C) や, CAS9 蛋白を不活性化型にするすることで切断は起こらないものの転写を阻害する CRISPRi (図 4D)¹⁴⁾ や, CAS9 蛋白が片側鎖のみを切断するようにしてセンス側, アンチセンス側の両側を切断したときに初めて遺伝子破壊を起こすことでオフターゲット切断を軽減する, Nickase タイプ¹⁵⁾ も報告されている。不活性化型 CAS9 に修飾酵素 (図 4E)¹⁶⁾ や GFP (図 4F) をつないで¹⁷⁾, 配列を修飾したり, 可視化するといった全く異なるアプローチも報告されている。最近では切断蛋

白である CAS9 の立体構造も観察され、原理面の理解も進みつつある¹⁸⁾。ゲノム編集技術の活用は大きな広がりを見せており、今後の生命科学・医学研究への応用が期待される。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関して特に申告なし。

引用文献

- 1) Kim Y, et al. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1156-60.
- 2) Bibikova M, et al. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 289-97.
- 3) Cermak T, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: e82.
- 4) Cong L, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339: 819-23.
- 5) Mali, Prashant, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013; 339: 823-6.
- 6) Mashiko D, et al. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep* 2013; 3: 3355.
- 7) Mashiko D, et al. Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes. *Dev Growth Differ* 2014; 56: 122-9.
- 8) Hsu PD, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 2013; 31: 827-32.
- 9) Wang H, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013; 153: 910-8.
- 10) Yin H, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 551-3.
- 11) Ebina H, et al. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep* 2013; 3: 2510.
- 12) Li D, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 2013; 31: 681-3.
- 13) Niu Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* 2014; 156: 836-43.
- 14) Qi LS, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 2013; 152: 1173-83.
- 15) Ran F, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 2013; 154: 1380-9.
- 16) Voigt P, et al. Epigenome editing. *Nat Biotechnol* 2013; 3: 1097-9.
- 17) Chen B, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* 2013; 155: 1479-91.
- 18) Nishimasu H, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 2014; 156: 935-49.

Abstract

Genome engineering using CRISPR/Cas system

Daisuke Mashiko and Masahito Ikawa

Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

Targeted genome editing using engineered nucleases has attracted attention in the field of gene function analysis and gene therapy. Although ZFN and TALEN fusion proteins that connect the FokI endonuclease with DNA-binding domains have been developed and used; the labor-intensive and time-consuming process of the construction of a DNA-binding domain has hindered the spread of their use. Emergence of the clustered, regularly interspaced, short palindromic repeat (CRISPR)/Cas system has changed this situation. This system is far simpler to prepare because of the use of guide RNA (gRNA) to direct the CAS9 enzyme to the target loci—the gRNA can be easily prepared by changing 20 nucleotides of the 5' region of the gRNA. Thus a prepared, CRISPR/Cas system efficiently works in mammalian cells. Moreover, gene knockout mice can be generated within a month by injecting RNAs or plasmids coding gRNA and Cas9 into fertilized eggs. Here we introduce our simple evaluation system for gRNAs and our plasmid injection system for generating gene-knockout mice. Further applications of the CRISPR/Cas system for point mutation, large deletion, reporter gene knockin, and other advances to the technique, will also be reviewed.