

※このファイルは第381回川崎医学会講演会
(2017年2月9日)で利用したスライドです。

※著作権に関連する可能性のある図は削除し、
リンクを表示しています。

※転載禁止

連絡先: 藤井渉 (awtrfj@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

ゲノム編集による 遺伝子組換え動物作製の基礎と応用

藤井 渉

東京大学大学院農学生命科学研究科
応用動物科学専攻 応用遺伝学研究室

本日のトピック

基礎的な背景情報

- ゲノム改変動物とは
- 人工ヌクレアーゼの基本原理

人工ヌクレアーゼによるゲノム改変個体

- ノックアウト/ノックイン/マウス以外の動物種
- 実際に利用する際の注意点

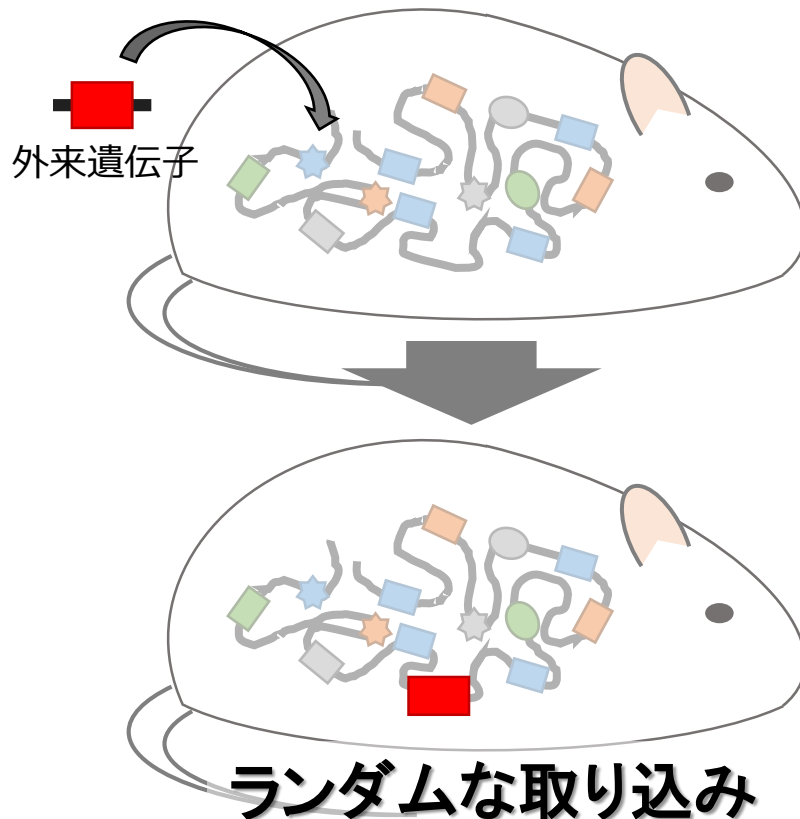
受精卵を介したゲノム改変: 今後の課題

- モザイク変異
- 長い配列のノックイン
- ヒト胚の改変

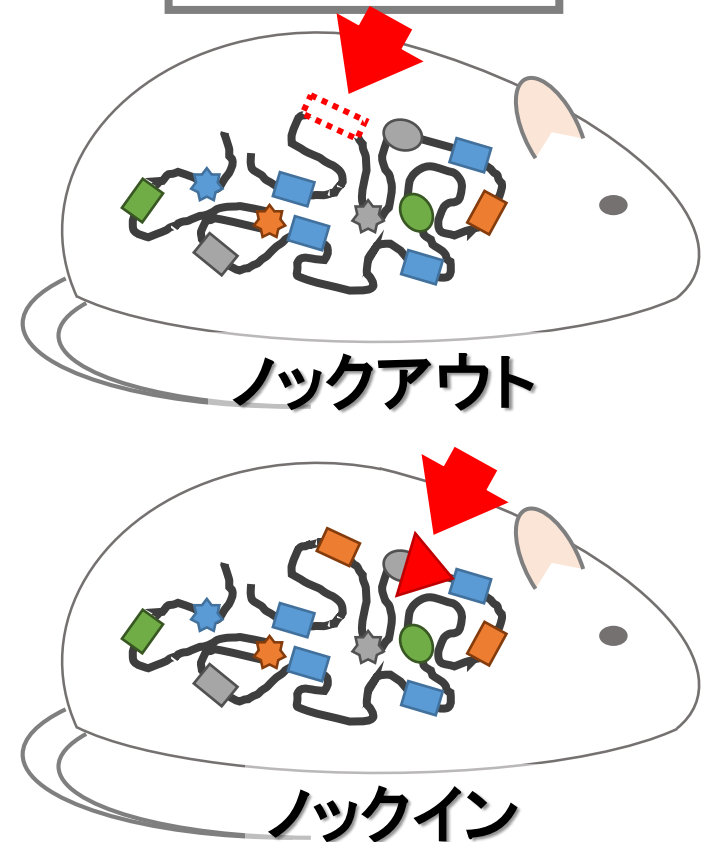
ゲノム改変動物:

内在のゲノムDNA配列の狙った座位に対して
欠失または外来配列の挿入を施した動物

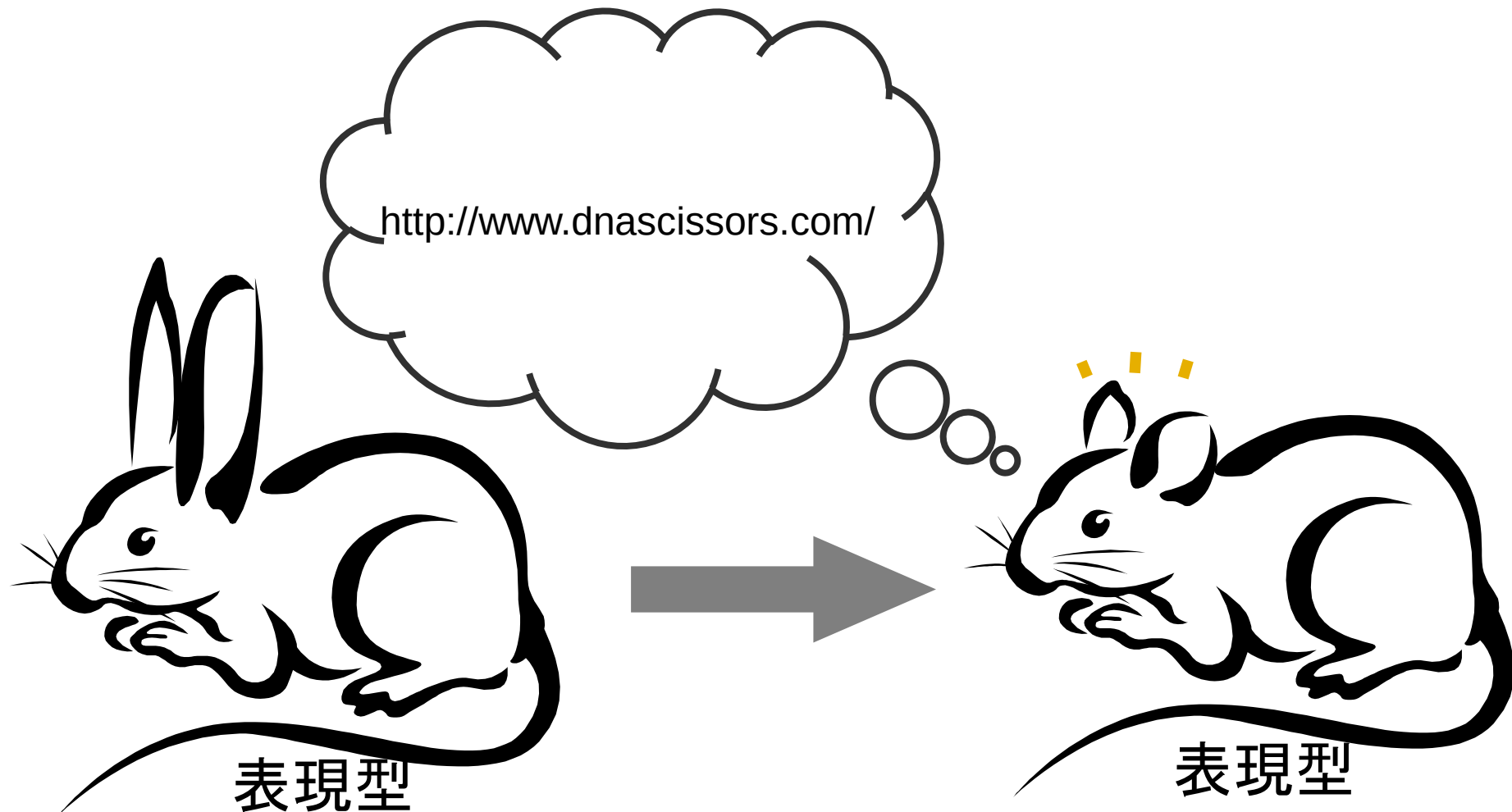
トランスジェニック



ゲノム改変

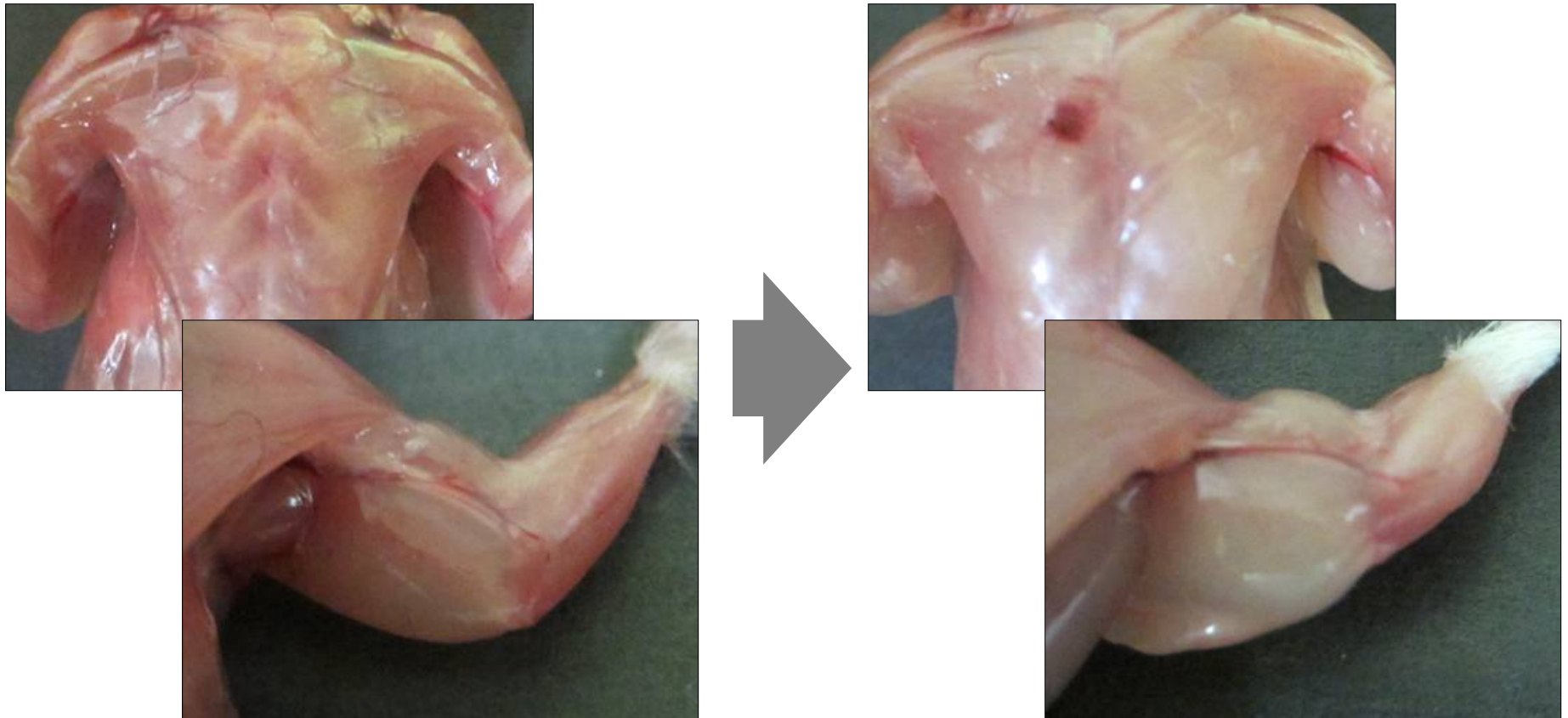


ゲノム改変動物は標的ゲノム配列情報の機能と
個体レベルでの生命現象との関係の評価に有効



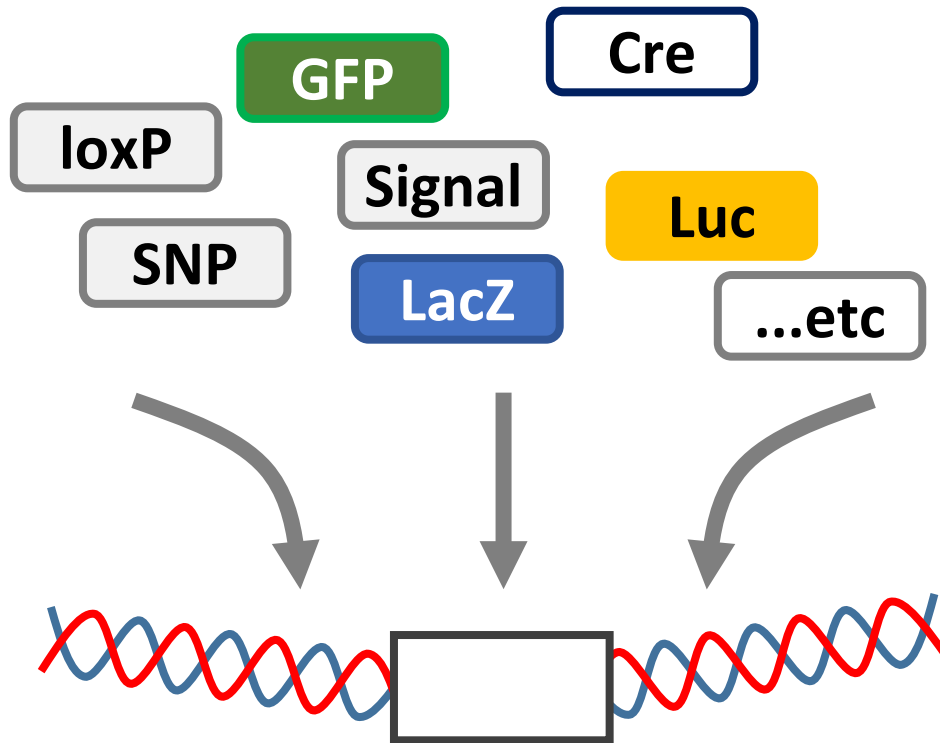
ゲノム改変動物は標的ゲノム配列情報の機能と
個体レベルでの生命現象との関係の評価に有効

ミオスタチン-KO



ノックアウト以外にも.....

ノックイン



変異や染色体異常の再現

<https://www.genome.gov/imagegallery/>

(NHGI)

標的ゲノム配列の改変

→相同組換え法

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15931173>

(Capecchi MR., Nat Rev Genet. 2005)

哺乳動物の細胞内では
ゲノム配列の変換効率(組換え効率)が低い.....

DNA2本鎖切断の修復系

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23181949>

(Brandsma & Gent., Genome Integr., 2012)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25852742>

(Krajewska, Front. Genet., 2015)

ゲノム改変動物の作り方: 従来法

組換え細胞の選抜

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15931173>

(Capecchi MR., Nat Rev Genet. 2005)

多能性幹細胞

キメラ作製

生殖幹細胞

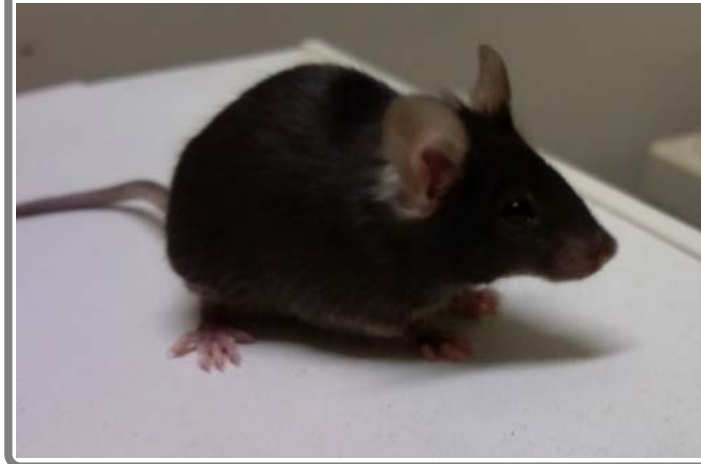
精巣移植

http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/textiles/research-topics/images/p_ab_takashima_1.png

(信州大学・高島研HP)

体細胞核移植

ゲノム改変個体



ゲノム改変動物の作り方：従来法

従来法の課題

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15931173>
- ・応用できる動物種が限られている
 - ・長期間、高コスト、労力を要する

実験戦略として選択しにくい

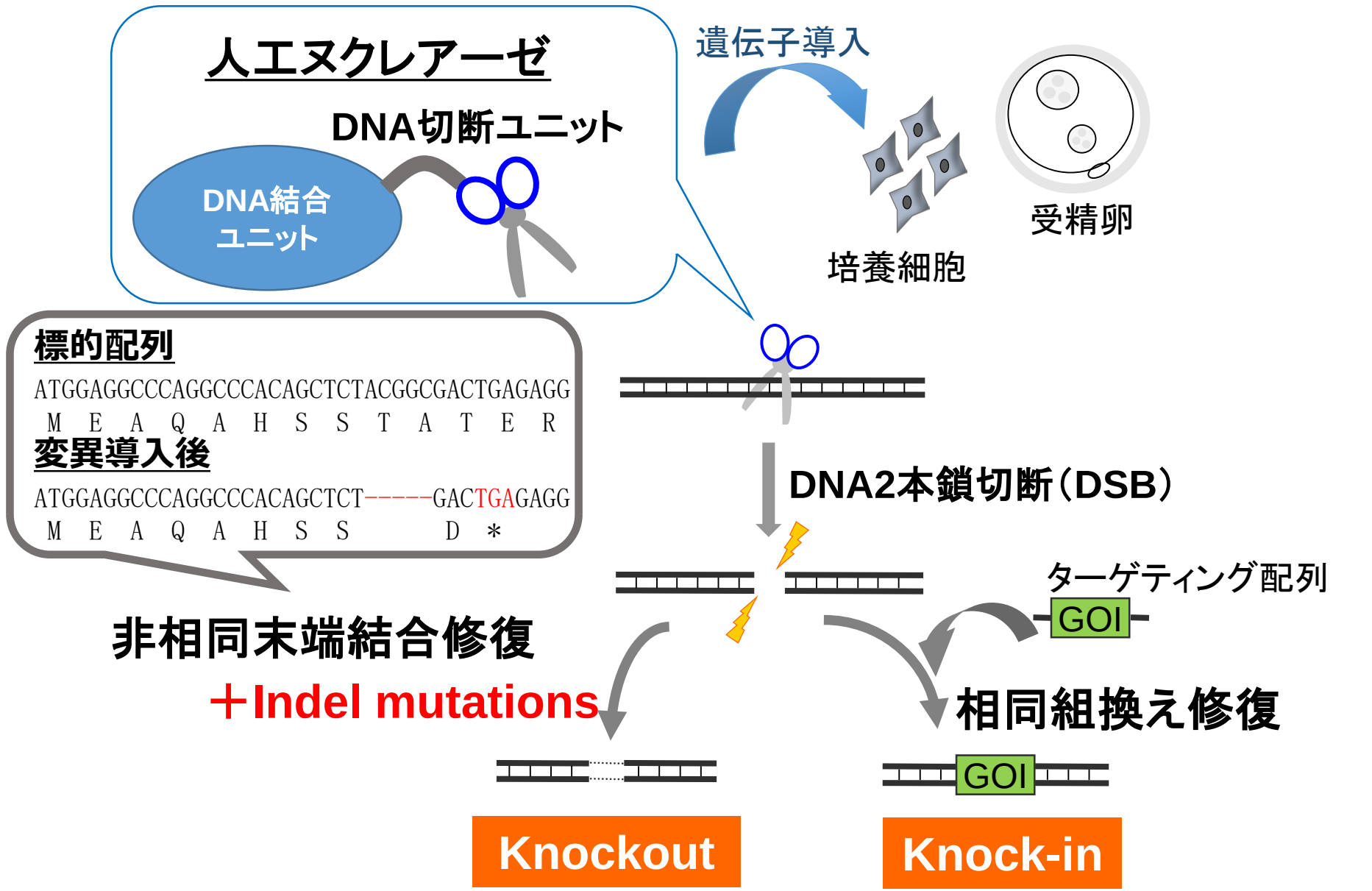
人工ヌクレアーゼ

生殖

http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/textiles/research-topics/images/p_ab_takashima1.pdf

(信州大学・高島研HP)

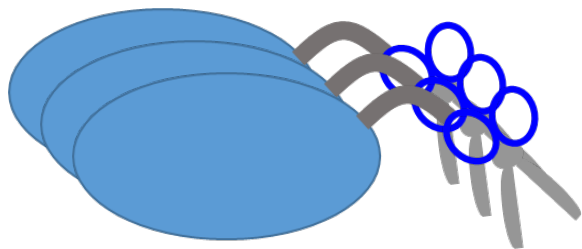
ゲノム編集とは？



人工ヌクレアーゼによるゲノム改変

①

人工ヌクレアーゼの準備



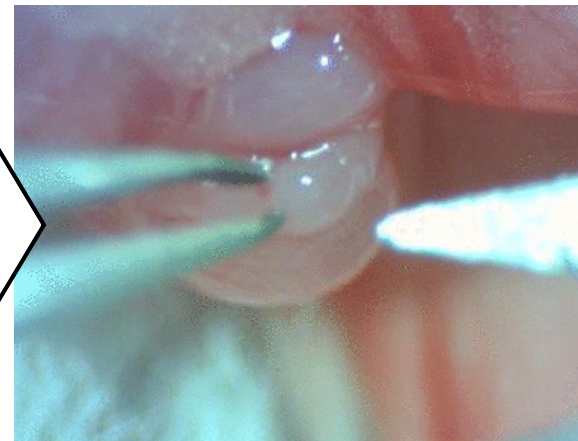
②

受精卵への注入



③

胚移植



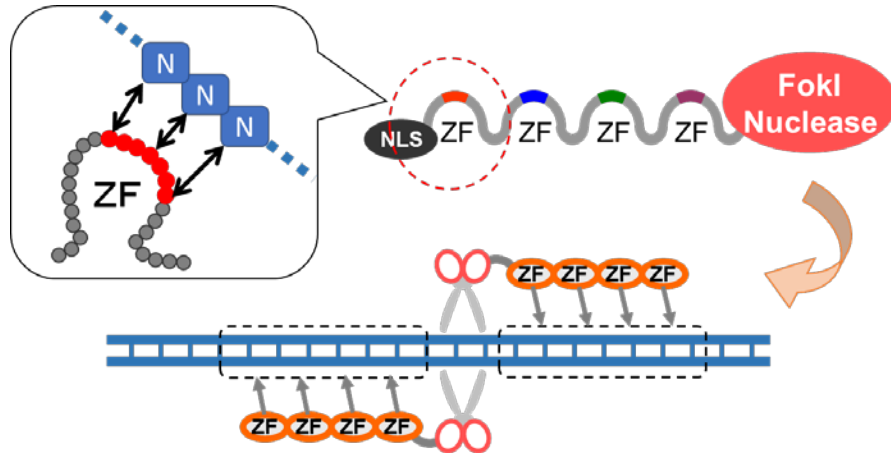
人工ヌクレアーゼによる受精卵を介したゲノム改変法によって、短期間かつ安価にゲノム改変個体の作製が可能となった

ゲノム改変個体

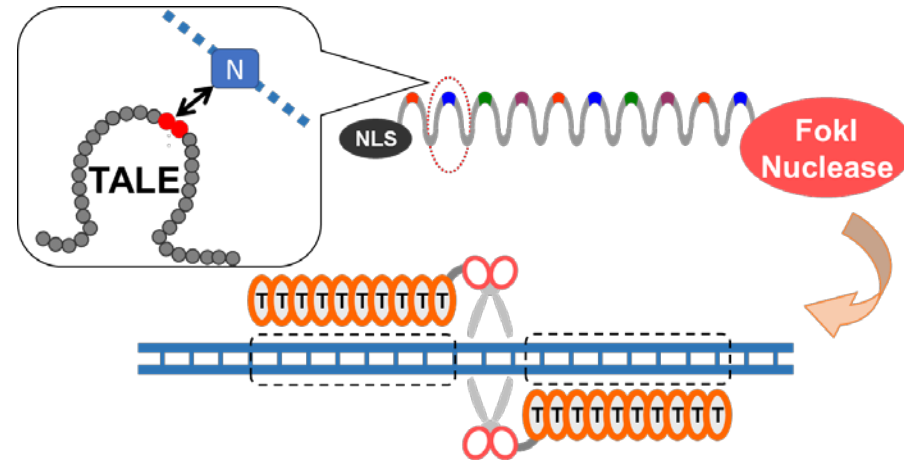


主要な人工ヌクレアーゼ

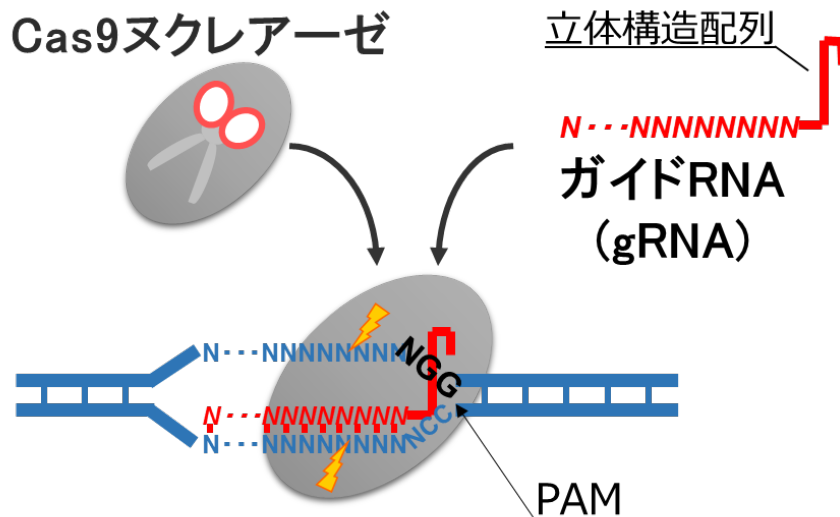
Zinc finger nuclease (ZFN)



Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)



CRISPR/Cas system



その他

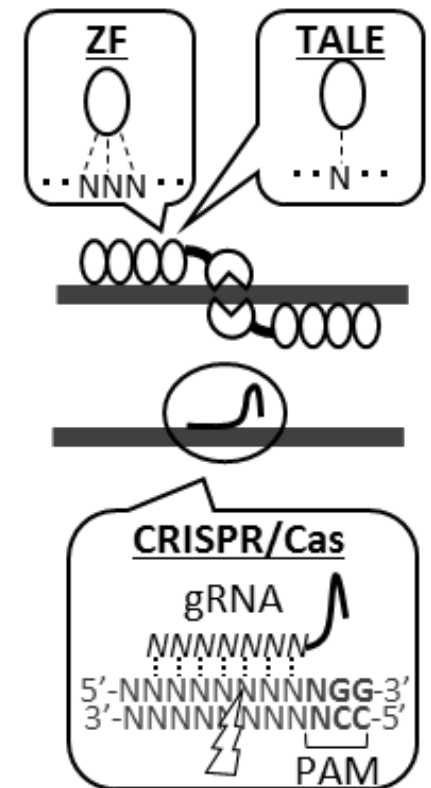
- Meganuclease
- ARCUT
(PNA + Ce(IV)/EDTA, 日本発)
- BurrH-based nucleasesなど
(TALE様のDNA結合タンパク質)

ZFN vs TALEN vs CRISPR/Cas

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24690881>

ZFN vs TALEN vs CRISPR/Cas

- 利用する細胞種や動物種、標的配列によって正確性や変異導入効率は変わる
- ZFN,TALENと比べてCRISPR/Casは標的配列の設計や合成が簡単



それぞれの人工ヌクレアーゼによる
ゲノム改変個体の作製

ZFNによるゲノム改変

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 93, pp. 1156–1160, February 1996
Biochemistry

Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to *Fok* I cleavage domain

YANG-GYUN KIM, JOOYEUN CHA, AND SRINIVASAN CHANDRASEGARAN*

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC40048/>

| PNAS | August 24, 2010 | vol. 107 | no. 34

Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases

Melanie Meyer^{a,b}, Martin Hrabé de Angelis^{b,c}, Wolfgang Wurst^{a,b,d,1}, and Ralf Kühn^{a,b,1}

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20686113>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822235>

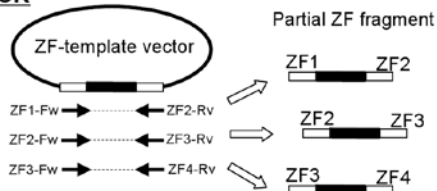
DeFrancesco (2011)

新規ZFN構築法の確立と応用

約1ヶ月

OLTA method

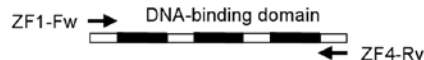
1st PCR



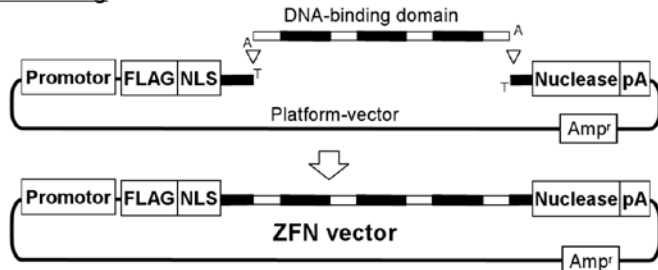
2nd PCR



3rd PCR



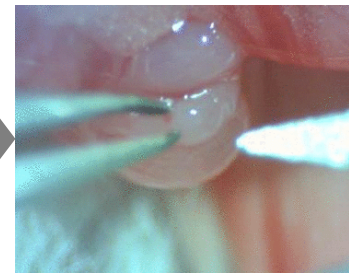
TA cloning



Microinjection



Embryo transfer



Target	Mutated pups (%)
<i>Gli3</i>	22/5 (22.7)
<i>Rosa26</i>	7/1 (14.3)
<i>Il2rg</i>	8/1 (12.5)
<i>Aqpep</i>	16/16 (100)

(Fujii et al., PLoS ONE, 2013, Fujii et al., J Reprod Develop., 2015)

TALENによるゲノム改変 (マウス)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302927>

CRISPR/Casによるゲノム改変

www.sciencemag.org SCIENCE VOL 339 15 FEBRUARY 2013

RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9

Prashant Mali,^{1*} Luhan Yang,^{1,3*} Kevin M. Esvelt,² John Aach,¹ Marc Guell,¹ James E. DiCarlo,⁴ Julie E. Norville,¹ George M. Church^{1,2†}

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23287722>

Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems

Le Cong,^{1,2*} F. Ann Ran,^{1,4*} David Cox,^{1,3} Shuailiang Lin,^{1,5} Robert Barretto,⁶ Naomi Habib,¹ Patrick D. Hsu,^{1,4} Xuebing Wu,⁷ Wenyan Jiang,⁸ Luciano A. Marraffini,⁸ Feng Zhang^{1†}

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23287718>

CRISPR/Casによるゲノム改変 (マウス)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23545779>

(Shen et al., Cell Res., 2013)

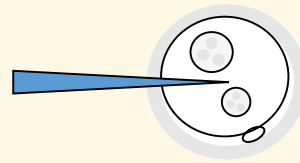
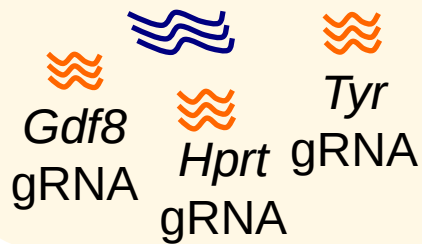
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23643243>

(Wang et al., Cell., 2013)

CRISPR/Casによるゲノム改変 (マウス複数遺伝子破壊)

Target gene: *Gdf8*, *Hprt*, *Tyr*

CAS9 mRNA



cheast

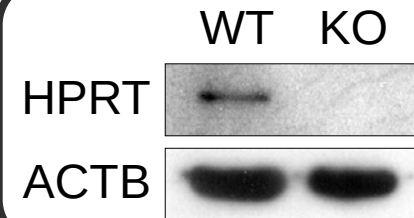
forelimb

hindlimb

WT

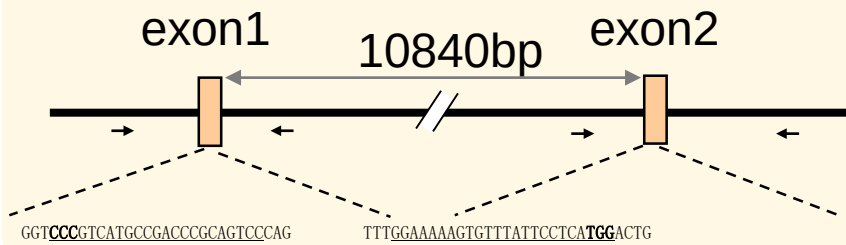


KO

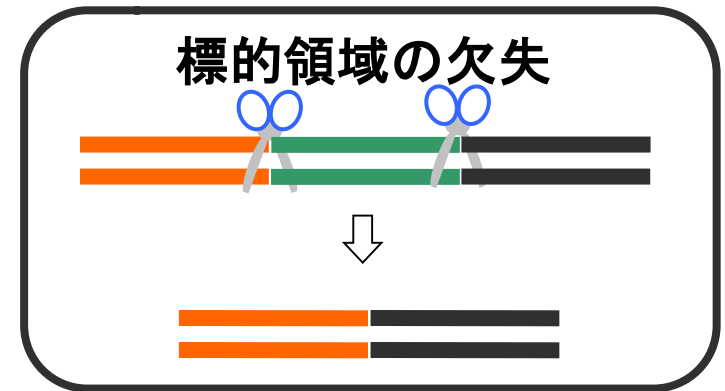
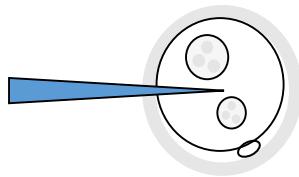


CRISPR/Casによるゲノム改変 (マウス標的領域欠失)

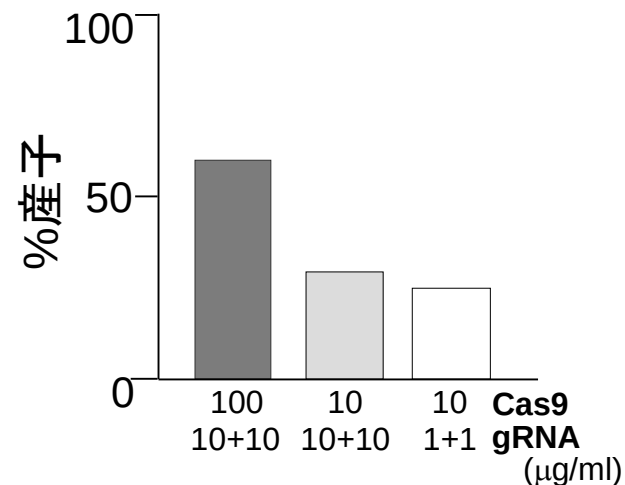
Double restriction at Hprt gene



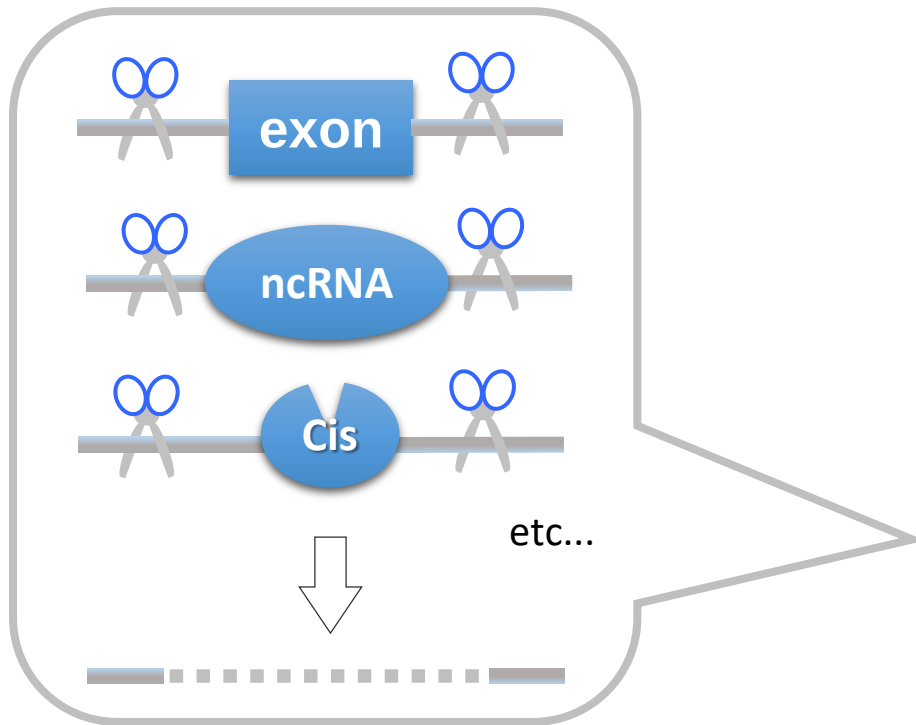
gRNAs
CAS9 mRNA



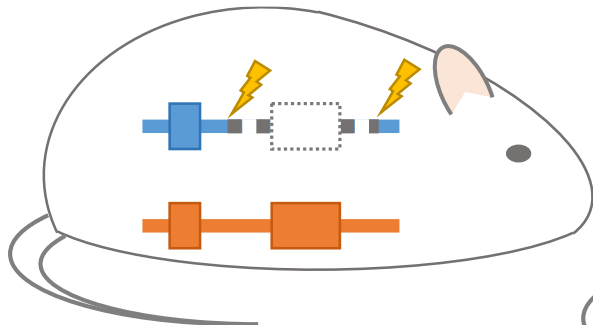
領域欠失効率



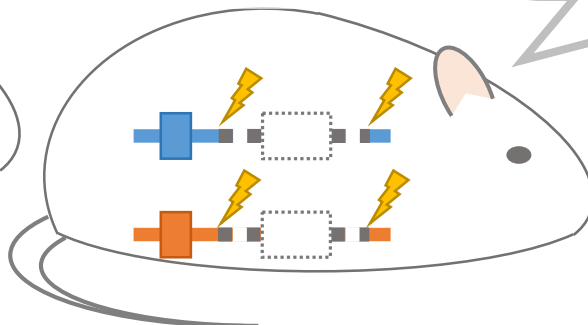
領域欠失マウスの利点



シングルKO



ダブルKO



個体1



個体2



1箇所への変異導入

個体1



個体2

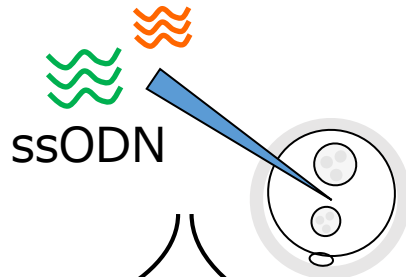


exonの欠損

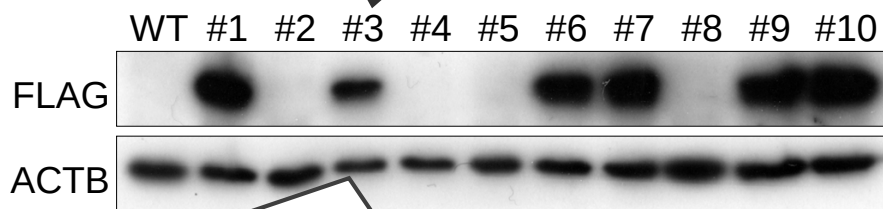
CRISPR/Casによるゲノム改変 (ノックインマウス)

タグ、SNPの挿入

人工ヌクレアーゼ



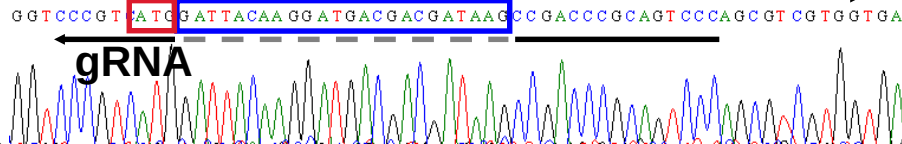
floxed



#3

FLAG-tag

gRNA

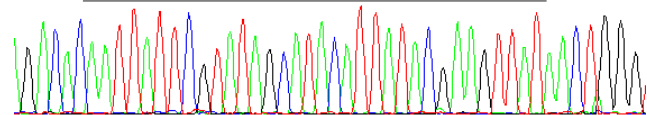


(Fujii et al., BBRC, 2014)

5'

lox-JT15

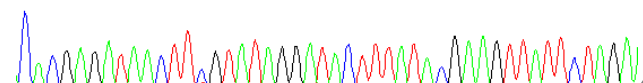
AGACACAAATTATTCGTATAGCATACATTATACGAAAGTTATAACTGGG.....



3'

lox-2272

.....CACGAGATAACTTCGTATAGGATACTTTATACGAAAGTTATCTAGAG.....



(Fujii et al., Unpublished)

個体レベルのゲノム改変

げっ歯類

- マウス、ラット、ハムスター など

大動物

- ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ など

霊長類

- カニクイザル、アカゲザル など

その他

- ウサギ、イヌ、フェレット など

CRISPR/Casによるゲノム改変 (ノックアウトブタ)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24481528>

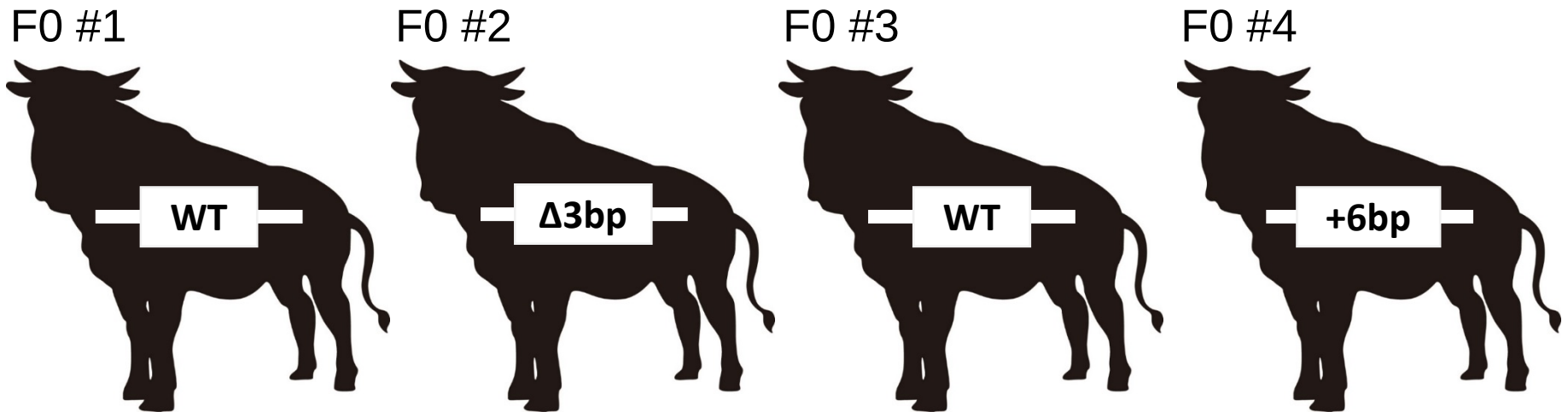
CRISPR/Casによるゲノム改変 (ノックアウトサル)

カニクイザル

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24486104>

産子数の少ない大動物家畜では...

産子数が少なく妊娠期間も長い動物種では、
ランダムな変異の産子を得るのはリスクが大きい



→あらかじめゲノム改変した体細胞核を利用した
体細胞核移植によって産子を得る報告が多い

ZFN/SCNTによるゲノム改変 (ノックアウトウシ)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3364726/>

TALENによるゲノム改変 (ノックアウトニワトリ)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25139993>

作製方法の基礎

基本的な実験の流れ

①

ツールの入手

②

標的座位の選定

③

人工ヌクレアーゼの
遺伝子導入

④

変異の検出

基本的な実験の流れ

①

ツールの入手

②

標的座位の選定

③

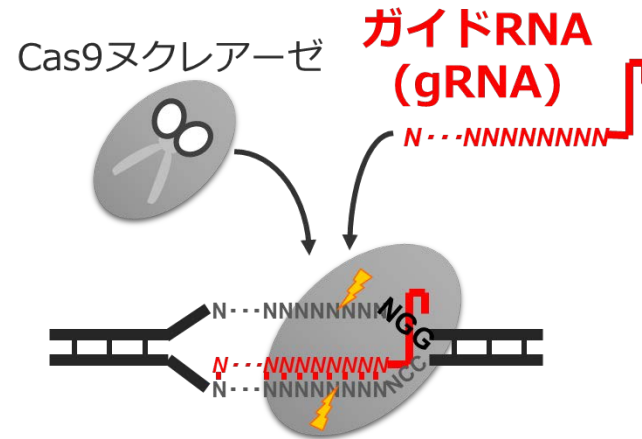
人工ヌクレアーゼの
遺伝子導入

④

変異の検出

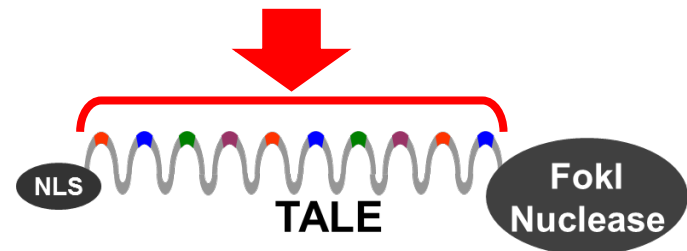
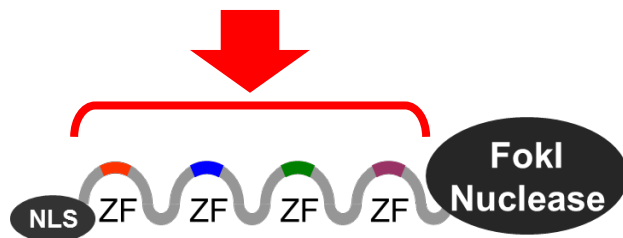
CRISPR/Cas

- Cas9は共通。標的ごとにgRNAを合成する。
発現ベクターで利用する場合はU6プロモーター、
RNA合成する場合はT7プロモーターなどを付加した
gRNA配列を用意する。



ZFN, TALEN

- DNA認識ユニットの部分を改変し、FokIヌクレアーゼと
結合したベクターを用意する。



人工ヌクレアーゼの入手

- 塩基配列情報を基に人工合成する
- 報告者にリクエストする
- 市販業者から購入する
- Addgeneなどのリソースセンターから購入する

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24690881>

基本的な実験の流れ

①

ツールの入手

②

標的座位の選定

③

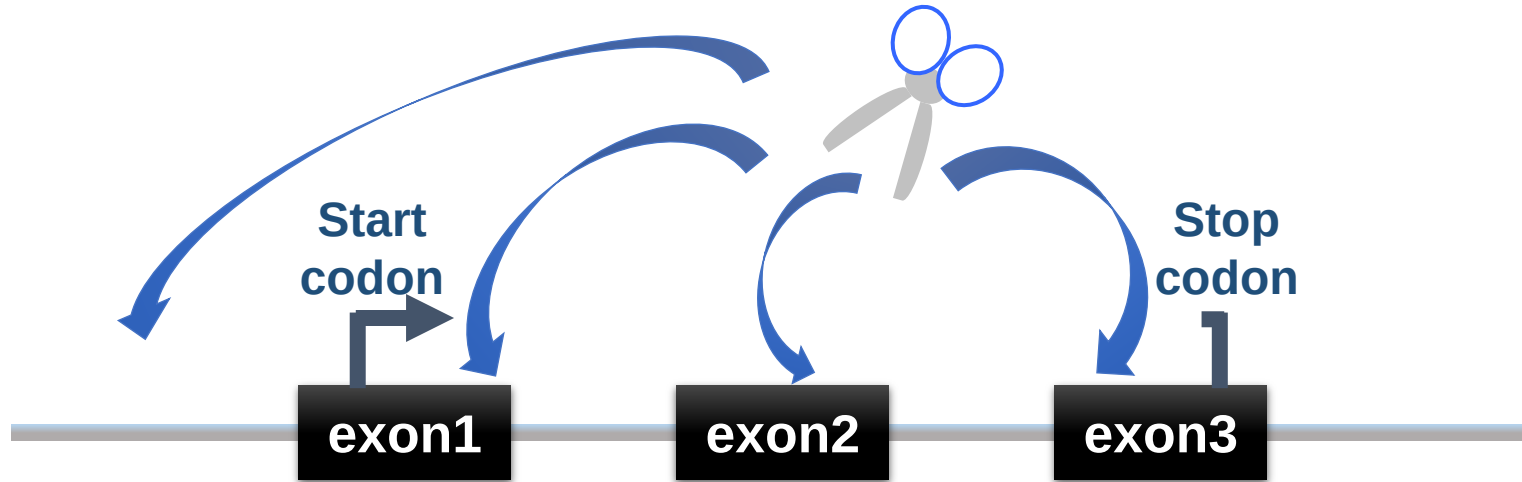
人工ヌクレアーゼの
遺伝子導入

④

変異の検出

標的とする座位は？

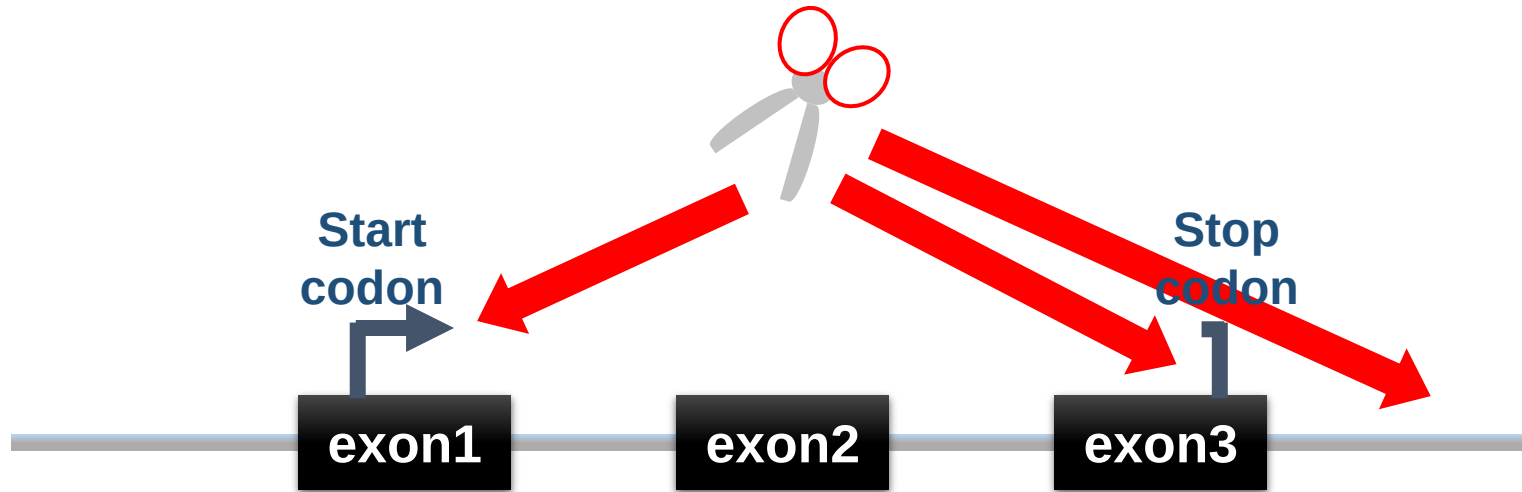
Knockout: 様々な座位を標的とすることができる



- 転写制御領域、翻訳領域（重要ドメインの上流など）が標的となる。
- Start codonを破壊しても、下流のメチオニンからtruncatedな配列が発現する可能性がある。
- ノックアウト？ドミナントネガティブ？

標的とする座位は？

Knock-in: 導入座位に設計する



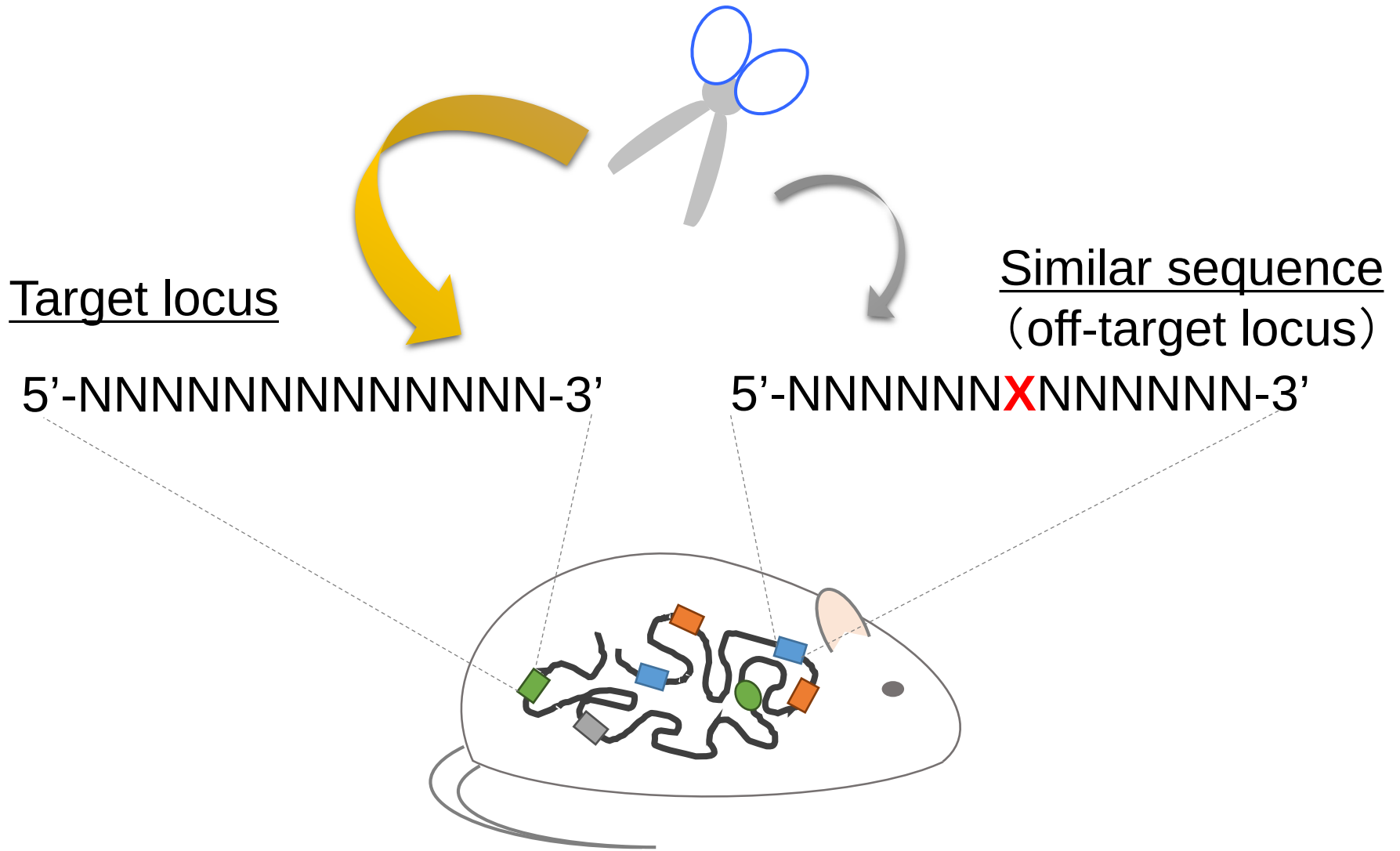
- ノックインの目的座位に重なるように人工ヌクレアーゼの標的を設計する必要がある。
- 設計可能な範囲が制限されるため、特にオフターゲット効果を慎重に考慮する必要がある。

オンライン設計ツール

Webツール

- CRISPRdirect （日本語対応、CRISPR用）
 - ZiFiT （CRISPR、ZFN、TALEN）
 - EENdb （CRISPR、ZFN、TALEN）
 - CHOPCHOP （CRISPR、TALEN）
 - CRISPR Design （CRISPR）
- アルゴリズムや対応できる動物種が異なる

Off-target effect



解決案①

ニッカーゼやFokI-dCASを利用する

Cas9 nickase

RNA-guided FokI Nuclease

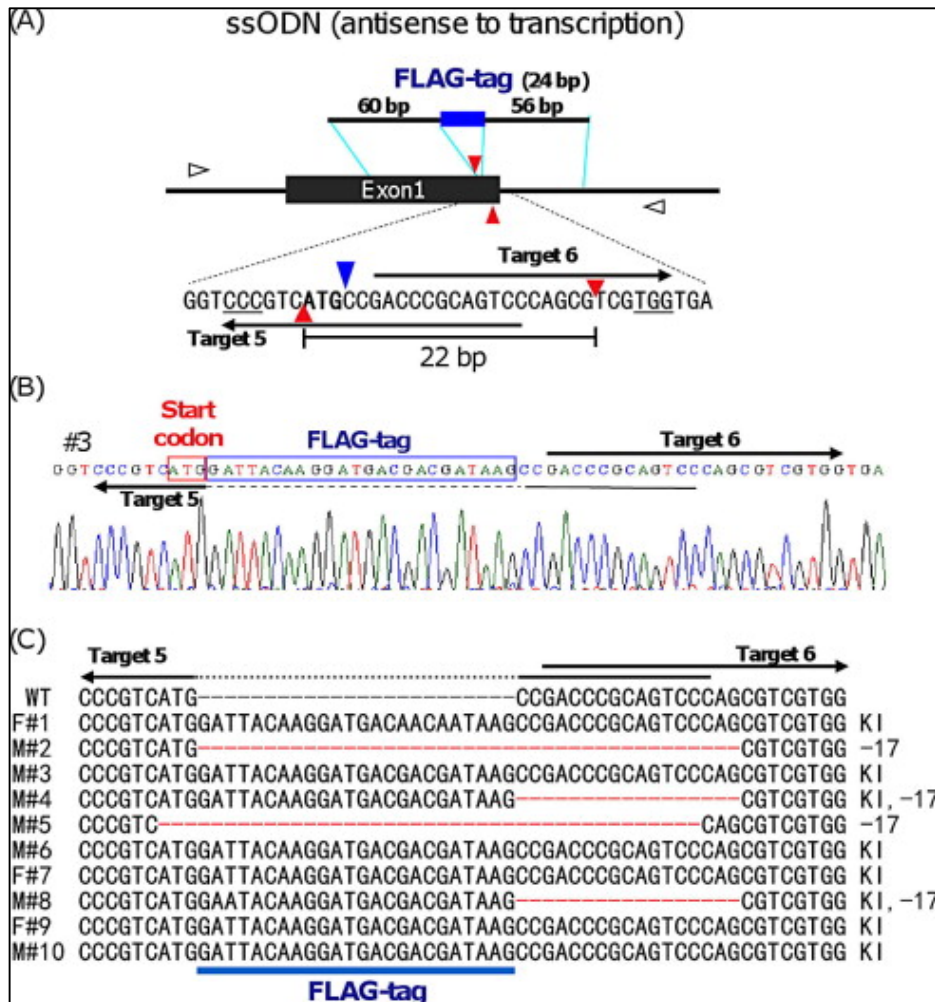
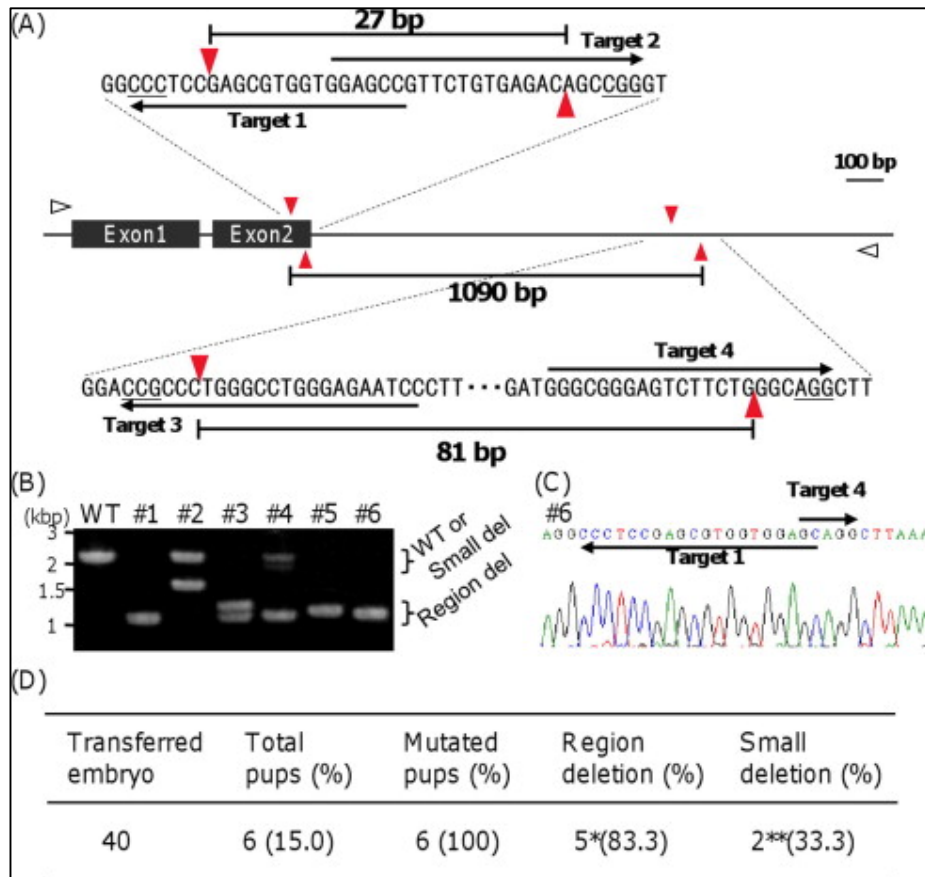
enhanced-specificity variants (eSpCas9)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26628643>

CAS9ニッカーゼによるゲノム改変マウスの作製

ノックアウト

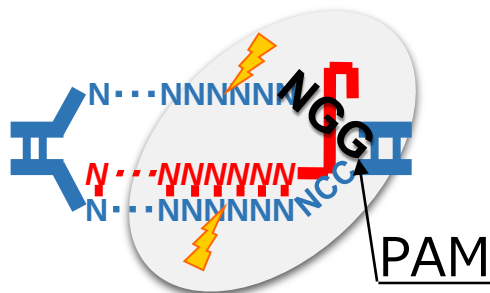
ノックイン



解決案②

オーソログCRISPR/Casによるゲノム改変

従来型



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24270795>

Fonfara et al. (2014)

Tyr-KO

5' -ATGGCCATCAGAGATCTGGAAACTCCACAGAAAGG-3'
ST1-CAS9 (PAM: NNAGAA)



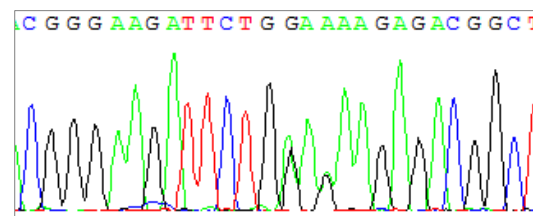
(C57BL/6NCr-based)

IL1α-SNP

AAG → GAA
(K) → (E)

5' -ATTCTGAAGAAGAGACGGCTG-3'

ST1gRNA (NNAGAA)



(Fujii et al., BBRC., 2016)

基本的な実験の流れ

①

ツールの入手

②

標的座位の選定

③

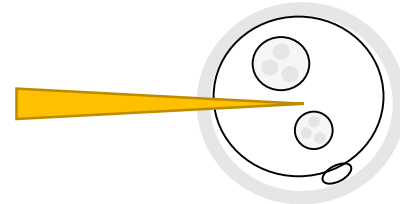
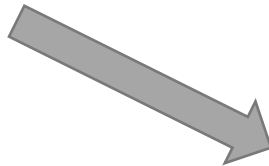
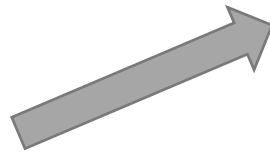
人工ヌクレアーゼの
遺伝子導入

④

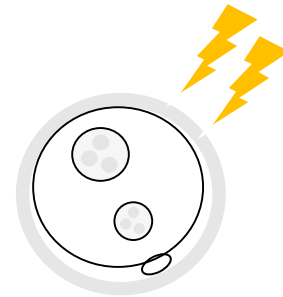
変異の検出

受精卵へのコンストラクトの導入

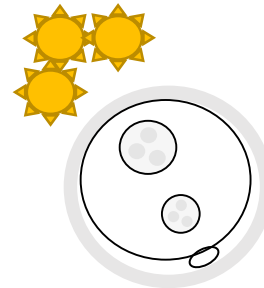
人工ヌクレアーゼ
コンストラクト



顕微注入



エレクトロポレーション



リポフェクション、ウイルスベクター

顕微注入によるコンストラクトの導入

DNA

→前核注入

RNA

→細胞質注入

Movie:

<http://www.wtrfujii.com/resource.html>

作製効率の良し悪しは注入量に依存する？

マイクロマニピュレーションと受精卵移植を 介さない方法（GONAD法）

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4476150/>

基本的な実験の流れ

①

ツールの入手

②

標的座位の選定

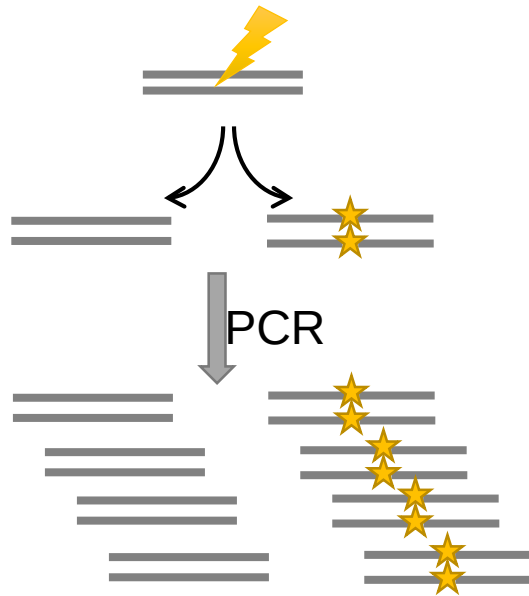
③

人工ヌクレアーゼの
遺伝子導入

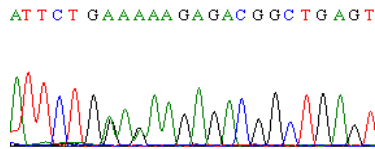
④

変異の検出

導入変異(indel)の検出方法

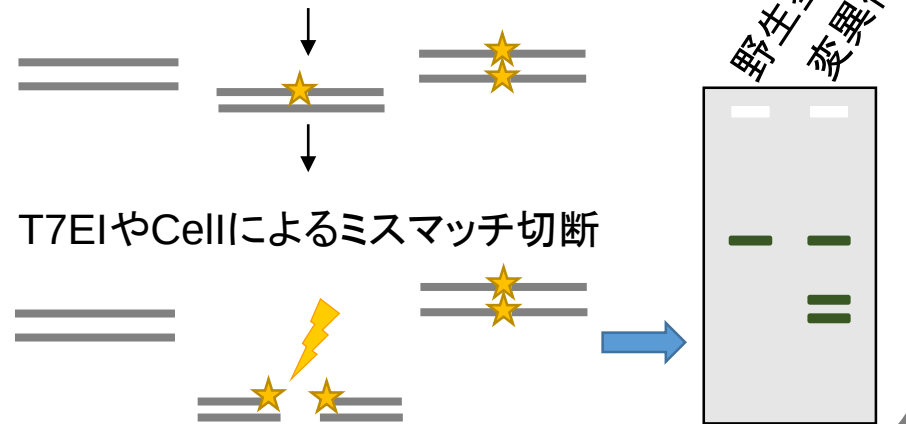


①PCR-direct sequencing



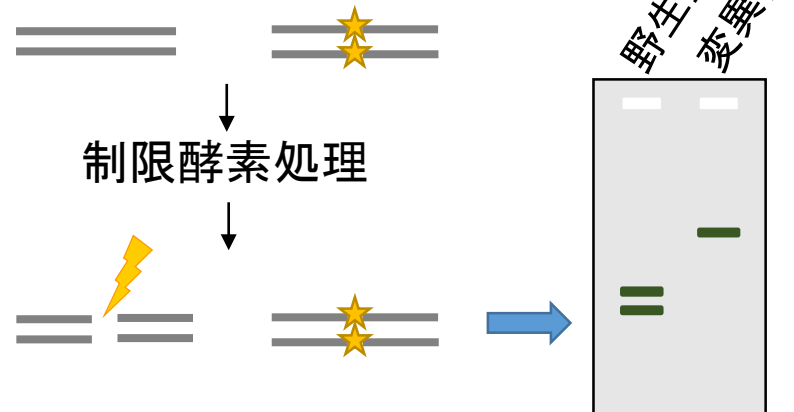
②Surveyor assay

Mix, denature, reannealing



③PCR-RFLP

制限酵素処理



当たりの動物/細胞が検出できたら.....

動物

- KO/KIが期待できる個体を系統化
胚凍結、理研BRCなどにデポジットなど
(命名の例: B6. XXX^{em1Fjw}/J)

細胞

- **変異細胞のクローニングが最重要ステップ**
(効率よく選抜できる系が必要)

受精卵を介したゲノム編集: 今後の課題

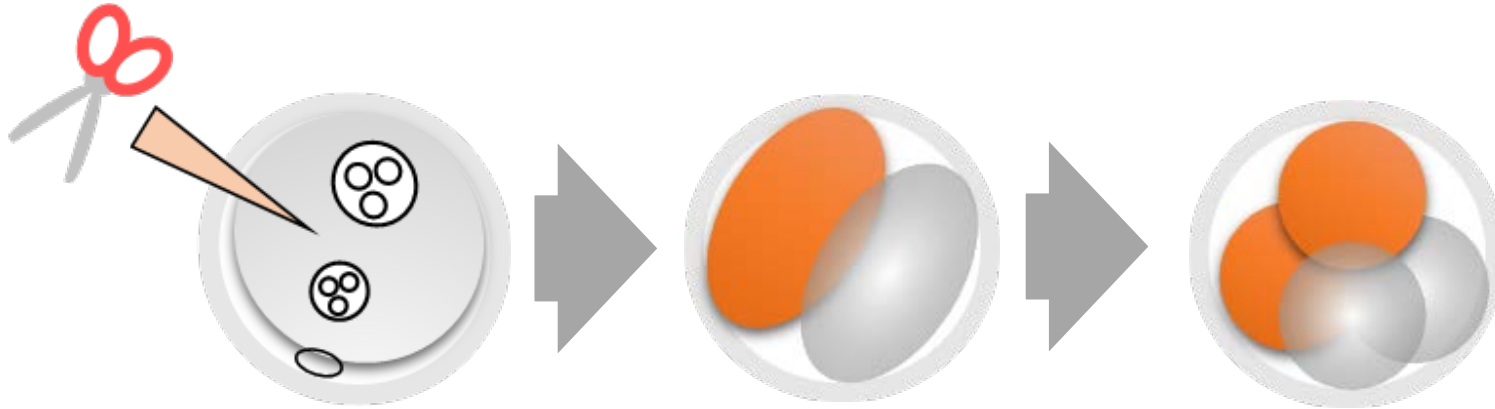
受精卵を介したゲノム編集: 今後の課題

- モザイク変異導入

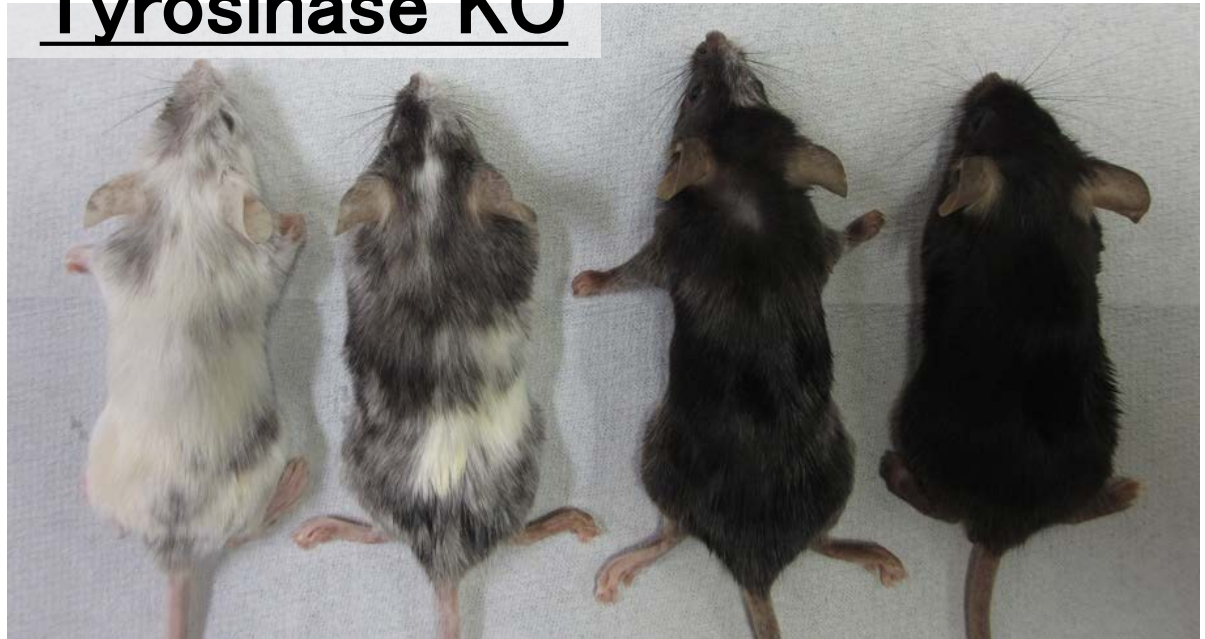
- 長鎖DNA配列・複数座位のノックイン効率

- ヒト胚への応用

課題:モザイク変異

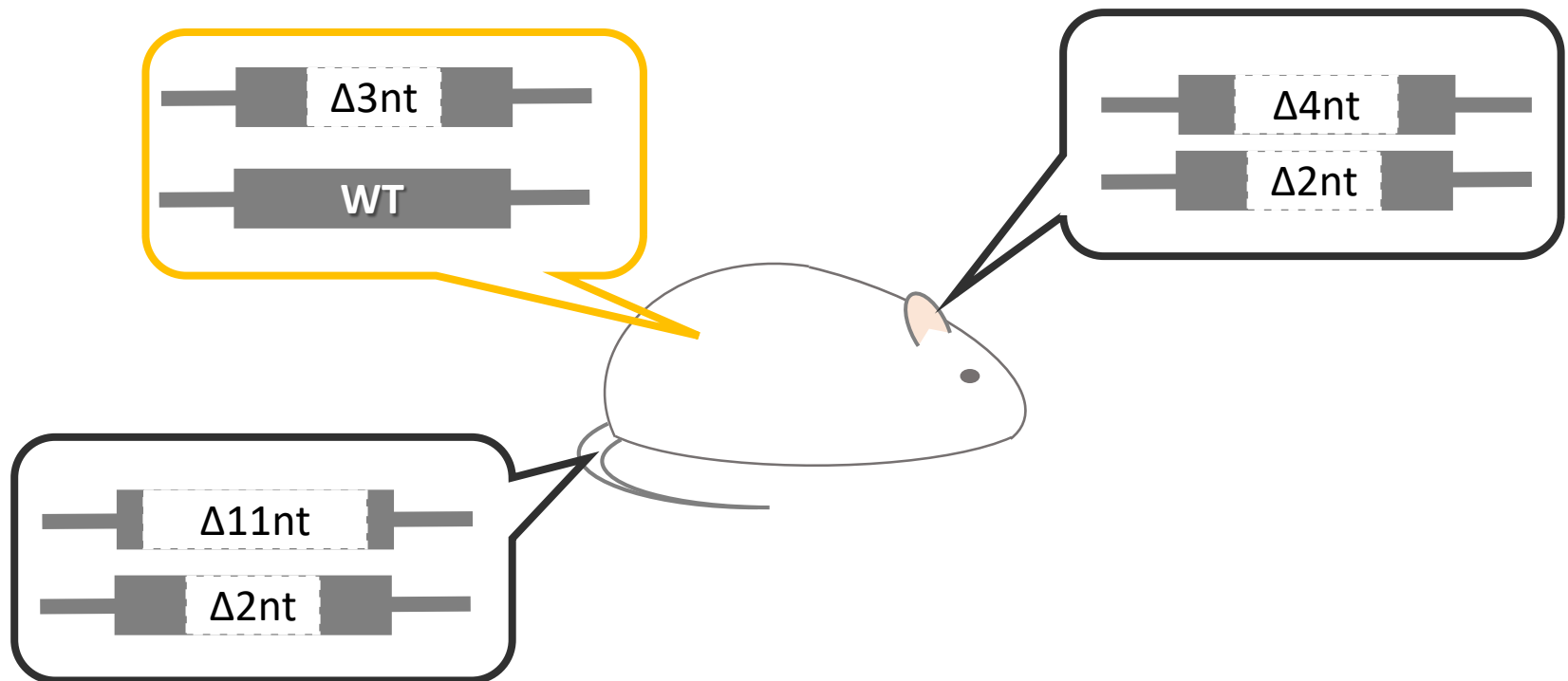


Tyrosinase KO



課題:モザイク変異

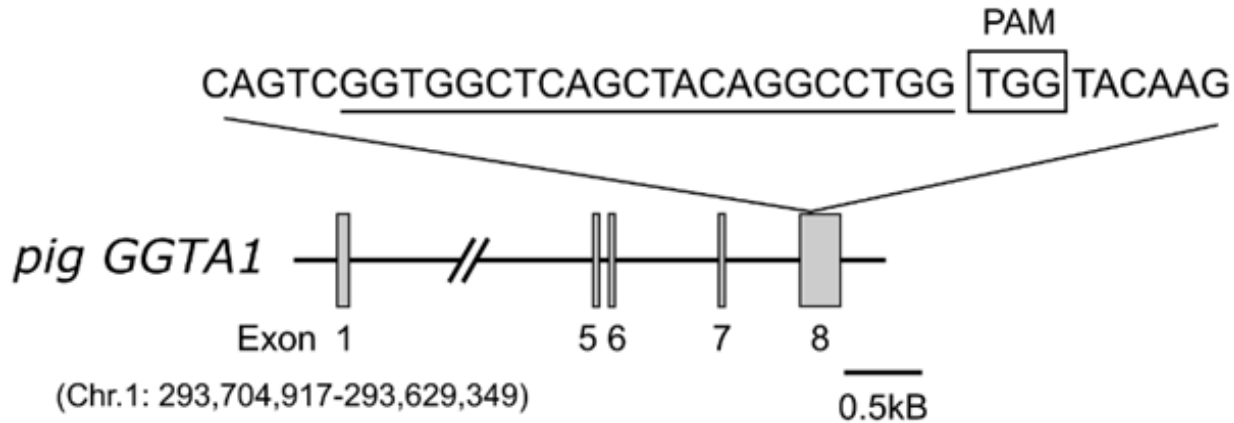
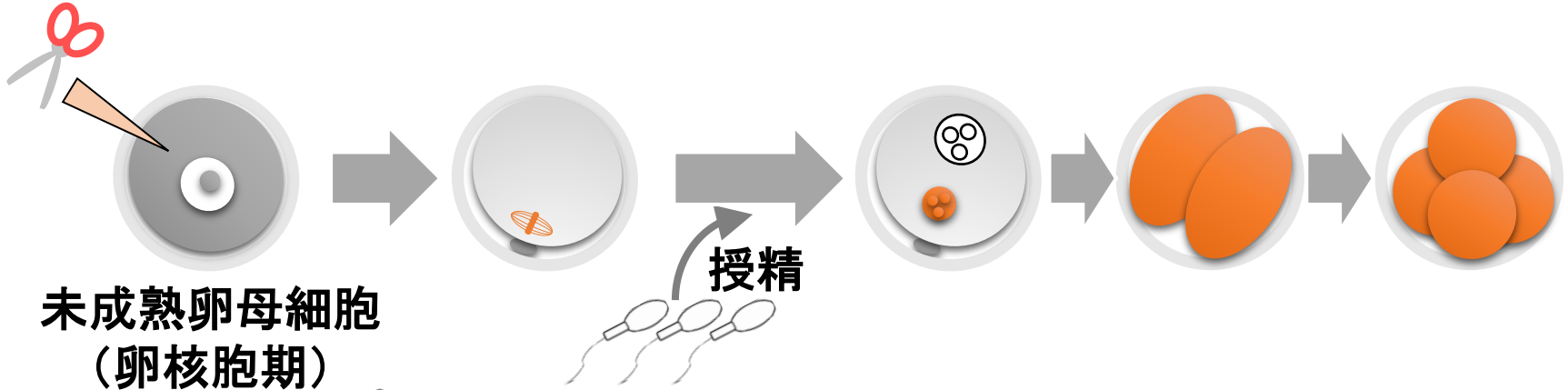
- F0で機能解析を行う場合、遺伝子タイピングしたゲノムを抽出した細胞と、観察対象の細胞(組織)は異なるゲノム配列を保有する可能性がある。



モザイク変異によるリスクを回避するには？

- F1以降の個体で評価を行う。
- 雄性生殖細胞（精子幹細胞、GS細胞）や雌性生殖細胞（未受精卵母細胞）でゲノム改変を行う。

未受精卵を用いた人工ヌクレアーゼによるゲノム改変



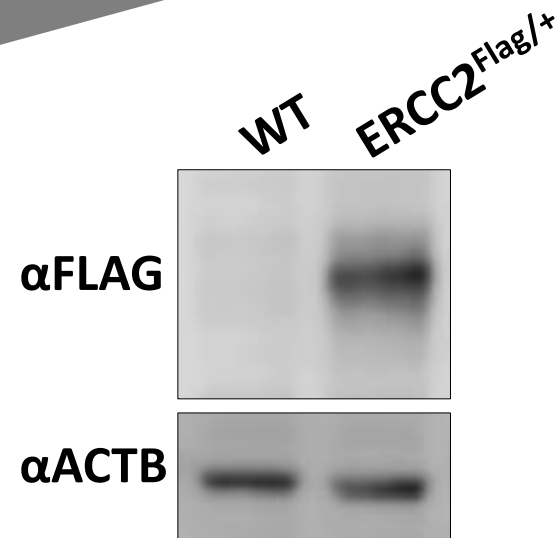
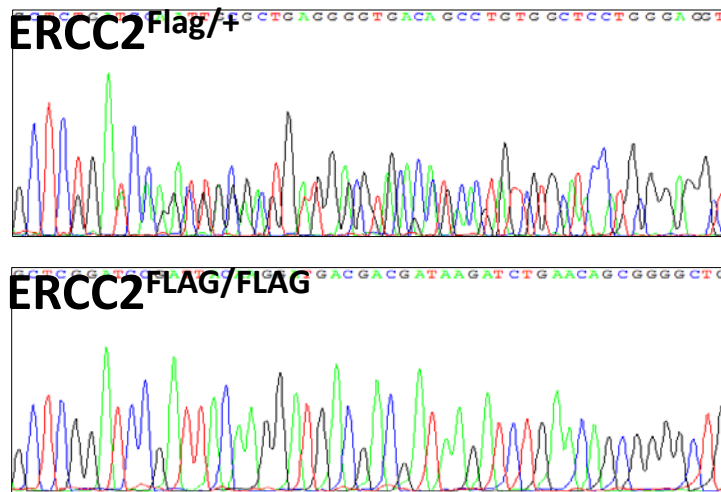
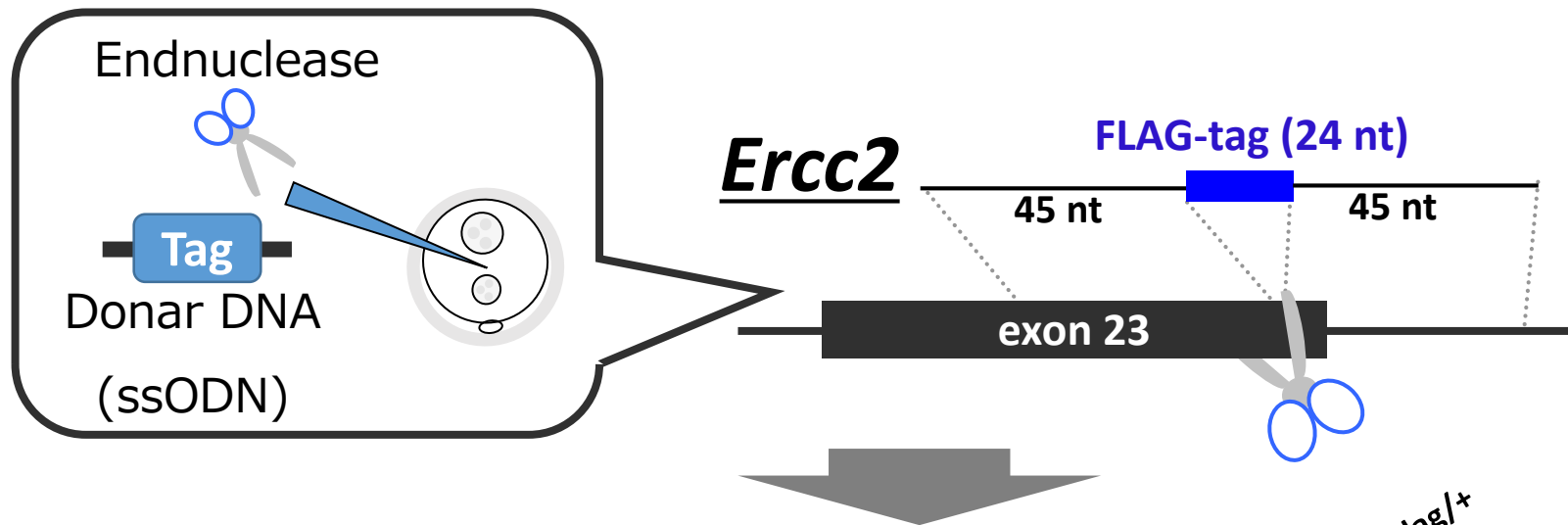
GV (+LMB)	CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGCC--GGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-1
	CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGG-----TGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-5
	CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGCC-----AAGGCACATCCTGACGA	-9
	-----cCACATCCTGACGA	-170,+1

(Onuma et al., J Reprod Develop., 2016)

受精卵を介したゲノム編集: 今後の課題

- モザイク変異導入
- 長鎖DNA配列・複数座位のノックイン効率
- ヒト胚への応用

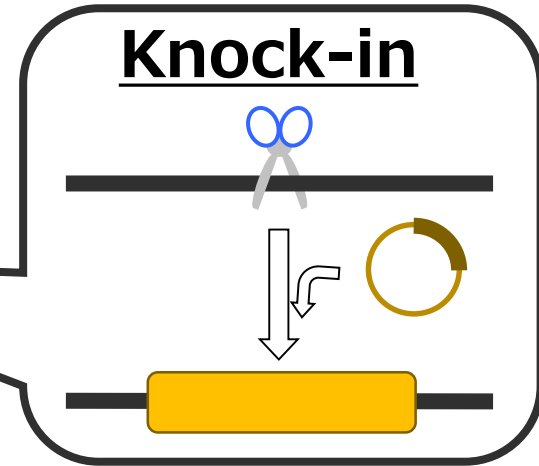
1本鎖DNAを用いたノックインは効率が良い



(Fujii W., unpublished)

プラスミドDNAを用いたノックインは効率が低い

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23992847>



(Yang et al., Cell., 2013)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25058643>

(Yang et al., Nat Protocols., 2014)

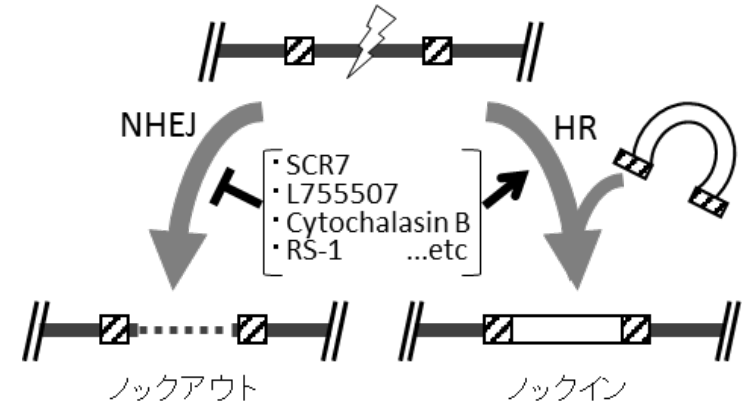
ノックイン効率を上げるには？

これまでの報告

- 小分子化合物による修復経路の操作

(一部は再現性の確認が必要？)

- 長鎖1本鎖DNAを鋳型としたノックインの試み



(藤井 渉. 動物遺伝育種学研究. 2017)

今後の課題

Stochastic → Deterministic

受精卵を介したゲノム編集: 今後の課題

- モザイク変異導入
- 長鎖DNA配列・複数座位のノックイン効率
- ヒト胚への応用

遺伝子治療の議論: ヒト受精卵の遺伝子治療

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25894090>

ヒトのゲノム改変： 本当に必要か？ ⇔ なぜ駄目なのか？

The economist August 22nd-28th 2015

(The economist HP)

受精卵を介したゲノム編集: 今後の課題

- モザイク変異導入
- 長鎖DNA配列・複数座位のノックイン効率
- ヒト胚への応用

連絡先: 藤井渉 (awtrfj@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)