

ゲノム編集技術と生殖医学研究への応用

大浦 聖矢^{1,2)}, 伊川 正人^{1,2)}

1) 大阪大学薬学研究科創成薬学専攻遺伝子機能解析学分野

2) 大阪大学微生物研究所遺伝子機能解析分野

はじめに

マウスは生活環が比較的短く（妊娠期間は約20日間、性成熟は雄では約6週間、雌では約4週間）、古くから体外受精や胚操作などの生殖工学技術も確立されるなど、生殖医療研究に適した実験動物である。ゲノムの99%がヒトでも保存されていることや、遺伝子改変のノウハウが蓄積されていることもあり、マウスは現在最も有用なモデル動物の1つとなっている。

生命現象の解明において、遺伝子ノックアウト（KO）マウスが果たしてきた役割は計り知れない。生殖研究に限っても、数百の遺伝子が生殖能力に関わることが示されてきた [1]。また、KO マウス実験は生殖巣特異的遺伝子の機能解析と相性が良い。まず、(1) 生殖器は個体の生存に必須ではないため、条件付き KO にする必要がない。加えて、(2) 交配試験で生殖に必須か否かを簡便に調べることができ、(3) 不妊であることが判明すれば、生殖工学技術を用いて詳細な表現型解析を行える。しかし、KO マウスの作製は年単位の時間と労力を要するもので、敷居の高い実験であった。さらに、コスト、技術・設備などの問題で、KO マウス実験の恩恵を受けられるのは一部の研究者に限られていた [2]。

この状況を一変させたのが、遺伝子改変技術の革命と呼ぶべきゲノム編集ツール、とくに、CRISPR/Cas9の到来である（図1）。CRISPR/Cas9を用いた受精卵ゲノム編集により、標的遺伝子の選定から最短1カ月でKOマウスを作製できるようになった [3]。さらに、そのシステムの簡明さ（標的配列を認識するガイドRNAと切断するCAS9タンパク質を導入するだけでよい。両者は市販されているし、プラスミドから発現させることもできる）も相まって、KO マウス実験は多くの研究者にとって身近なものになった。本稿ではゲノム編集が生殖

研究において果たす役割を、私たちの研究成果と今後の展望を交えて紹介したい。

単純遺伝子破壊による精巣特異的発現遺伝子の網羅的機能解析

CRISPR/Cas9システムを使用することで、容易に遺伝子を破壊できる現在、ノックアウトマウスを用いた必須遺伝子の網羅的機能解析が現実のものとなりつつある。われわれは精巣特異的な発現がみられる遺伝子を次々に欠損させることで、妊娠性に関わる遺伝子の同定を試み、不妊の表現型を示す遺伝子を同定してきた。これらについて詳細な表現型解析を行うことで、精子形成や受精の機構を明らかにし、避妊や不妊治療への橋渡し研究を進めることができる [3, 4]。一方で、精巣特異的に発現しているにもかかわらず、KOしても正常に次世代が得られる遺伝子が、約7割(80遺伝子中54遺伝子)もあった [5]。この結果は臓器特異的な遺伝子発現様式のみから、その遺伝子機能の重要性を推測することは難しく、必須遺伝子の網羅的解析には、KOマウスを用いた個体レベルでのスクリーニングが有効であることを示している。

ただし、この解析手法では、機能補完する遺伝子が存在する場合には解析が難しい。例えば、同時期に骨格筋前駆細胞で発現する転写因子のMyoDとMyf5は、それぞれの単一KOマウスでは骨格筋の異常は観察されない [6, 7] が、両者を同時に欠失したダブルKOマウスは骨格筋形成異常を示すことがわかっている [8]。このように、同時期に発現し機能が重複する場合や、相同遺伝子が存在する場合には、機能補完を避けるために複数の遺伝子をまとめて欠損させる必要がある。従来の遺伝子ターゲティング法では、同時に複数の遺伝子を欠損させるのは困難であり、それぞれのKOマウスを作製して交配を重ねる必要があるため、膨大な時間とコストを要した。一方、CRISPR/Cas9システムでは複数個所に一度で変異を導入できる [9] ため、機能が他と重複する遺伝子をまとめて簡単に解析できる。

連絡先：伊川正人、大阪大学微生物研究所遺伝子機能解析分野

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1

TEL：06-6879-8375

FAX：06-6879-8376

E-mail：ikawa@biken.osaka-u.ac.jp

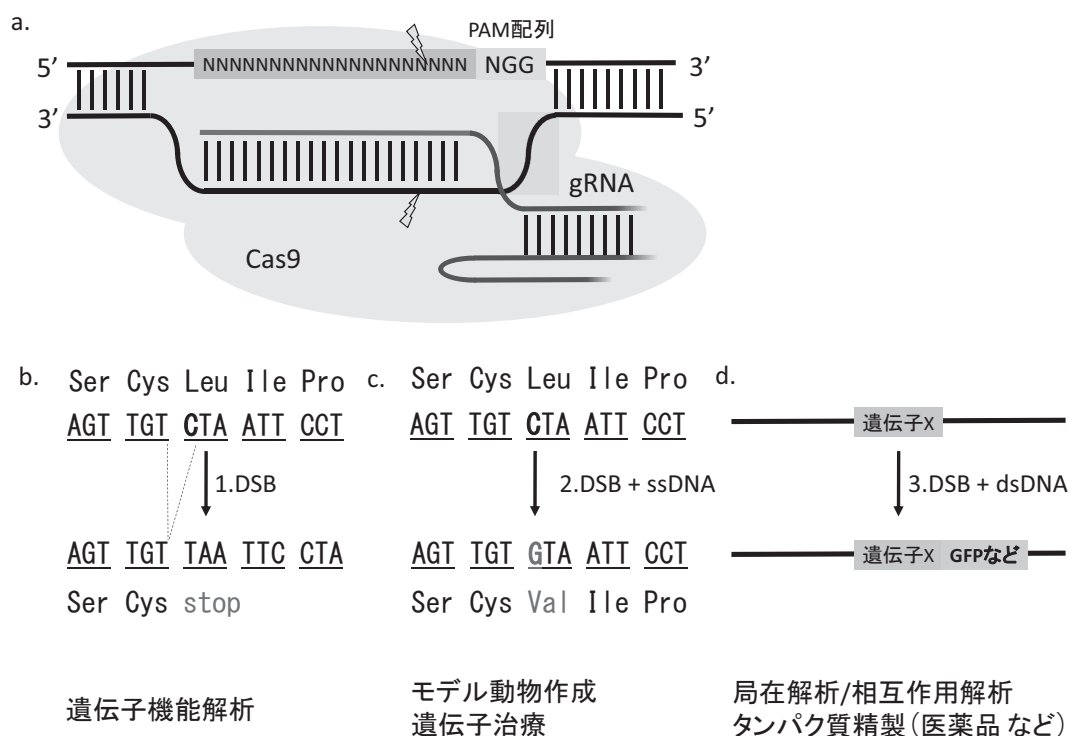


図1 CRISPR/Cas9システムの原理とその使用例

- gRNA が標的配列の元へ Cas9ヌクレアーゼを誘導する。ゲノム編集でよく使用される spCas9の場合、gRNA の認識配列は NGG の直前20塩基でなければならない。ヒトやマウスゲノム上において20塩基が一致する配列は、理論的に1カ所しか存在しないため、特異的な切断が期待できる。
- Cas9による標的配列切断後、細胞は DNA 修復を試みるが、数塩基の欠損や挿入が生じてしまう。このエラーにより読み枠がずれると正しいタンパク質が作られなくなる。
- 標的配列付近と相同性の高い DNA が存在すると、細胞はその DNA を参照して切断部位の修復を試みる。したがって、相同 DNA 内の一部を置換しておくことで、その置換がゲノムに組み込まれる。
- C と同一の原理により、GFP や GST といったタグを遺伝子近傍（内部）に挿入することで、細胞に融合タンパク質を作らせることもできる。この場合、挿入したい DNA 断片の上流・下流に相同領域をもたせる必要がある。

マウスにおいては、2,300以上の遺伝子が精巣特異的に発現することが知られており [10]、精子形成や受精に何らかの役割を果たしていると予測されるが、実際に妊孕性に関わるか否か明確になっているものは少ない。CRISPR/Cas9システムを用いた個体レベルでの遺伝子機能の網羅的解析により、この判然としない状況が打破されると期待している。

緻密な遺伝子改変

CRISPR/Cas9システムの適用は単純な遺伝破壊にとどまらない。相同配列を有する DNA 断片（点変異や短断片挿入には ssODN、長断片挿入には dsDNA）を同時に導入することで、相同配列依存性修復、外来 DNA を狙った場所に挿入する（KI）ことができる。われわれは標的 DNA 切断と ssODN を利用して、*Izumo1* 遺伝子座内に点変異を導入することに成功した [11]。IZUMO1 は精子頭部に局在する I 型の膜タンパク質で、卵子との

融合に必須な因子として同定されたが、IZUMO1内のそれぞれのドメインの詳細な機能は不明な点も多かった。なかでも、細胞質側ドメインは精子成熟の過程でリン酸基修飾を受けることが示唆されている [12]。前述のとおり ssODN を利用し、チミン（T）一塩基を *Izumo1* 遺伝子座内に挿入した。これにより、タンパク質コード領域内に終始コドンが導入され、細胞質ドメインのみを欠損させることができた。このような緻密な遺伝子改変が効率よく行える（得られた7匹の産仔中3匹が目的の変異を有していた）のは、CRISPR/Cas9システムならではである。得られた IZUMO1細胞質ドメイン欠失マウスの生殖能力を調べるべく、自然交配での産仔数と IVF での融合率を解析したところ、両者とも野生型と同程度であった。このことから、IZUMO1の細胞質ドメインはマウスの生殖能力に必須ではないことが示唆された。

ここに紹介したように CRISPR/Cas9システムは、まさしく文章を編集するかのごとくゲノム遺伝子配列を書き換えることを可能にした。この緻密な遺伝子改変は、

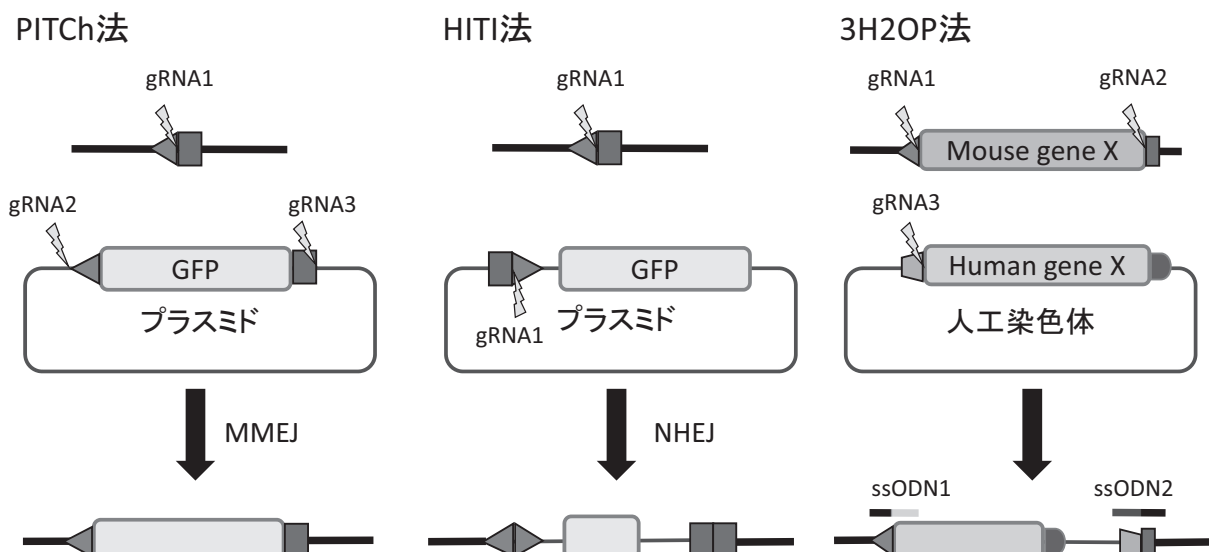


図2 KI効率向上のさまざまな試み

PITCh法：10～20塩基程度の相同領域を利用して、外来DNAをゲノムに挿入する。ゲノム内の標的配列、挿入配列の上流・下流の3カ所にgRNAを設計する必要がある。

HITI法：ゲノムとプラスミドを切断し、非相同末端連結を介してそれぞれを結合する。gRNAは一種類のみを準備する。正向きに断片が挿入されるとgRNAに再び認識され切断されるが、逆向きに挿入されるとそれ以上切断されない。

3H2OP法：プラスミドに搭載できないサイズのDNAでもゲノムに組み込むことができる。例えば、マウスの遺伝子の上流・下流、ヒト遺伝子を搭載した人工染色体の3カ所にgRNAを設計する。ゲノムと人工染色体の連結部分を橋渡しするssODNが2つ必要である。

生命科学の加速器になると確信している。

外来遺伝子導入効率向上の試み

前述のとおり、相同組み換えを利用したゲノムへの外来DNA導入手法はKI動物作製に効果的である。しかし、目的とする遺伝子改変、対象とする細胞・動物種によっては、改善の余地があり、さまざまなグループから効率向上の術が報告されている（図2）。

例えば、Nakadeらはmicrohomology-mediated end joining（MMEJ：5-25bpの相同領域に依存したDNA修復機構）を利用することで、外来DNAをゲノムに挿入するPITCh法を開発した[13]。また、Suzukiらは、non-homologous end joining（NHEJ）を利用したHITI法を報告した[14]。MMEJは相同組み換え効率の低い細胞、HITI法は生体内の非分裂細胞においてもKI可能なことが示されている。Suzukiらは、HITI法により非増殖性の網膜細胞に応用していたが、成人では分裂しないセロトリ細胞などの生殖研究への応用も、今後期待される。

これまでに紹介した相同組み換え法（前章）やPITCh法、HITI法は化学合成可能な200塩基以下のssODNやプラスミドを利用した手法であるため、非翻訳領域を含めた遺伝子全体といった数10kbpを超える外来DNAをゲノムに挿入することはできない。Yoshimiらは、連結

部位を跨いで相同性を有するssODNを同時に受精卵へ導入することで、数100kbpのKIを可能にする3H2OP法を開発した[15]。同法により、ヒト遺伝子座を搭載した人工染色体を対応するマウスの遺伝子座と置換し、コードされるタンパク質だけでなく遺伝子発現調節を含めたヒト化モデルマウスが現実のものとなった。

その他の活用法

ゲノム編集は、単純な遺伝子破壊に加え、点変異や数100kbpに及ぶ外来遺伝子の導入、また染色体転座[16, 17]など、一塩基レベルから染色体レベルまで任意の遺伝子改変が可能である。さらに、本稿では詳細に紹介しなかったが、DNA切断活性を失ったdCas9を用いて、ゲノムではなくエピゲノムを編集する[18, 19]ことや、切断を伴わずにゲノムを書き換える[20]ことが可能となりつつある。また、CRISPR/Cas9システムと光工学[21]や植物のホルモン[22]といったゲノム工学を超えた異分野との融合も活発に進められるなど、その勢いはとどまるところを知らない。

おわりに

近年、ゲノムワイド関連（Genome Wide Association

Study; GWAS)解析により, ヒトの疾患に関連する SNP が次々と同定されつつある [23, 24]. 患者で見つかった変異をモデル動物に導入して, その因果関係を明らかにするようなアプローチが, 生殖を含めた医学・生命科学研究において定法となるであろう. 基礎研究にとどまらず, 臨床研究・創薬への橋渡しが期待されており, 倫理的・法的懸念に対応したゲノム医療への展開が期待される.

引用文献

1. Matzuk MM, Lamb DJ (2002) Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol* 4, s41-49.
2. Fujihara Y, Kaseda K, Inoue N, Ikawa M, Okabe M (2013) Production of mouse pups from germline transmission-failed knockout chimeras. *Transgenic Res* 22, 195-200.
3. Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M (2013) Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep* 3, 3355.
4. Miyata H, Satouh Y, Mashiko D, Muto M, Nozawa K, Shiba K, Fujihara Y, Isotani A, Inaba K, Ikawa M (2015) Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive. *Science* 350, 442-445.
5. Miyata H, Castaneda JM, Fujihara Y, Yu Z, Archambeault DR, Isotani A, Kiyozumi D, Kriseman ML, Mashiko D, Matsumura T, Matzuk RM, Mori M, Noda T, Oji A, Okabe M, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Ramirez-Solis R, Satouh Y, Zhang Q, Ikawa M, Matzuk MM (2016) Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 7704-7710.
6. Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S, Jaenisch R (1992) Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* 71, 383-390.
7. Braun T, Rudnicki MA, Arnold HH, Jaenisch R (1992) Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* 71, 369-382.
8. Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R (1993) MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75, 1351-1359.
9. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R (2013) One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153, 910-918.
10. Schultz N, Hamra FK, Garbers DL (2003) A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 12201-12206.
11. Young SA, Miyata H, Satouh Y, Muto M, Larsen MR, Aitken RJ, Baker MA, Ikawa M (2016) CRISPR/Cas9 mutation of IZUMO1 revealed cytoplasmic tail is dispensable for fertility. *Reproduction* 152, 665-672.
12. Ellerman DA, Pei J, Gupta S, Snell WJ, Myles D, Primakoff P (2009) Izumo is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm. *Mol Reprod Dev* 76, 1188-1199.
13. Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, Yamamoto T, Sakuma T, Suzuki KT (2014) Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun* 5, 5560.
14. Suzuki K, Tanekawa Y, Hernandez-Benitez R, Wu J, Zhu J, Kim EJ, Hatanaka F, Yamamoto M, Araoka T, Li Z, Kurita M, Hishida T, Li M, Aizawa E, Guo S, Chen S, Goebel A, Soligalla RD, Qu J, Jiang T, Fu X, Jafari M, Esteban CR, Berggren WT, Lajara J, Nuñez-Delgado E, Guillen P, Campistol JM, Matsuzaki F, Liu GH, Magistretti P, Zhang K, Callaway EM, Zhang K, Belmonte JC (2016) In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* 540, 144-149.
15. Yoshimi K, Kunihiro Y, Kaneko T, Nagahora H, Voigt B, Mashimo T (2016) ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat Commun* 7, 10431.
16. Choi PS, Meyerson M (2014) Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. *Nat Commun* 5, 3728.
17. Jiang J, Zhang L, Zhou X, Chen X, Huang G, Li F, Wang R, Wu N, Yan Y, Tong C, Srivastava S, Wang Y, Liu H, Ying QL (2016) Induction of site-specific chromosomal translocations in embryonic stem cells by CRISPR/Cas9. *Sci Rep* 6, 21918.
18. Klann TS, Black JB, Chellappan M, Safi A, Song L, Hilton IB, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA (2017) CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nat Biotechnol* 35, 561-568.
19. Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K, Kimura M, Okamura K, Sakai A, Nakashima H, Hata K, Nakashima K, Hatada I (2016) Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat Biotechnol* 34, 1060-1065.
20. Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z, Kondo A (2016) Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* 353, 1248-1257.
21. Nihongaki Y, Kawano F, Nakajima T, Sato M (2015) Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nat Biotechnol* 33, 755-760.
22. Natsume T, Kiyomitsu T, Saga Y, Kanemaki MT (2016) Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors. *Cell Rep* 15, 210-218.
23. Liu JL, Wang TS, Zhao M (2016) Genome-Wide Association Mapping for Female Infertility in Inbred Mice. *G3 (Bethesda)* 6, 2929-2935.
24. Barban N, Jansen R, de Vlaming R, et al (2016) Genome-wide analysis identifies 12 loci influencing human reproductive behavior. *Nat Genet* 48, 1462-1472.