

ゲノム編集動物作製の基礎

藤井 渉 @東京大学

遺伝学的アプローチとは？

順遺伝学 (フォーワードジェネティクス):

ユニークな表現型を示す個体を抽出・解析し、その原因となる遺伝子を探索する

逆遺伝学 (リバーズジェネティクス):

着目した遺伝子を操作した個体を作製し、どのような表現型を呈するか観察することで遺伝子機能を探索する

-> 形質と遺伝型との因果関係を実証できる

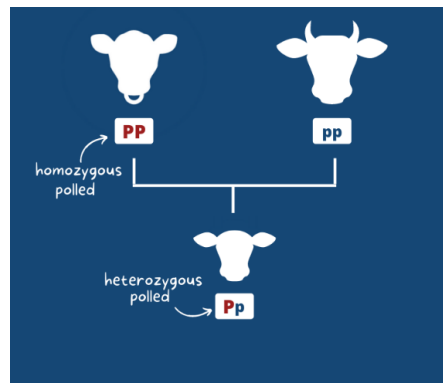
個体レベルでは難しい。。

例) ウシの角形成

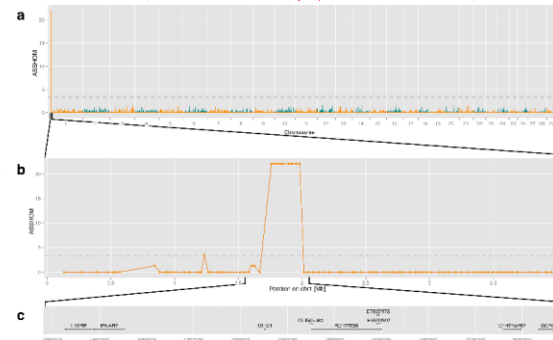


<https://www.mukakuwagyu.jp/>

無角が優性(顕性)



第一染色体上に関連遺伝子座(順遺伝学)



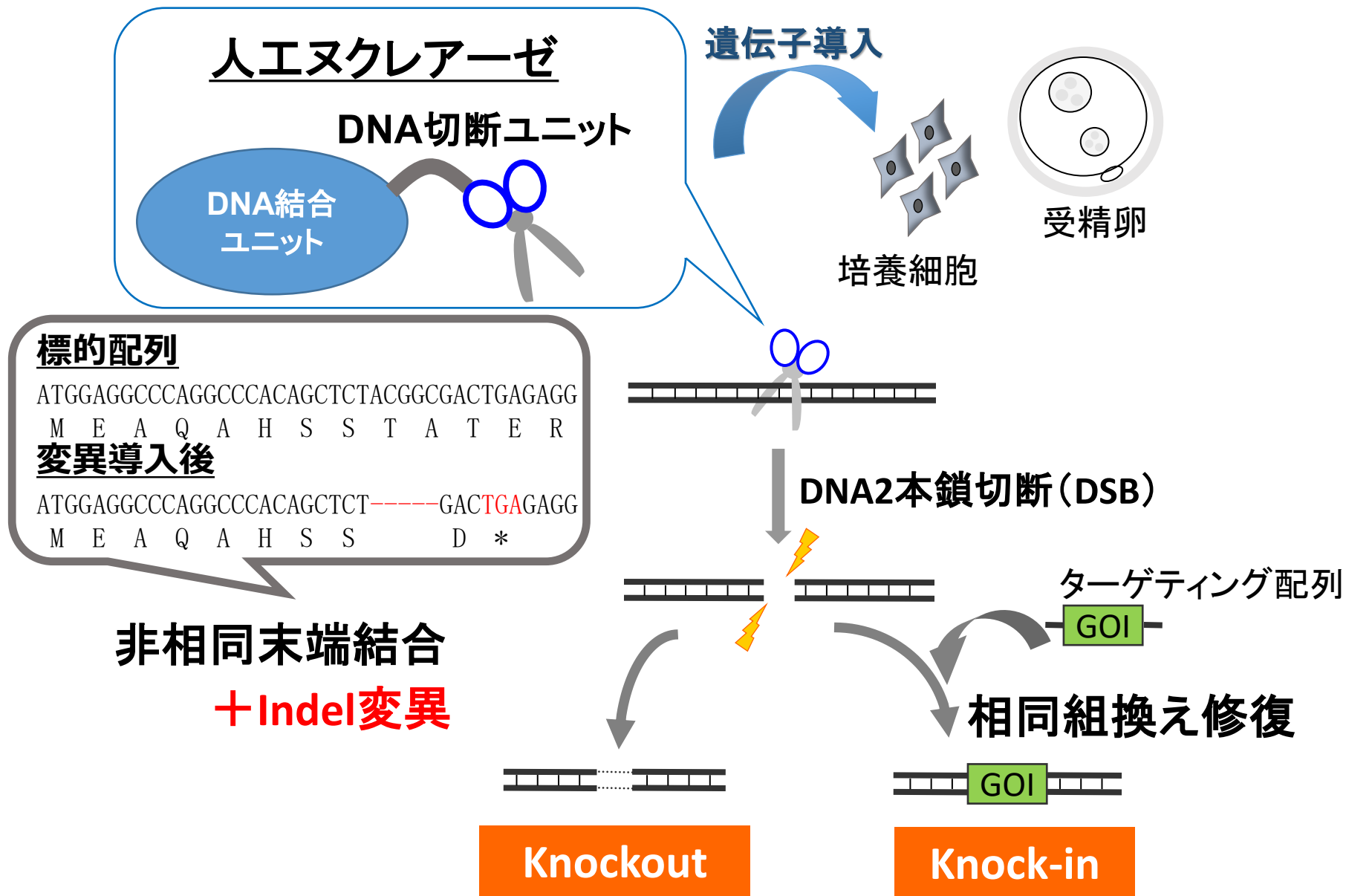
(Medugoracら, PLoS ONE, 2012)

有角品種の遺伝子操作による無角化(逆遺伝学)



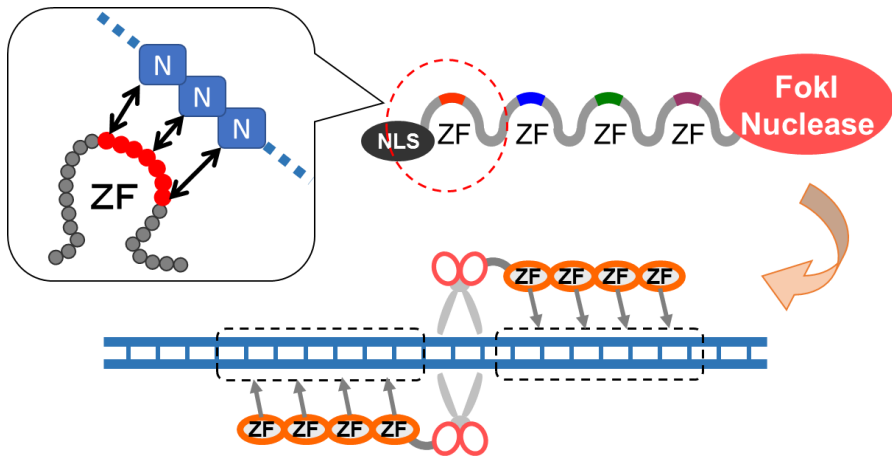
(Carlsonら, Nat Biotechnol, 2016)

ゲノム編集とは？

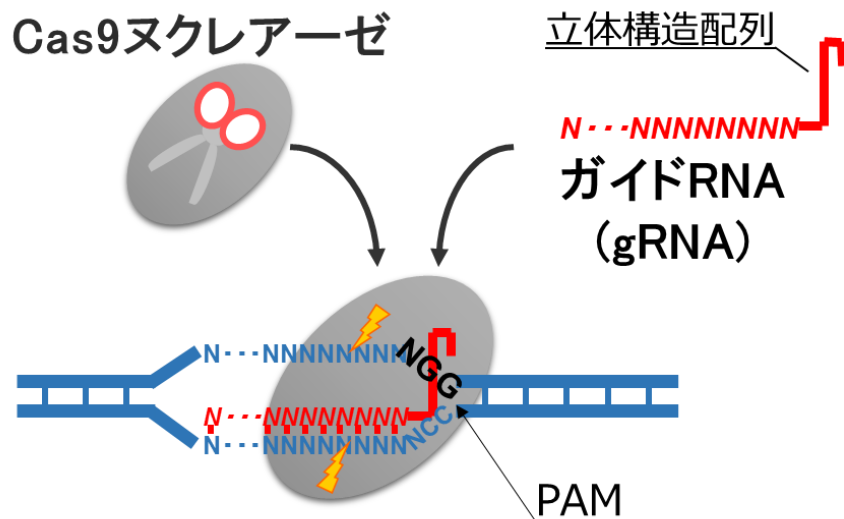


主要な人工ヌクレアーゼ

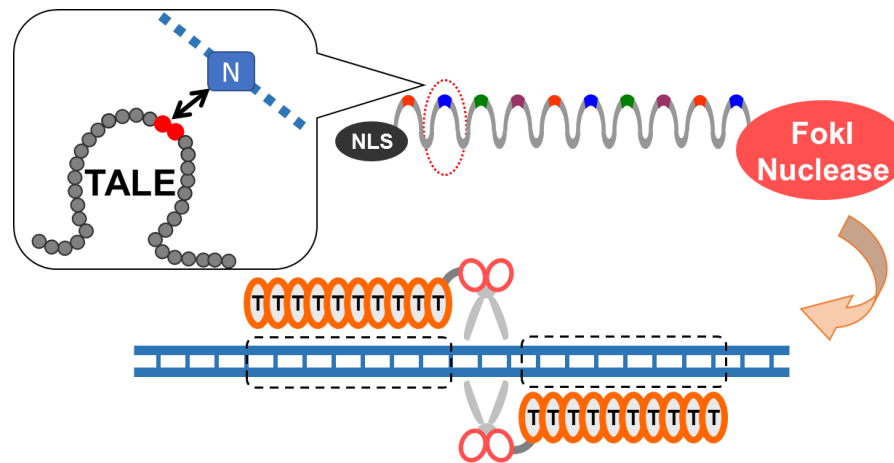
Zinc finger nuclease (ZFN)



CRISPR/Cas system



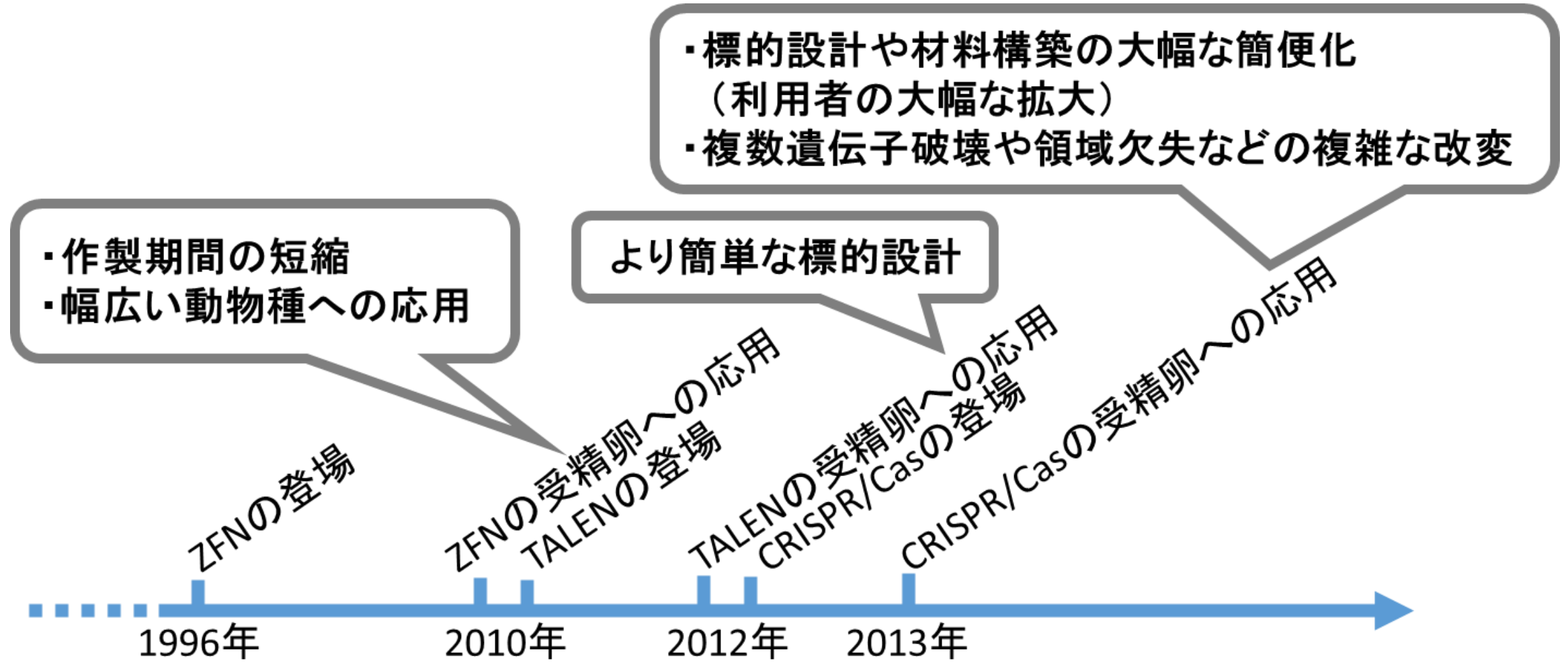
Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)



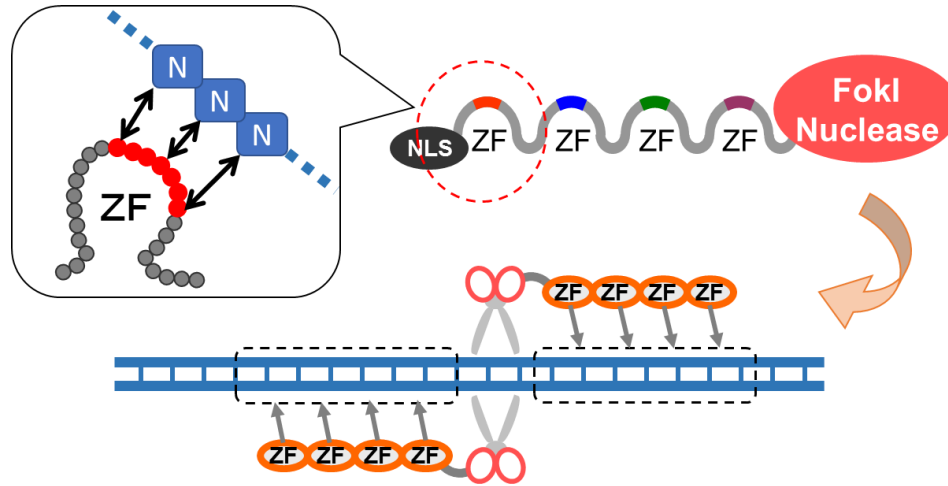
その他

- 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)

哺乳動物受精卵への応用の歴史



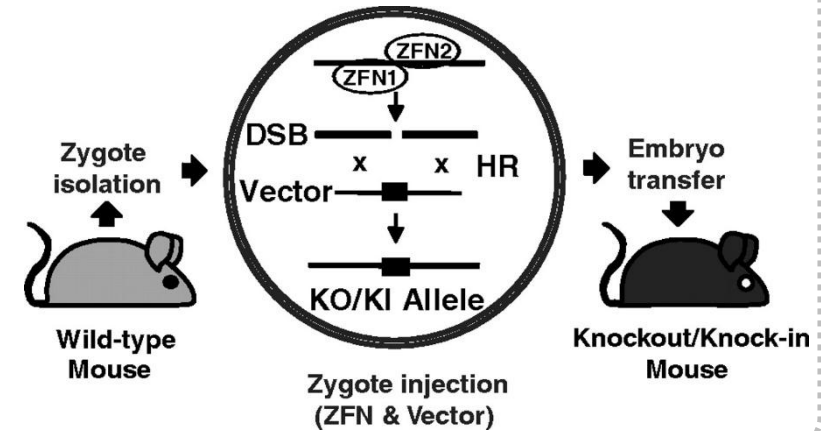
Zinc finger nuclease (ZFN)



| 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}



ZFN構築に要するコストと期間

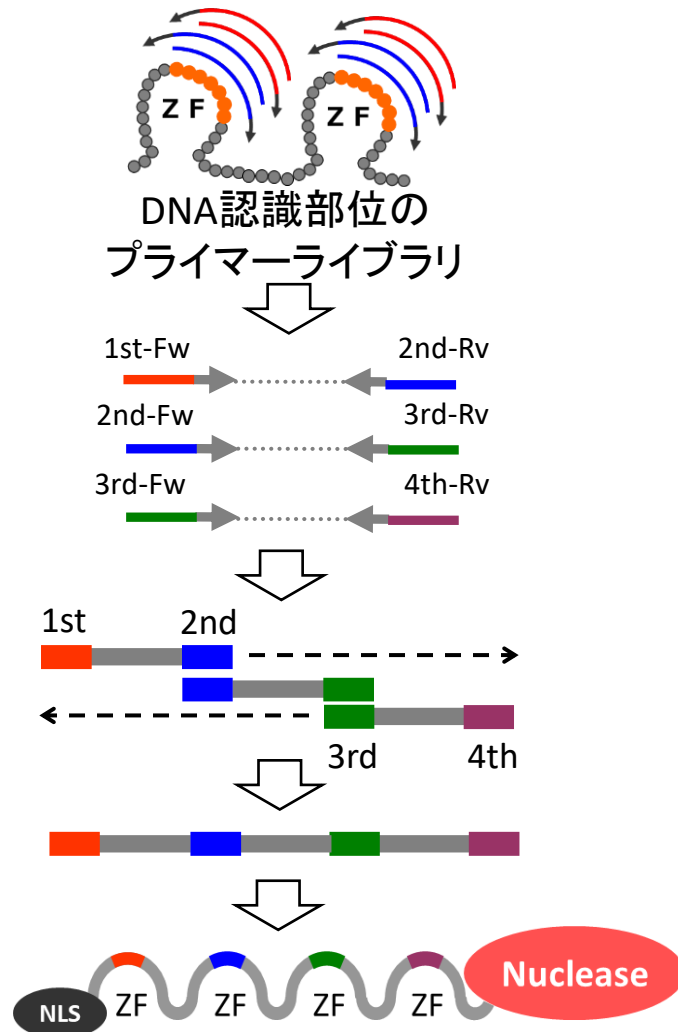
Table 1 Cost of designer nucleases

Source	Resource	Price	Time required
ZFNs			
Sigma (Sangamo)	Premade or custom ZFNs	\$25,000 custom; \$12,000 premade	2 months
Zinc Finger Consortium and Addgene	OPEN Protocols, reagents, including plasmids and bacterial strains	\$5,000 for hundreds of Zfns	6 months–1 year
Zinc Finger Consortium	CoDA	Not available as a kit; \$600–900 to assemble reagents for one Zfn	1 month
Addgene	Modular assembly	\$650 for hundreds of Zfns (not all work)	2 months

(DeFrancesco, Nat Biotechnol, 2011)

ZFNの新たな構築方法

ZFアレイの安価な構築法



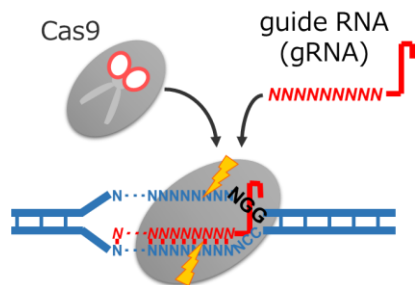
KO産子 (~1ヵ月)



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

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

CRISPR/Cas9



マウス受精卵への応用

- 低効率な変異導入 (1/7匹)
(Shen et al., Cell Res., 2013)
- 高効率 (~80%)、ダブルKOも可能
(Wang et al., Cell., 2013)

評価が不十分

- ・何が効率に影響？
- ・系統化は？
- ・リスク評価は？

gRNA scaffold配列の比較

Long-type



VS

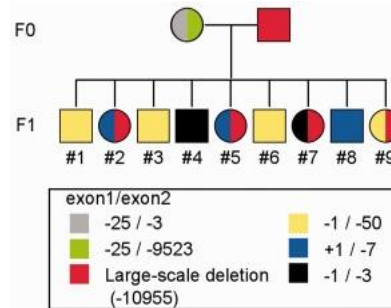
Short-type



高翻訳型Cas9配列



~100% KO



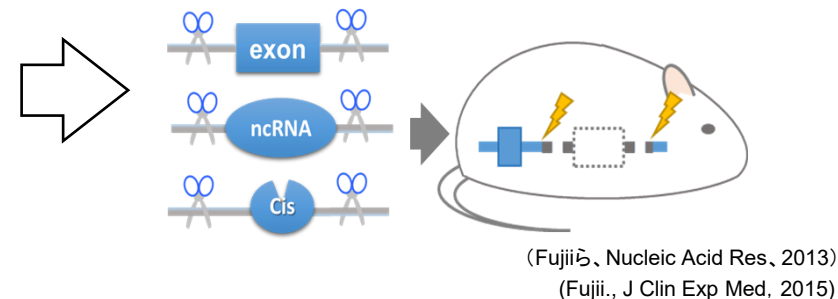
(Fujii, Nucleic Acid Res., 2013)

明らかにした点

世界に先駆けて受精卵を介したゲノム編集マウスシステムの作製に成功

- ・高効率KOの条件を確定
- ・変異の経世代(全身性変異)を確認

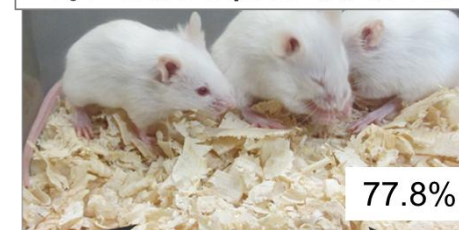
標的領域の欠失



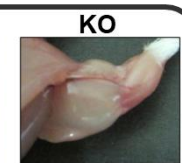
(Fujii, Nucleic Acid Res., 2013)
(Fujii, J Clin Exp Med, 2015)

複数遺伝子の同時KO

Tyr-Gdf8-Hprt トリプルKO

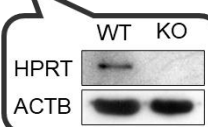


77.8%



WT

KO



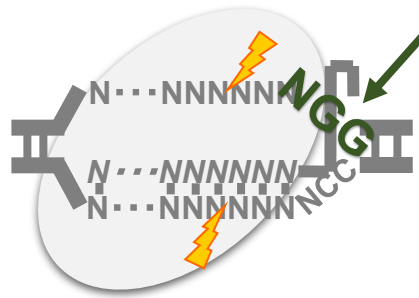
(Fujii, J Reprod Develop., 2014)

- ・任意領域の欠失、マルチKOが可能
- ・ゲノム編集マウスは従来法によるKOマウスと同等の表現型を示す

利用可能なPAMの拡張

課題:

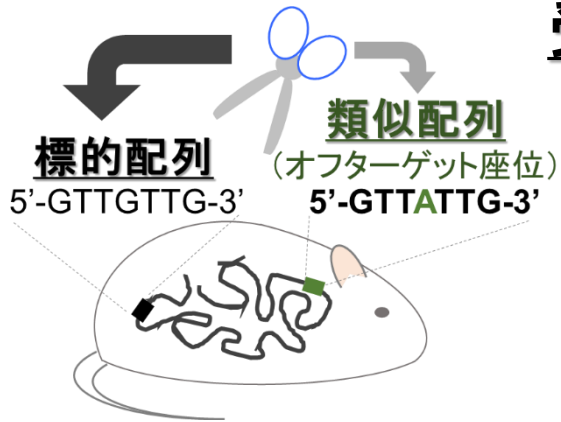
ゲノム編集ができる場所(座位)が限定される



受精卵における正確なゲノム編集

課題:

ゲノム編集の標的配列と類似する配列が存在すると同時に破壊してしまう(オフターゲット効果)



オーソログや変異体Casによるゲノム編集の高度化

利用可能なPAMの拡張

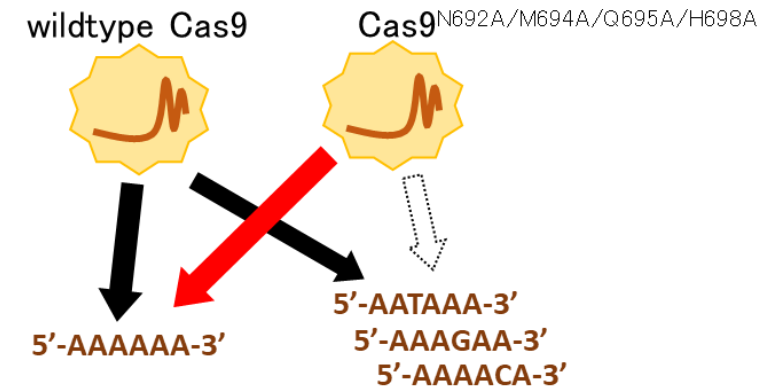
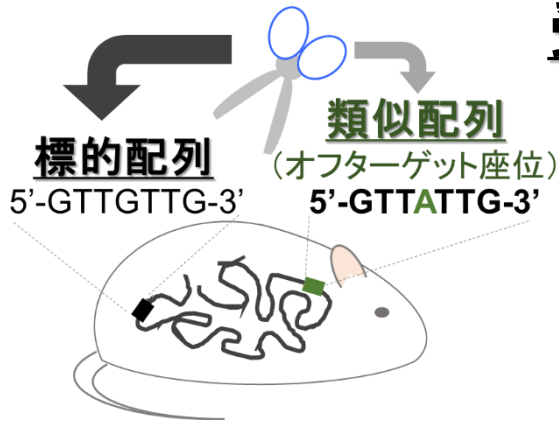
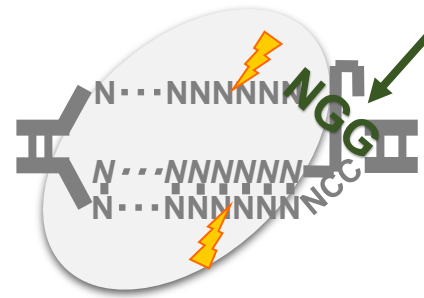
- *S. thermophilus*1-derived Cas9:
5'-NNRGAA (Fujii et al, BBRC, 2016)
- *C. jejuni*-derived Cas9:
5'-NNNVRAC
(Fujii et al, Int J Mol Sci, 2017)
R1335V/L1111R/D1135V/G1218R
/E1219F/A1322R/T1337R
- *S. pyogenes*-derived Cas9
5'-NG (Fujii et al, Sci Rep, 2019)

「標的座位の制限」の解決

受精卵における正確なゲノム編集

- offset-nicking by Cas9 nickase
(Fujii et al., BBRC, 2014)
- **Cas9^{N692A/M694A/Q695A/H698A}**
(Ikeda et al, Commun Biol, 2019)

「オフターゲット効果」の解決



これまでの研究 まとめ

- ゲノム編集技術を利用することで、遺伝子改変マウスの作製が簡便になった。
- ゲノム編集技術は標的デザインの制限やオフターゲット効果などの課題があり、オーソログや変異体CRISPRを利用することで解決できる。

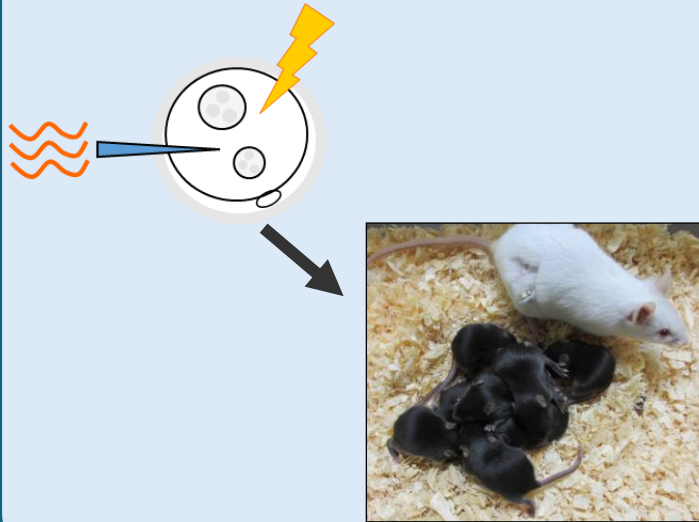
ゲノム編集動物作製のおおまかな流れ

事前準備

- 依頼受入時の留意点
- 系統、命名など
- 関連申請

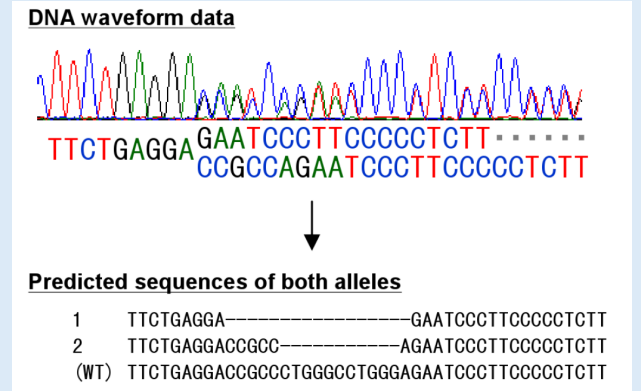
作製工程

- 標的配列設計
- 導入核酸／タンパク質形態の選択
- 送達方法



産子獲得後

- 遺伝子型判定
- オフターゲット評価



(1) 事前準備: 依頼時の留意点、標的配列設計、系統命名、関連申請など

依頼者への確認事項

どこまでを担当するのか:

生殖工学実験のみ? デザインも? すでに販売されている可能性も

作製方法の指定(後述):

インジェクション/iGONAD? どのタイプのCRISPR?

系統、デザイン:

B6N/J? どのBALB? 近交系以外の場合はどの世代で渡す?

責任の範囲:

命名は? 解析は? 論文化する場合に著者として入るのか?

必要な申請:

第二種申請(組換え申請)、動物実験申請を忘れずに。

MGIのリンクと遺伝子名を明記して
対象遺伝子を取り違えないようにする

作製方法

標的座位の情報（ゲノムデータも併記）
最近ではCRISPRのスコアも

利用する系統

KOのデザインのもととなった情報

どこまでやるかを明記

Jun. 19, 2016設計

XXノックアウトマウス

MGI:

<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:XXXXX>

MGI name:

XXXXXX

KO/KIの方法:

Fujii et al., Nucleic Acids Res., 2013に従って野生型CRISPR/Casで領域欠失

標的座位: exon2の全配列を欠失させる

1) chr1: 93750959 to 93750981 (GRCm38.p3)

2) chr1: 93749664 to 93749686 (GRCm38.p3)

遺伝的背景:

C57BL/6Jdcl

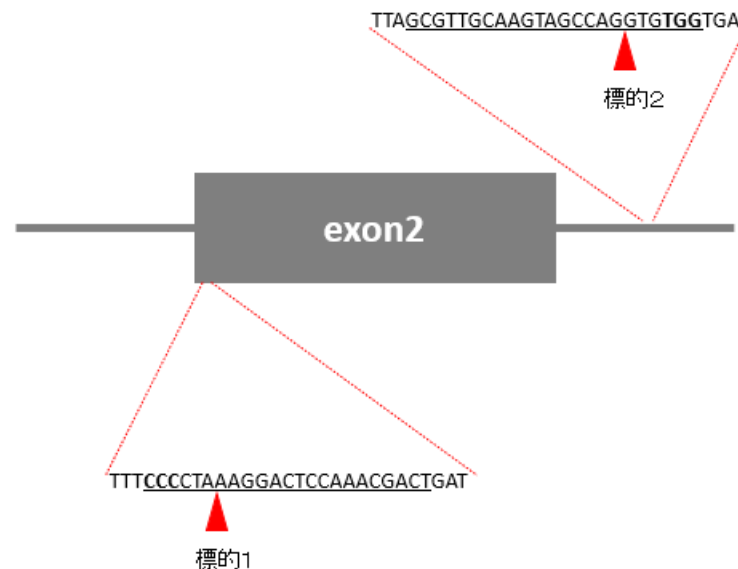
設計の参考論文or参考ライン:

先方の提案(2016.6.13 email)

備考:

・XX先生(メール: XX@XX)

F1胚を体外受精で作製し、ゲノムPCRで変異アレルの伝達を確認した後に凍結胚で引渡し



遺伝子組換え動物の命名のルール

- トランスジェニックマウス

C57BL/6J-*Tg*(*APOA1*)1*Rub*

トランスジェニックマウス
であることを示す

導入遺伝子名

番号

ラボコード

- ノックアウトマウス

C57BL/6J-*Cert*^{*tm*}1*Nems*

標的破壊遺伝子名

ノックアウトマウス
であることを示す

番号

ラボコード

標的遺伝子組換えは「tm」、ゲノム編集は「em」、遺伝子トラップは「Gt」など

(2) 作製工程: 標的配列設計、導入形態の選択、送達方法など

ウェブツールで行う。オフターゲット候補配列も含めて記録しておく。

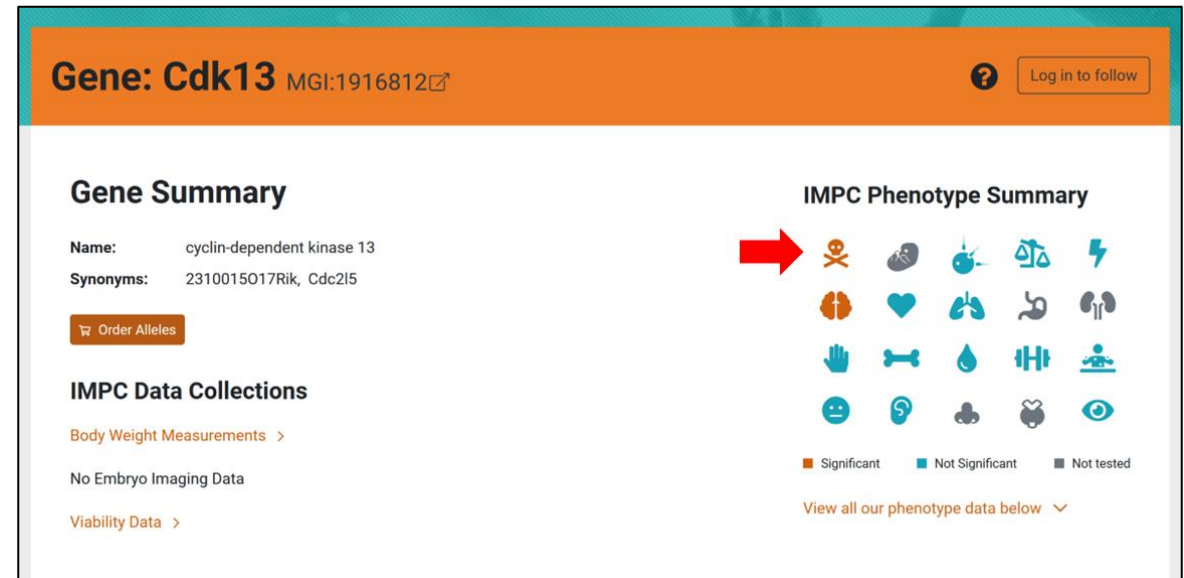
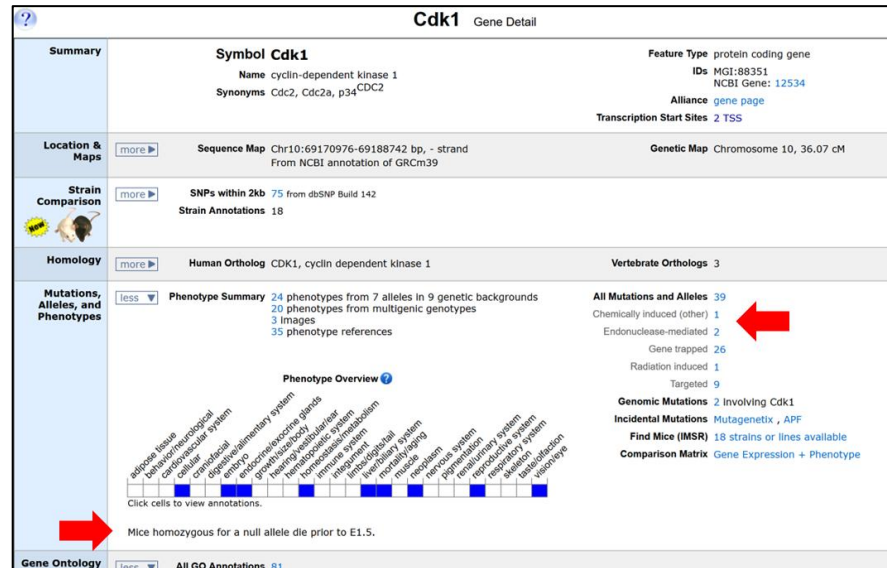
基本的な流れ(ノックアウトマウスを作製する場合)

1. 標的遺伝子のノックアウトによる致死などの表現型を確認する。
2. 標的遺伝子のゲノム配列、転写産物、タンパク質配列を取得する。
3. 過去の論文や標的遺伝子の重要ドメインに従って破壊する部分を決める。
4. gRNAを設計する。

(2) 作製工程: 標的配列設計、導入形態の選択、送達方法など

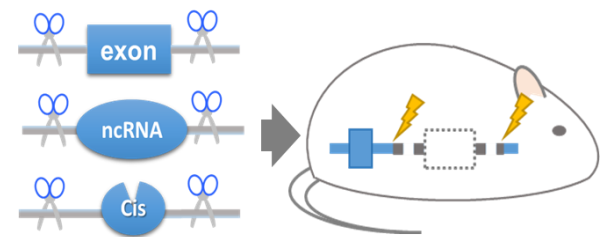
1. 標的遺伝子の表現型

MGI (<http://www.informatics.jax.org/>) と IMPC (<https://www.mousephenotype.org/>) で検索し、ノックアウトによる既知の表現型を確認する。もしKOで致死となる場合は産子を得られない可能性があり、不妊の場合は作製個体の系統化ができない可能性がある。



致死/不妊にならない場合は重要機能を持つドメインを標的とする。
致死/不妊になる場合は距離の離れた異なる2つのintronを標的としてヘテロ欠失となるように設計する。

標的領域の欠失

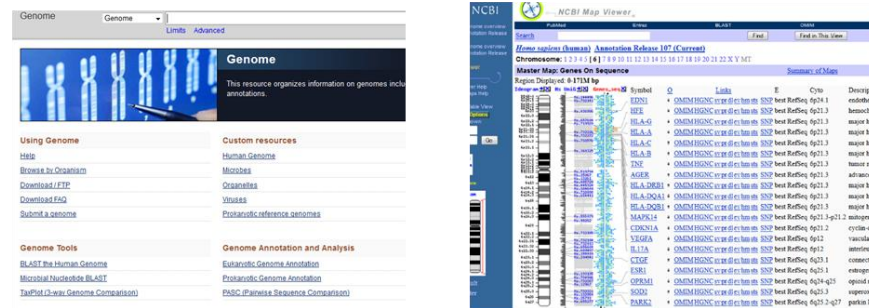


(2) 作製工程: 標的配列設計、導入形態の選択、送達方法など

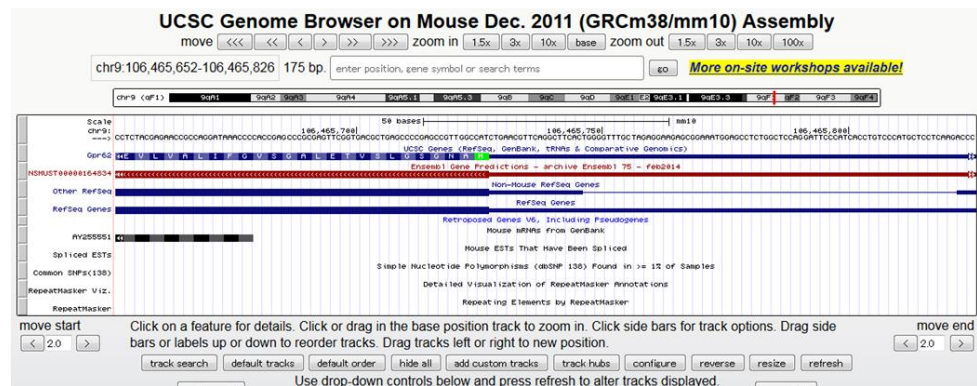
2. 標的遺伝子の配列情報を取得する

様々な生物のDNA情報データベース

- NCBI (National Center for Biotechnology Information)



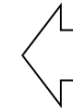
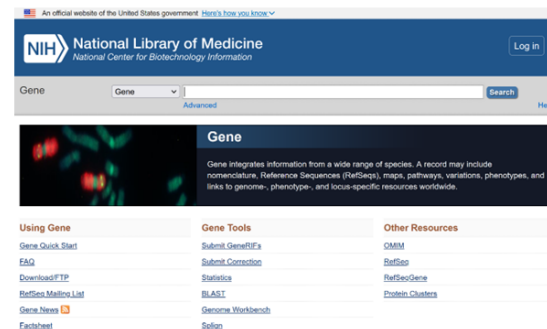
- UCSC Genome Browser



- DDBJ、EMBLなど

遺伝子情報データベース

NCBI Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

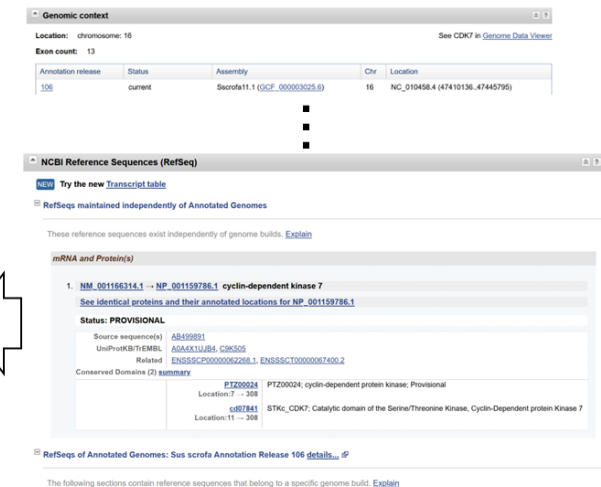


Sus scrofa cyclin dependent kinase 7 (CDK7), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_001166314.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

>NM_001166314.1 Sus scrofa cyclin dependent kinase 7 (CDK7), mRNA
ATGGCTGTGGACGTGAAGTCGGGAGCAAAAGCTTATGAAAAGCTGGACTTCTCGGGGAGGGACAGTTTG
CCACGGTTTACAAGGCCAGAGACAAGAACCAACCAAAATGTGCCATTAAAGAAATCAAATTTGGACA
TAGATCAGAAGCTAAAGATGGTATAAACAAGAACGCTTAAAGAGAGATAAAATTTGTACAGGAGCTAAGT
CATCCAAATATAATTGGCTCTCTTGTATGCTTTTGGACATAAATCTAATATTAGCCTTGTCTTTGATTTTA
TGGAACTGACCTAGAGGTTATAATAAAGGATAACAGCTCTTGTGCTAACACCATCACACATCAAGGCTA
CATGTTGTATGACTCTCAAGGATTAGAATATTGCACCAACATTGGATTCTACATAGGAGATCAAAACA
AACAACTTGTGCTAGATGAAATGGAGTTCTAAACTGGCAGATTGTGGCTGGCAAAATCATTTGGGA
GCCCTAATAGAGCTTATACACATCAGGTTGTAACAGATGGTATCGGGCTCTGAGCTACTATTGGAGC
TAGAATGTACGGTGTAGGTTGGACATGTGGCTGTTGGCTGTATATTGGCAGAGTTGCTCTAAGGGTT
CCATTTTTCGGGGAGATCAGACCTTGATCAACTAACAGAAATATTGAAACTTTGGGCACACCAACTG
AAGAACAGTGGCTGACATGTGATCTCCAGATTTCGTGACGTTTAAAGAGTTCCCTGGAATCCCGCT
ACAACATATCTTATTGCACGAGGAGATGACTTGTAGATCTCATACAAGGCTATTCTTTATTAATCCA
TGACTCTGAATTACAGCAACAGGACTTGAACAACTAAGTATTTCAGCAATCGGGCAGGGCCAAACCTG
GATGTGACGTGCAAGCAACAGCTGTCAGTGAAGCTTTAAAGGAACAGTCCAATCTGTGTCGGCAAC
AAACCGGAAGAGACAGAGGCTTGGAAACAAGAGGATTACCAAGAAGCTAATTTTTATG



(2) 作製工程: 標的配列設計、導入形態の選択、送達方法など

2. 標的遺伝子の配列情報を取得する

Ensembl (<https://asia.ensembl.org/index.html>)

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface. The top section displays the search bar with 'Mouse (GRCm39)' selected. The middle section shows the 'Mouse (GRCm39)' page with a search bar and a 'Go' button. The bottom section shows the 'Mouse (GRCm39)' page with a search bar and a 'Go' button. A red arrow points to the 'Go' button in the bottom section.

マウスの遺伝子情報データベース
MGI (<https://www.informatics.jax.org/>)

The screenshot shows the MGI Mouse Genome database interface. The top section displays the search bar with 'Sox17' entered. The middle section shows the 'Sox17' gene detail page with various tabs and a 'Phenotype Overview' section. The bottom section shows the 'References' section with a list of publications.

様々な動物種のゲノム配列や各遺伝子の配列、構造、翻訳産物の配列などが取得できる
(ただし度々サイトが重くて繋がらない。ミラーリンクを使う。)

遺伝子名 (Gene Symbol), 各種サイトへのリンク、ヒトオースログ情報、
変異体のリストや表現型情報、過去の報告など、

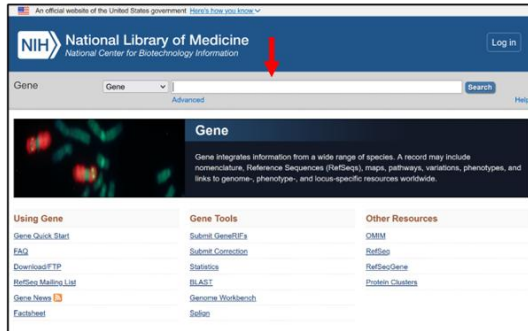
(2) 作製工程: 標的配列設計、導入形態の選択、送達方法など

配列の取得方法① NCBI Geneによる方法

例) マウスSox17のmRNA配列を取得する

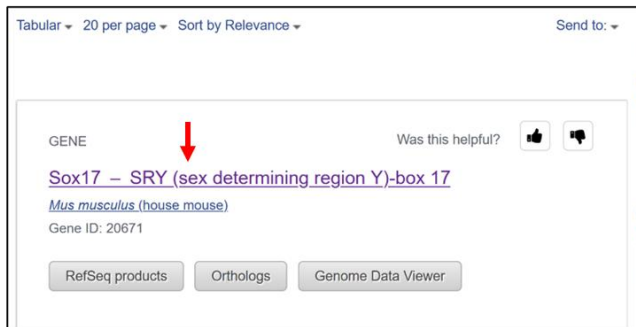
① NCBI Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) を開く。

② “Mus musculus Sox17” と入力する

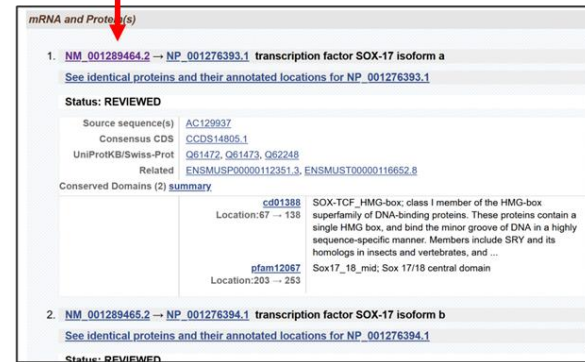


学名で検索すると見つかりやすい
マウス: *Mus Musculus*
ヒト: *Homo sapiens*
ブタ: *Sus scrofa*
イヌ: *Canis lupus* など

③ “Sox17 – SRY (sex determining region Y)-box 17” をクリック



④ スクロールして”mRNA and Protein(s)”まで進め、“NM_001289464.2”をクリック



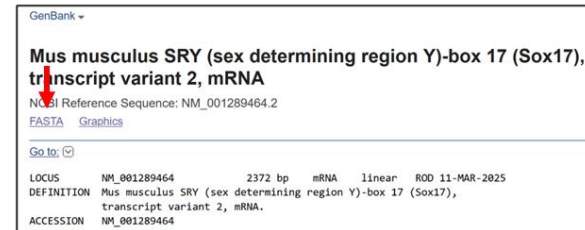
アクセッション番号 (Accession number)

FASTA形式

核酸配列やアミノ酸配列を表すためのテキストの形式。
1行名に「>」で始まるように配列のタイトルを示し、2行目から核酸またはアミノ酸配列を示す。

例) >GeneA
acgatcgtatgctacgtacgtacg

⑤ “FASTA” をクリックするとFASTA形式の配列が取得できる



Mus musculus SRY (sex determining region Y)-box 17 transcript variant 2, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_001289464.2

[GenBank](#) [Graphics](#)

>NM_001289464.2 Mus musculus SRY (sex determining region Y)-box 17 (Sox17), variant 2, mRNA
GATAACGTCGTGAGCTCGGCTTCCAACACCCATTTAGTGAAGAACTGAAATATGGCCACTCACACTGC
TGGCGGGTCTGAAGTGGCGTTGGCCCAACACTCTCCCAAGATATCTATCAAGAGAAATGGTCAGCAGAA
GTTAGATCTAGTGAGCAGCACCTCCAGACATCTGAATTTGAGCTTCTTATTTCCCAAGAGGCTTTGGC
GCCAGCGCCGGCTCCAGCAGTTTTCCTCAAGGCTAGCTCCGATCTCCCTGCTCAGGGTCGGGGGAAGC
GGCGTGTCCGTGGCCATAGCAGAGCTCGGGTCTGGTCTGGAGAGCATGAGCAGCCGGATGCGGGATA
CGCCAGTGACGACGAGCAGCCGCGGAGCGCCGAGCCGCGGTGATGCGAGGGTTGGGCCCTTGTCCC
TGGGCCGAGTCTCTGAGCCCCCTCGGGGATGTAAGGTGAAAGGCGAGGTGGTGGCAGTACGCGGGGCGC
CAGCCGGAGCTCGGGCGAGCAGCAAGCGGAGTCTCGCATCCGGCGGCGATGAACGCTTTATGGTGTG
GGCCAAAGACGAACGCAAGCGGTTGGCAGCAGAGAACCCAGATCTGCAACGACGAGCAAGCAAGATG
CTAGGCAAGTCTTGAAGGCGTTGACCTTGGCAGAGAGAGCGGCTTCTGTTGAAGAGCGGCGGCTGC
GCGTGCAGCATATGACGAGCACCCCACTACAGTACCGGCCGCGGCGCGCAAGCAGGTGAAGCGCAT

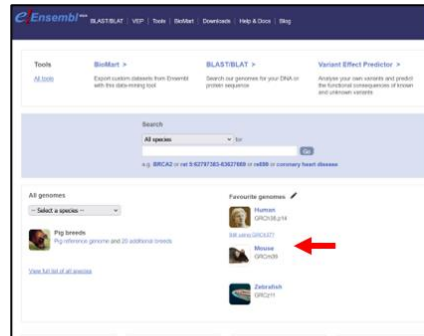
(2) 作製工程: 標的配列設計、導入形態の選択、送達方法など

配列の取得方法②Ensemblによる方法

例) マウスSox17のDNA配列を取得する

① Ensembl (<https://asia.ensembl.org/index.html>) を開く。

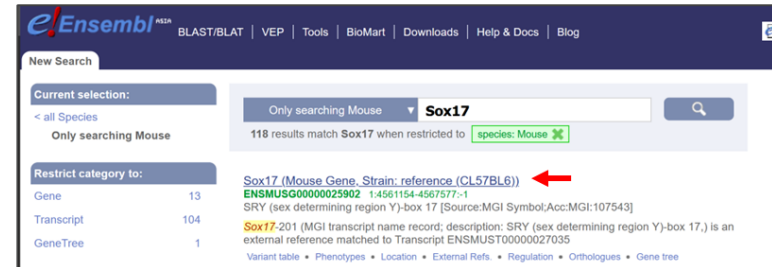
② “Mouse” をクリックする



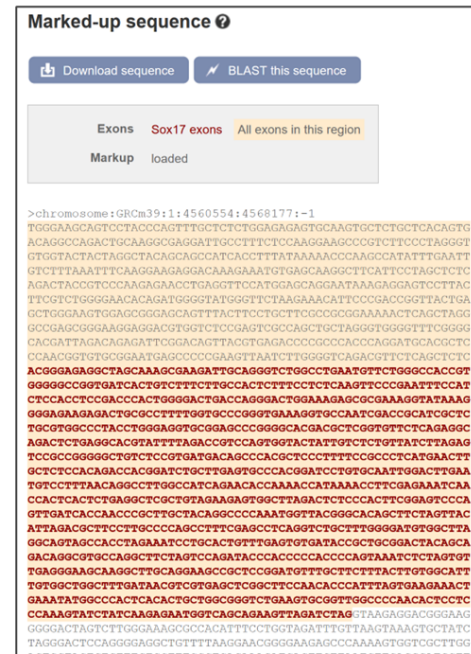
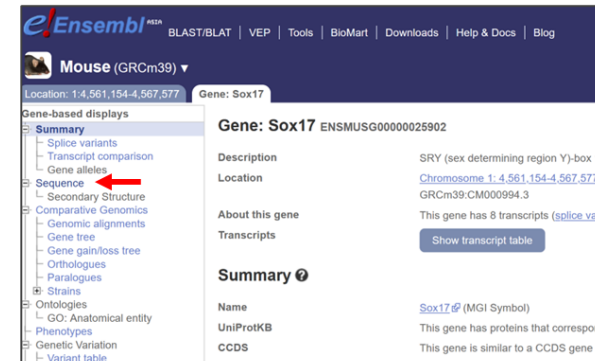
③ “Sox17” と入力してGoをクリック



④ [Sox17 \(Mouse Gene, Strain: reference \(CL57BL6\)\)](#) を開く。



⑤ “Sequence” をクリックする

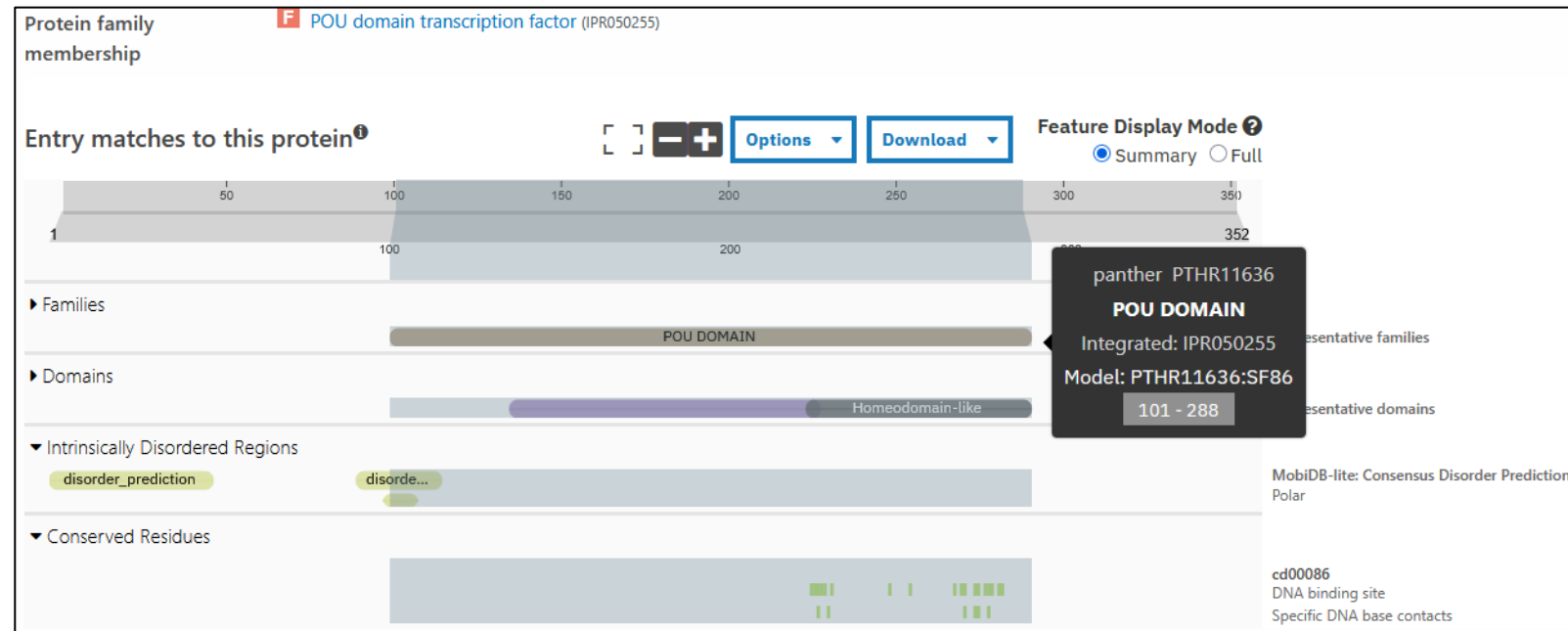
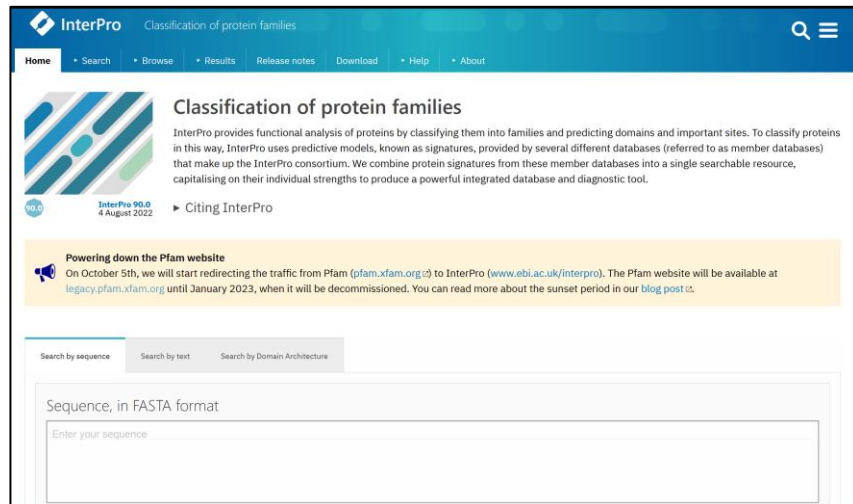


Exon情報がマークアップされたゲノムDNA配列が取得できる
(ただしどのスプライシングバリエントのものか確認する必要がある)

(2) 作製工程: 標的配列設計、導入形態の選択、送達方法など

3. 破壊する座位を決める

- KOがすでに報告されている場合は、同じ座位やexonを標的とする。
- 報告がない場合や報告が怪しい場合は、遺伝子の構造やドメイン情報を頼りに設計する。
- アミノ酸配列からドメインを調べる際は、Interpro(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)が便利。



(2) 作製工程: 標的配列設計、導入形態の選択、送達方法など

4. gRNAをデザインする

CRISPOR(<http://crispor.tefor.net/>)が便利

- 入力する配列はゲノムDNA配列。間違えてRNA配列を入れないようにする。
- 長すぎる配列を入れないようにする。
- Step2で目的の動物種を選択する。
- Step3は 20bp-NGG - Sp Cas9, SpCas9-HF1, eSpCas9 1.1 | を選ぶ



CRISPOR (citation) is a program that helps design, evaluate and clone guide sequences for the CRISPR/Cas9 system. [CRISPOR Manual](#)
August 2022: Small bugfix, PAMs were sometimes offset in the sequence plot [full list of changes](#)

Step 1

Planning a lentiviral gene knockout screen? Use [CRISPOR Batch](#)

Sequence name (optional):

Enter a single genomic sequence, < 2300 bp, typically an exon

[Clear Box](#) - [Reset to default](#)

Paste here the genomic - not a cDNA - sequence of the exon you want to target. The sequence has to include the PAM site for your enzyme of interest, e.g. NGG. Maximum size 2300 bp. If you only have a cDNA please BLAST or BLAT the cDNA first to find the right exon sequence for CRISPOR.

Text case is preserved, e.g. you can mark ATGs with lowercase.
Instead of a sequence, you can paste a chromosome range, e.g. chr1:11,130,540-11,130,751

Version 5.01 - [Documentation](#) - [Contact us](#) - [Downloads/local installation](#) - [Citation](#) - [License](#)

Step 2

Select a genome

We have 823 genomes, but not yours? Search [NCBI assembly](#) and send a GCF/_GCA_ ID to [CRISPOR support](#).

Step 3

Select a Protospacer Adjacent Motif (PAM)

See [notes on enzymes](#) in the manual.

[SUBMIT](#)

Position Sequence 0 AGGGAGAGAACACACGTGGCACAGCACTCTCTCTCTCTGACAGGCTGAGGGTGCATGTGGGCACACGTTGTGCCCCAGCTATGAAA
10 CCA---
20 ---AGG ---AGG ---TGG
30 CCT--- CCT--- ---GGG
40 ---GGG
50 ---GGG
60 ---GGG
70
80
90

Download for: [SerialCloner](#) (free) - [ApE](#) (free) - [GenomeCompiler](#) - [Benchling](#) - [SnapGene](#) - [Geneious](#) - [Vector NTI](#) - [LaserGene](#) - [Genbank](#) - [FASTA](#)

Predicted guide sequences for PAMs

Ranked by default from highest to lowest specificity score ([Hsu et al., Nat Biot 2013](#)). Click on a column title to rank by a score.

If you use this website, please cite our [paper in NAR 2018](#). Too much information? Look at the [CRISPOR manual](#).

Download as Excel tables: [Guides](#) / [Guides, all scores](#) / [Off-targets](#) / [Saturating mutagenesis assistant](#)

Position/ Strand	Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes ☐ Only G- ☐ Only GG- ☐ Only A-	MIT Specificity Score	CFD Spec. score	Predicted Efficiency Doench 16 Mor-Mateos	Outcome Out-of-Frame Lindel	Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM	Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score ☐ exons only No match, no chrom filter
64 / fw	AGGGCACTGAGGGTGCATGT GGG Enzymes: Bsp1286I, BaeGI, NlaIII, XceI Cloning / PCR primers	68	82	--	--	0 - 0 - 6 - 31 - 184 0 - 0 - 2 - 0 - 4 221 off-targets	4:intron:Slc22a29 3:intron:Dag1 4:intergenic:Mtpap-Jcad show all...
63 / fw	CAGGGCACTGAGGGTGCATG TGG Enzymes: Bsp1286I, BaeGI, NlaIII, XceI, HpyCHAV Cloning / PCR primers	65	77	--	--	0 - 0 - 2 - 30 - 247 0 - 0 - 0 - 2 - 1 279 off-targets	2:intergenic:1700019P21Rik-Dennd1b 4:intergenic:1600027J07Rik-4933400L20Rik 3:intron:Ryr2 show all...
32 / rev	CTCAGTGCCTGCAGGAGAG AGG Enzymes: BseRI	59	69	--	--	0 - 0 - 3 - 38 -	4:intron:Arhgef37 3:intergenic:Ankrd33b-Rpn11

(2) 作製工程: 標的配列設計、導入形態の選択、送達方法など

DNAは前核注入のみ、プラスミドワークを避けたいならRNAかタンパク質、変異体CAS9タンパクも販売されている

crRNAのほうが安価だがアニーリングの事前準備が必要

CAS9:

- DNA
- RNA
- タンパク質

guide RNA:

- DNA
- RNA (sgRNA vs crRNA-tracrRNA)

PAMや切断部位が異なるCAS9用のgRNAは利用できないことに注意

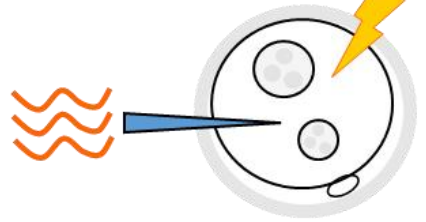
CAS9以外のCRISPR

自分でプラスミド合成する場合はpx330やpx459が便利。Addgeneから導入できる。

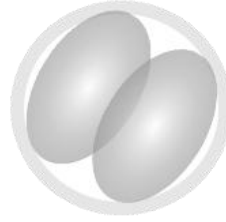
(2) 作製工程：標的配列設計、導入形態の選択、送達方法など

体外で受精卵へ導入する方法

①ゲノム編集遺伝子を受精卵に導入する

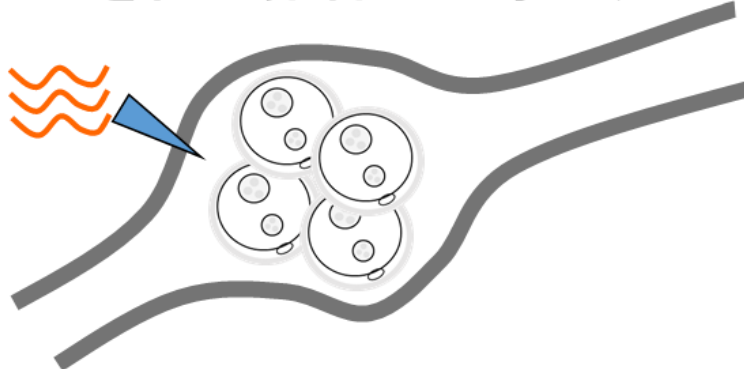


②母体に胚を移植する

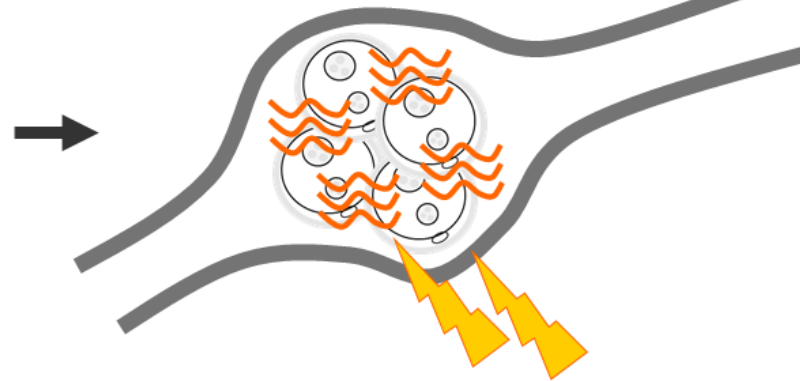


体内で導入する方法(iGONAD法)

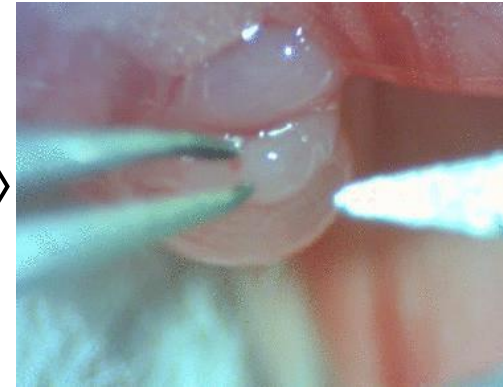
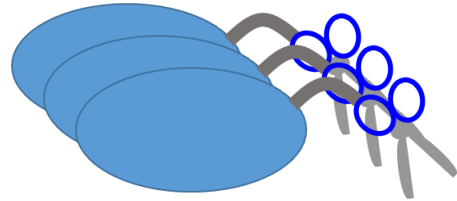
①ゲノム編集遺伝子を受精卵を含む卵管内に導入する



②エレクトロポレーターによって遺伝子導入する



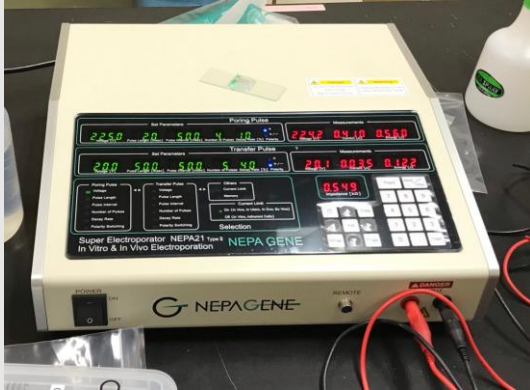
体外で受精卵に導入する方法



①人工ヌクレアーゼ準備

②受精卵への注入

③胚移植



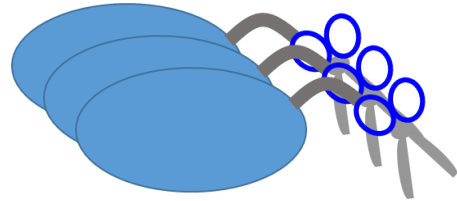
エレクトロポレーション



非外科的移植(経膈移植)

<https://biomachinery.co.jp/page-2667/>

体内で導入する方法(iGONAD法)

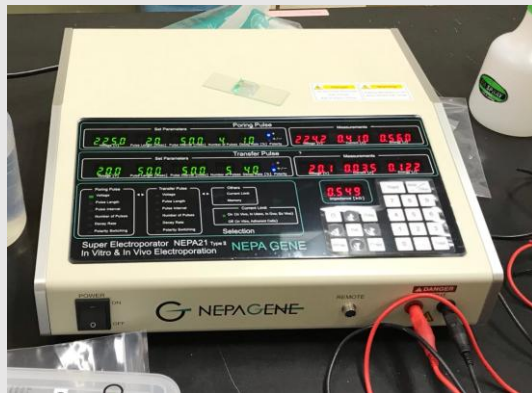


①人工ヌクレアーゼ準備



②受精卵への注入:

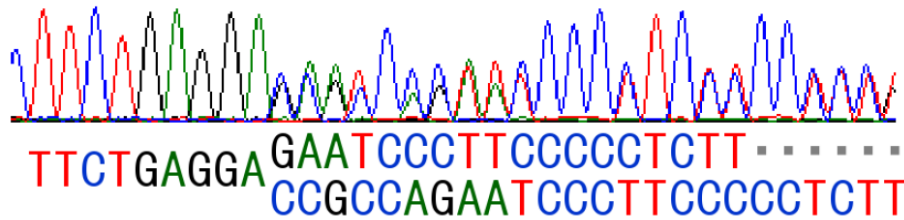
卵管への溶液の導入とエレクトロポレーション



(3) 産子獲得後：遺伝子型判定、オフターゲット評価、系統化・解析など

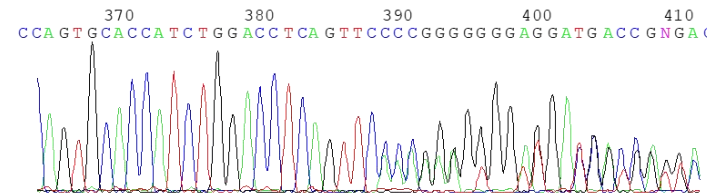
- Indelは数塩基の場合もあるので、PCR産物の泳動像だけでは判定できないことがある。
 - PCR-RFLPやT7EIアッセイなどで大まかに判定。
 - PCR産物のシーケンシングで決定。両アレルが同時に読まれるため、重なった波形を分離して予測。

DNA waveform data

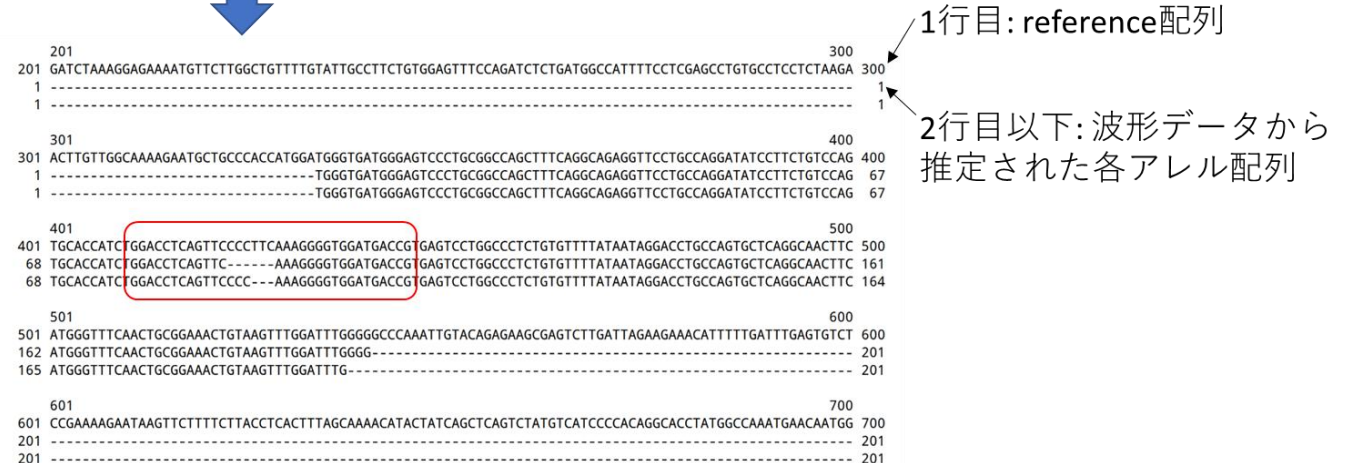


Predicted sequences of both alleles

1 TTCTGAGGA-----GAATCCCTTCCCCCTCTT
2 TTCTGAGGACCGCC-----AGAATCCCTTCCCCCTCTT
(WT) TTCTGAGGACCGCCCTGGGCCTGGGAGAATCCCTTCCCCCTCTT



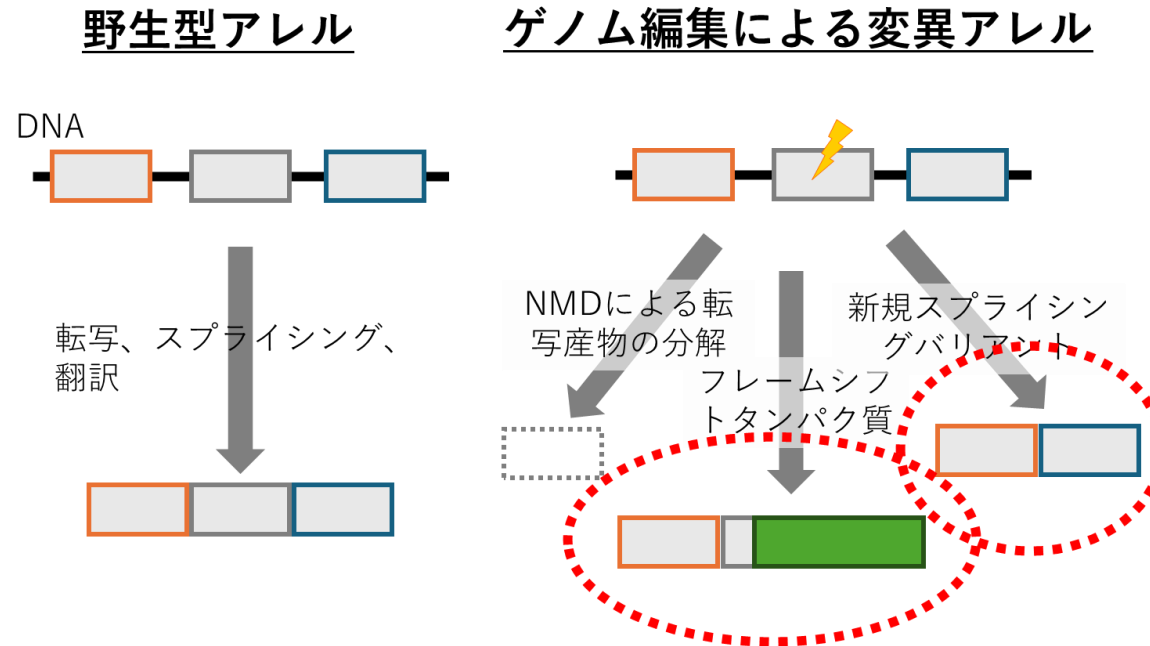
CRISPR-IDで解析



- PCR産物のサブクローニングが理想的だが、CRISPR-ID、Decorder.orgなどの重なった波形を分離予測するウェブツールも便利。
- オフターゲット座位も同様に評価する。最も類似のものから3-4座位程度。

(3) 産子獲得後：遺伝子型判定、オフターゲット評価、系統化・解析など

- 標的遺伝子が破壊されていることを確認する。WBやICC、難しければRT-PCRなど。
- 変異導入≠標的遺伝子破壊。標的座位への変異導入は予想しない遺伝子配列の発現を誘導することがある。



その他にも、、、

- 下流メチオニン(ATG)からのtruncatedな翻訳
- 自己分解ドメインの破壊による「過剰発現」
- KOアレルから翻訳によるドミナントネガティブタンパク質

などにも注意する必要がある。

その他

- マニピュレーター操作や胚移植にはトレーニングが必要。
難しい場合ははじめは CAS9タンパク質 + 化学合成gRNA + iGONADが一番簡単？
- 初めて実験する場合は、*Tyrosinase*などの発生に影響せずわかりやすい表現型を示す遺伝子を標的としたほうが良い。
導入評価にはeGFP mRNA (TriLinkなど)が便利。
- ノックインのHDRテンプレートには一本鎖DNA(ssDNA)がおすすめ。エレポでも利用できる。AAVによる送達も安定して利用できる。ただし、塩基長に制限がある。
- HDRテンプレートにはプラスミドDNAも有効だが、前核注入が必要。実験者によるばらつきがあるが、高効率な条件も。



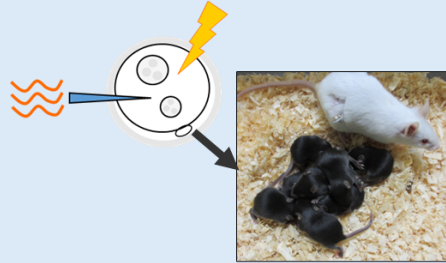
まとめ

事前準備

- 依頼受入時の留意点
- 系統、命名など
- 関連申請

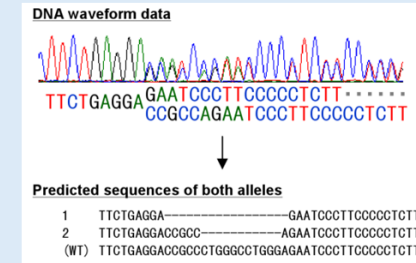
作製工程

- 標的配列設計
- 導入核酸／タンパク質形態の選択
- 送達方法



産子獲得後

- 遺伝子型判定
- オフターゲット評価



- 各工程で、後々の作業に影響しうるリスクをなるべく排除して進めることを意識する。
- 上手くいく方法が必ずしも各研究室で同じではない。適切な方法やメンターを見つける。