

※著作権法に抵触する可能性のある
図は削除しています

※転載禁止

May. 18, 2016

実験動物学会LASセミナー@川崎

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

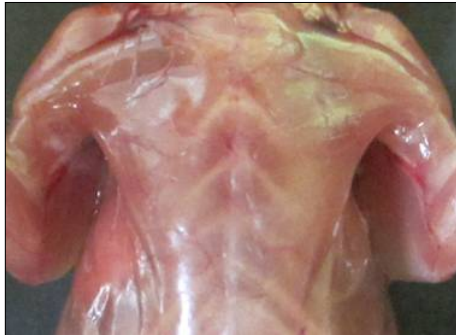
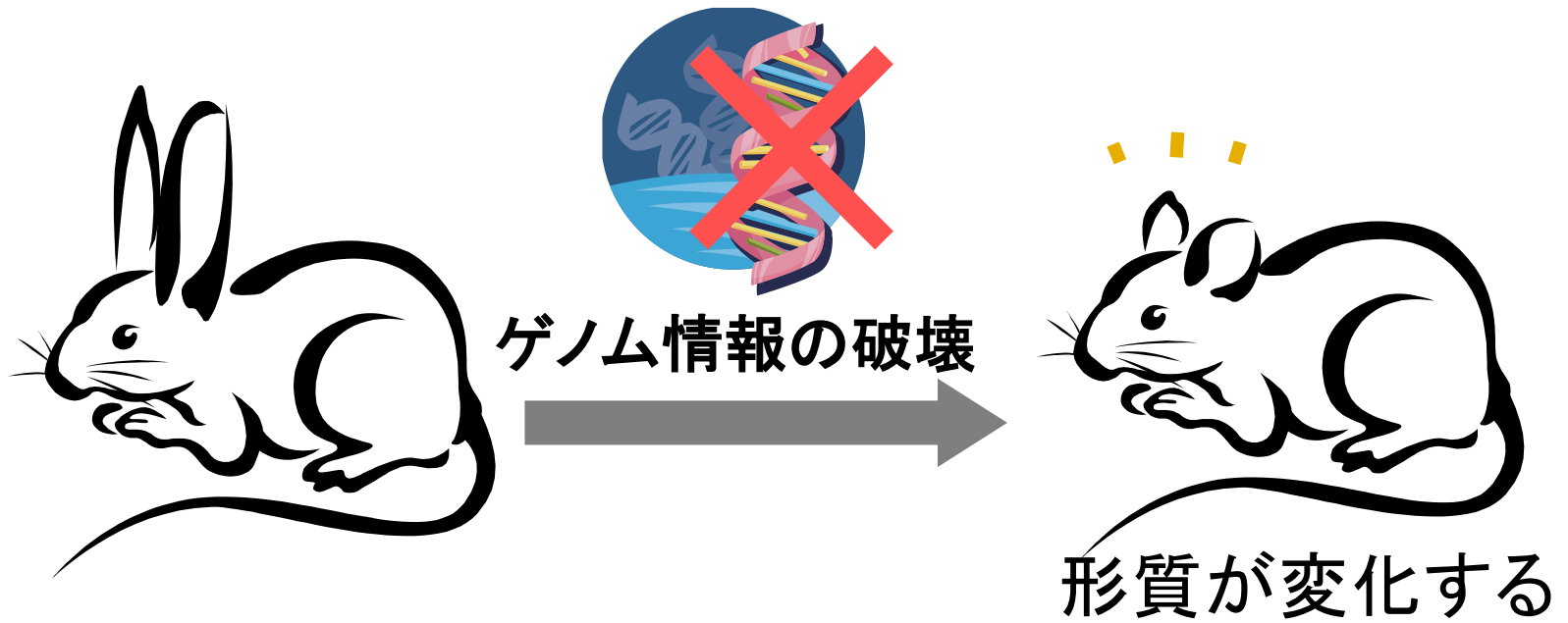
ゲノム編集技術の背景知識

- 何ができるか (KO, KI, etc)
- 動物種
- 作製方法の基礎、気をつけるポイント

今後の課題

背景：ゲノム改変動物とは？

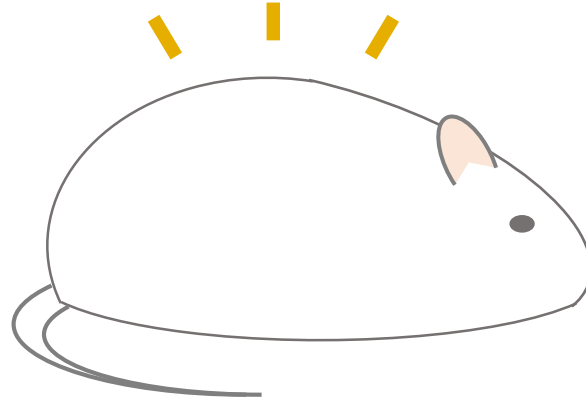
- 内在のゲノムDNA配列の狙った座位に対して欠失または外来配列の挿入を施した動物をゲノム改変動物とする。
- ゲノム改変動物は標的ゲノム配列情報の機能と個体レベルでの生命現象との関係の評価に有効である。



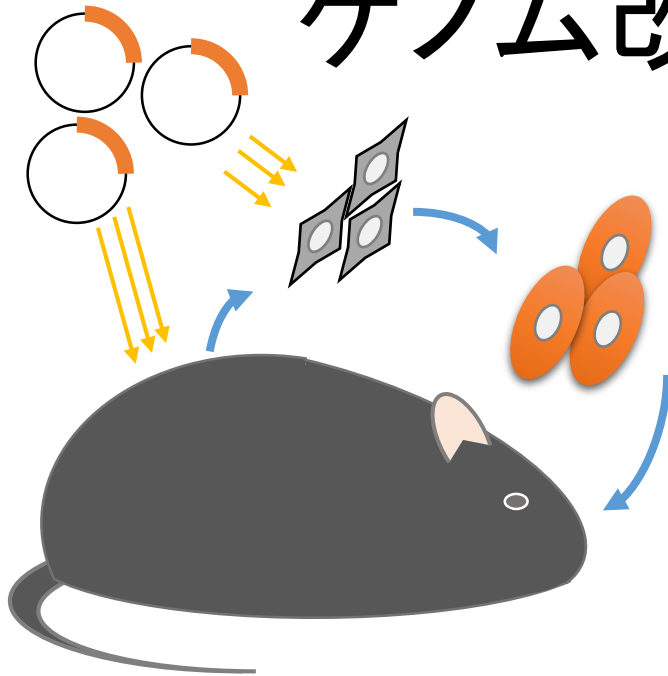
Myostatin-KO



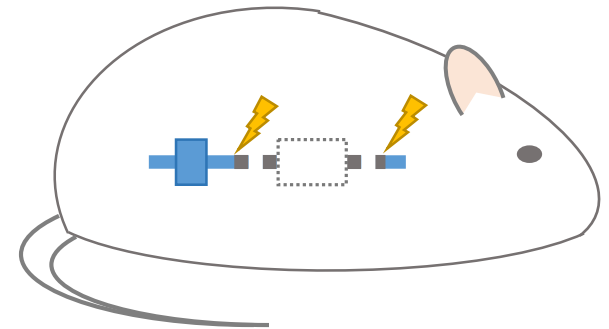
ゲノム機能の解析



ゲノム改変技術の活躍

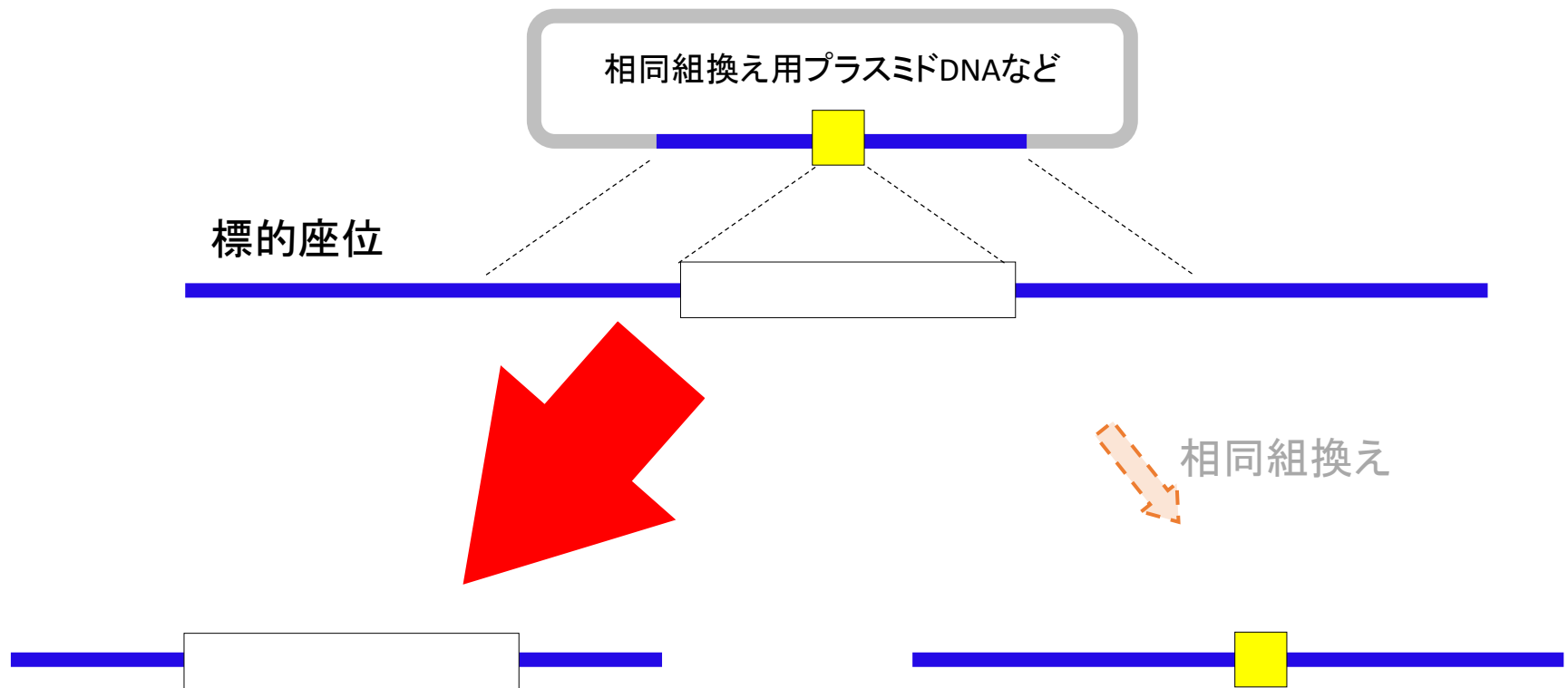


遺伝子治療モデル



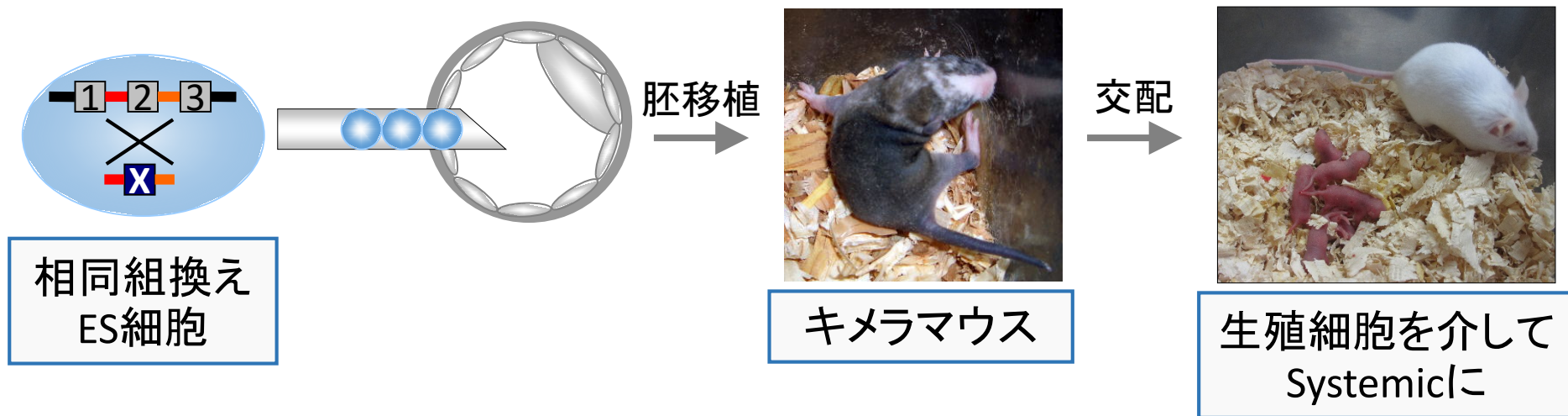
疾患モデル動物

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.....



大部分の細胞では組換えが起こらない

標的破壊マウスの作り方：従来法



問題

- ・動物種が限られている
- ・長期間を要する (10ヶ月～1年)
- ・高コスト、労力を要する



実験戦略として選択しにくい

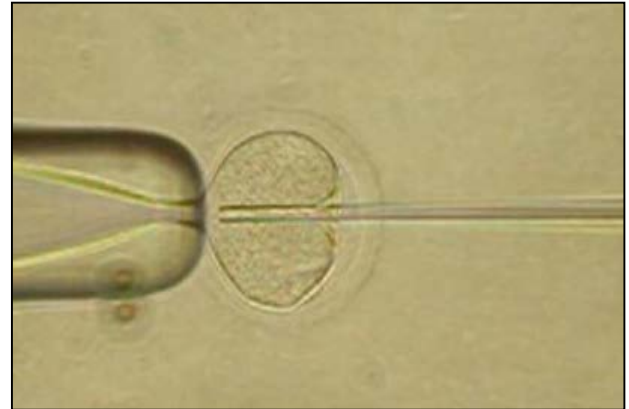
その他の作製方法

・生殖幹細胞やその他の多能性幹細胞

- ・利用可能な種が限定
- ・コスト、時間を要する

・組換え体細胞による核移植(クローン動物)

- ・利用可能な種が限定
- ・高い技術の習熟を要する



・ゲノム編集

ゲノム編集とは？

人工ヌクレアーゼ

DNA切断ユニット

DNA結合
ユニット

遺伝子導入

培養細胞

受精卵

標的配列

ATGGAGGCCAGGCCACAGCTCTACGGCGACTGAGAGG
M E A Q A H S S T A T E R

変異導入後

ATGGAGGCCAGGCCACAGCTCT-----GACTGAGAGG
M E A Q A H S S D *

DNA二本鎖切断 (DSB)

ターゲティング配列

GOI

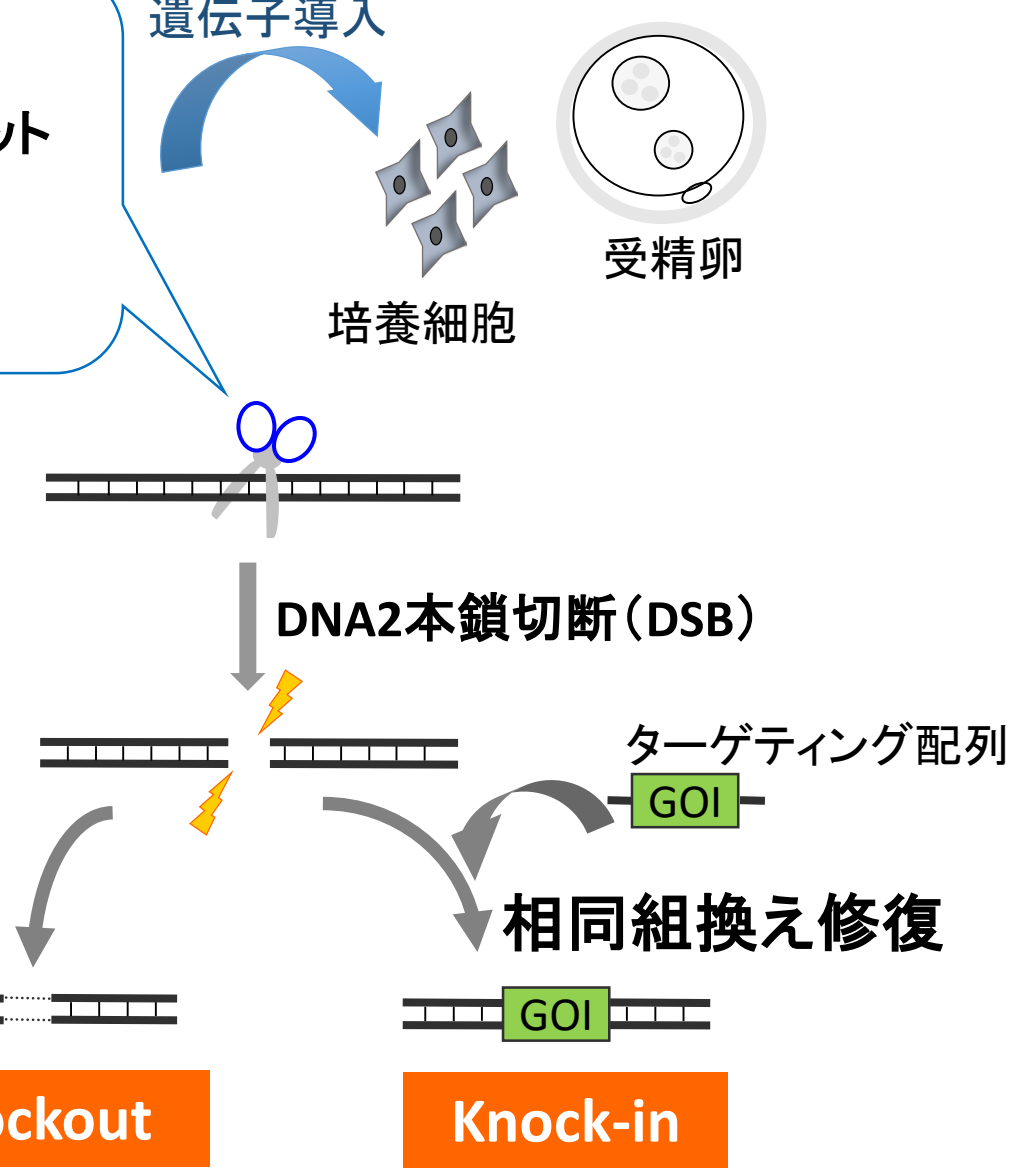
非相同末端結合修復

+ Indel mutations

相同組換え修復

Knockout

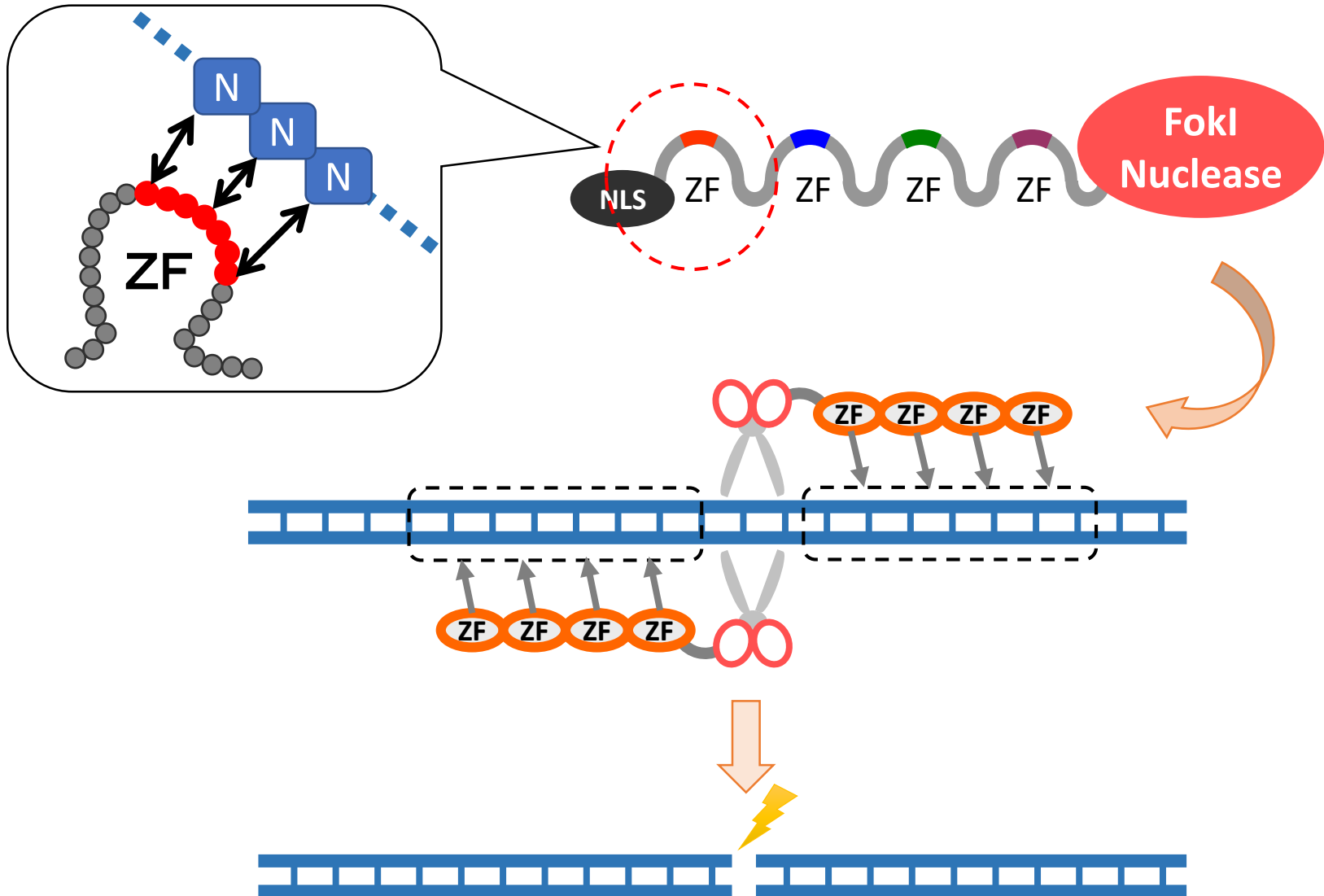
Knock-in



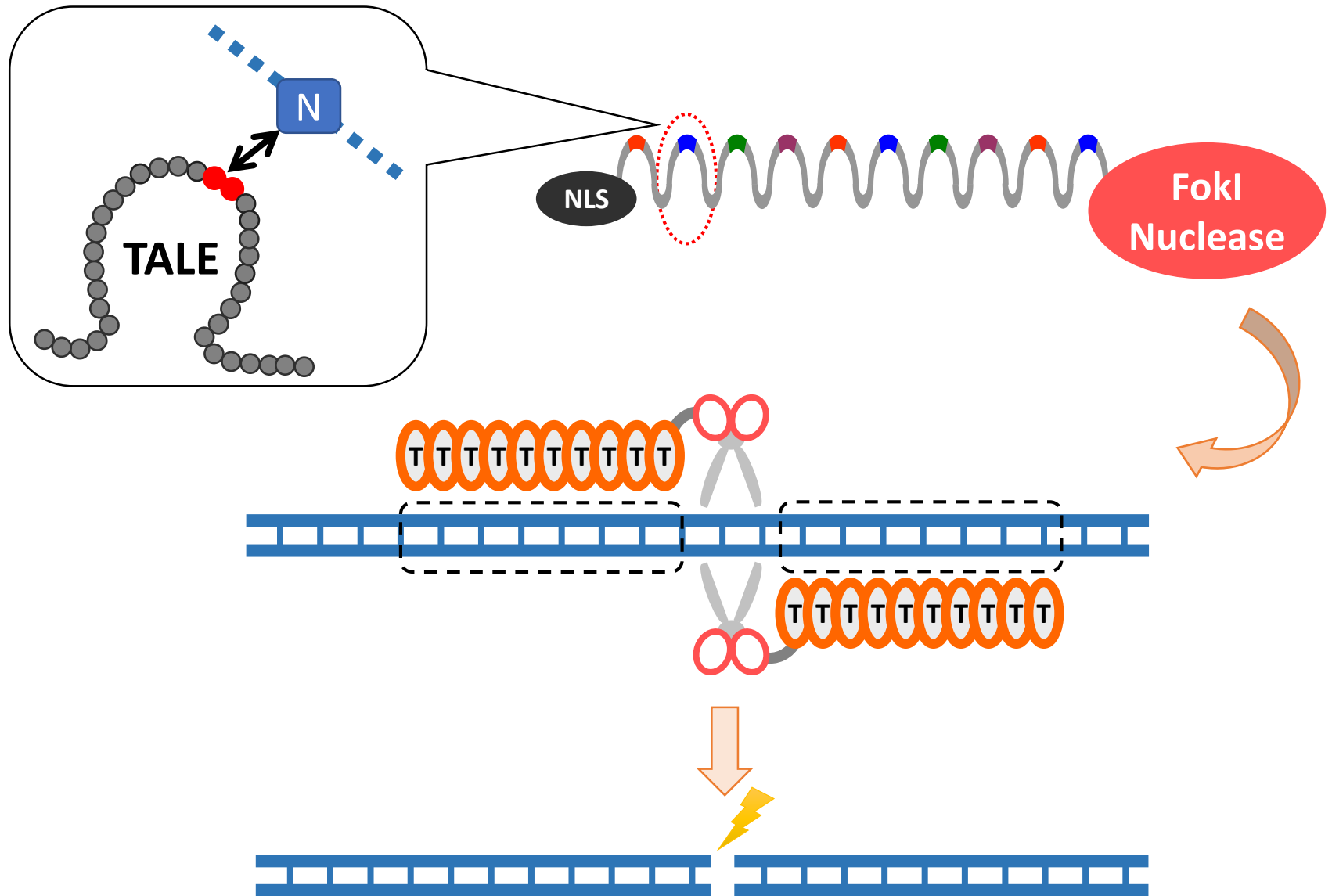
主要な人工ヌクレアーゼ

- Zinc finger nuclease (ZFN)
- Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)
- CRISPR/Cas system

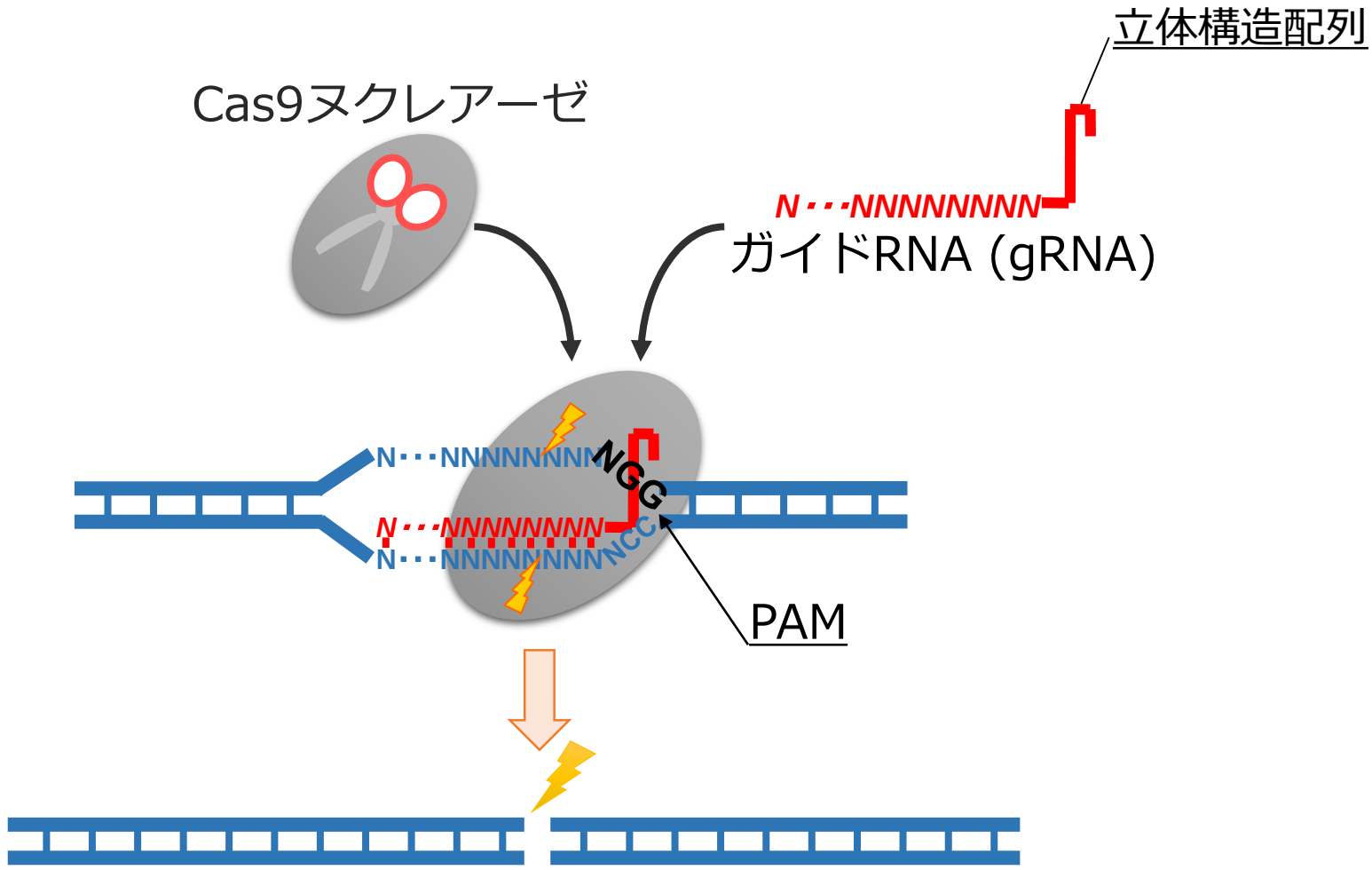
Zinc Finger Nuclease (ZFN)



Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)



CRISPR/Cas system



ZFN vs TALEN vs CRISPR: 標的配列

- どのツールも、標的とした配列と似た配列がゲノム内に存在する場合、オフターゲット活性を発揮する。
- 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ユニットの合成が圧倒的に簡単

その他のゲノム改変用ヌクレアーゼ

- Meganuclease

- ARCUT

(PNA + Ce(IV)/EDTA, 日本発の人工制限酵素)

- BurrH-based nucleasesなど

(TALE様のDNA結合タンパク質)

動物での実施例

(Fujii et al., Nucleic Acid Res., 2013)

CAG/ T3 promoter

FLAG

NLS

CAS9 ORF

NLS

Tbpl1 3' UTR

polyA(95)

Long-type

GGATTCTCCCAGGCCAGGGG

A word cloud visualization of codon frequencies. Each letter's size is proportional to its frequency in the dataset. The most prominent letters are U, A, G, C, and A, indicating their high frequency across all three positions of the codon.

VS

Short-type

GGATTCTCCCAGGCCAGGGG

[illegible]

gRNA

C57BL/6, ICR,
BALB/cなど

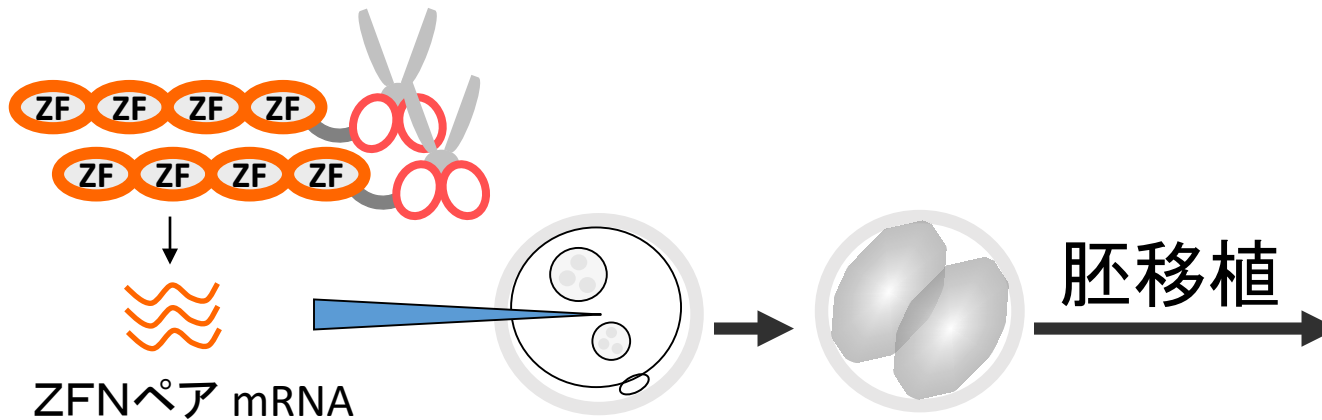


胚移植

GCTTCTGAGGACCGCCTGG CCTGGGAGAATC -1
GCTTCTGAGGACCGCCC GGGAGAATC -7
GCTTCT GGGAGAATC -18
GC CTGGGAGAATC -21
GCTTCTGAGGACCGCCTatggcctGCCTGGG +6

Condition	%変異個体
CAS9 100 gRNA 10	~85
CAS9 10 gRNA 10	100
CAS9 10 gRNA 1 (μg/ml)	100

マウス (ZFN)



遺伝子	産子/変異仔数 (%)
<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)

Gli3

```
GGCCACAGCTCTACGGCGACTGAGAGGAA
GGCCACAGCTCTCGGCGACTGAGAGGAA
GGCCACAGCTCTAGGCGACTGAGAGGAA
GGCCACAGCTCTAGCGACTGAGAGGAA
GGCCACAGCTCTAGACTGAGAGGAA
GGCCACAGCTCTAGACTGAGAGGAA
GGCCACAGCTCTACGGgCGACTGAGAGG
```

およそ1ヵ月で、ゲノム改変マウスの作製が可能

(Fujii et al., PLoS ONE, 2013)(Fujii et al., JRD., 2015)

マウス (TALEN)

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

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

ブタ (CRISPR/Cas)

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

サル (CRISPR/Cas)

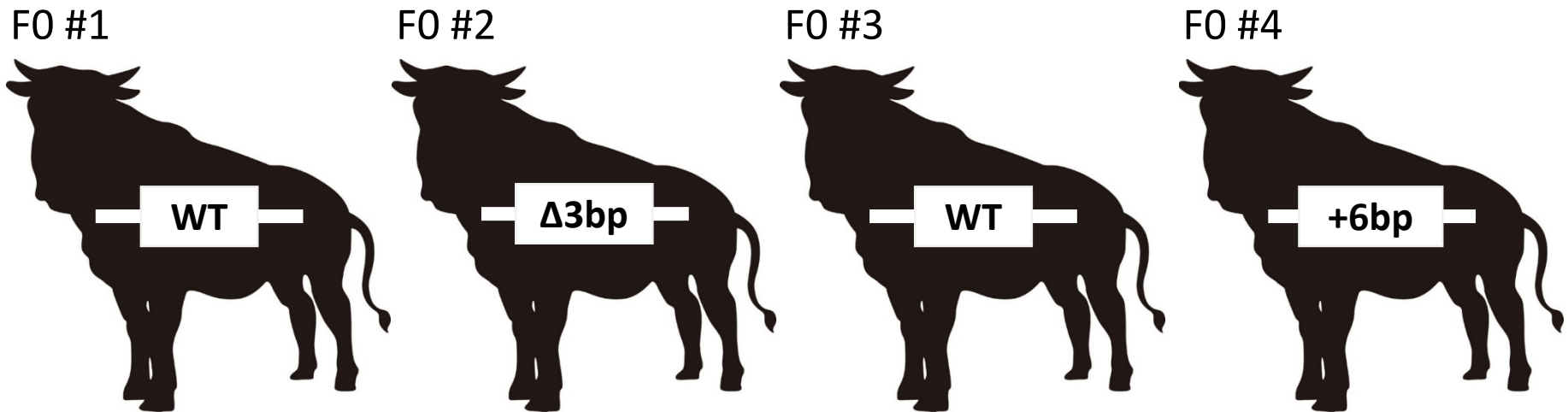
カニクイザル

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

(Niu et al., Cell, 2014)

大動物家畜でのアプローチでは...

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

ウシ(体細胞へZFN→SCNT)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21912434>

ヤギ(体細胞へCRISPR→SCNT)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25188313>

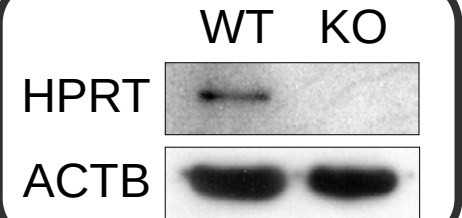
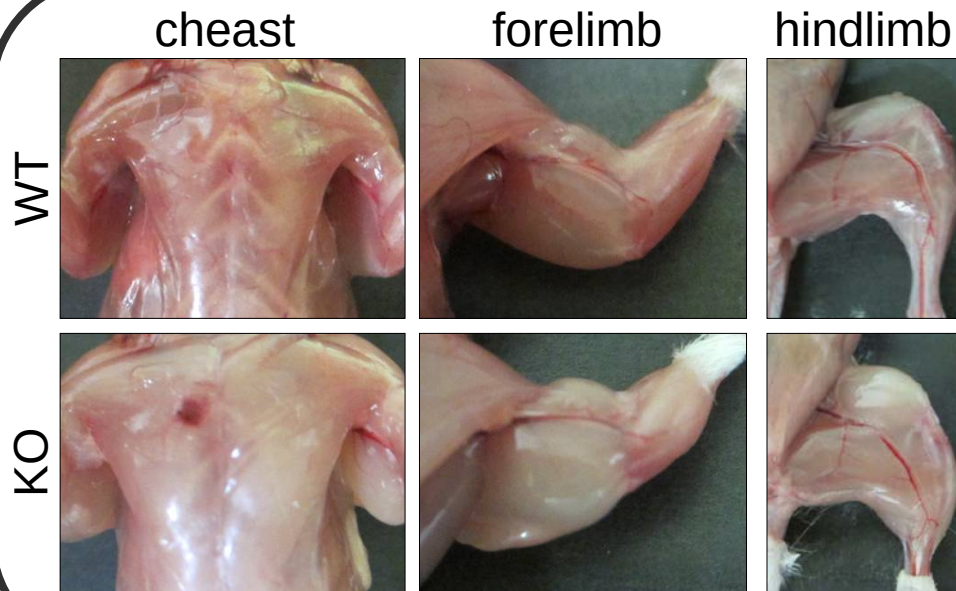
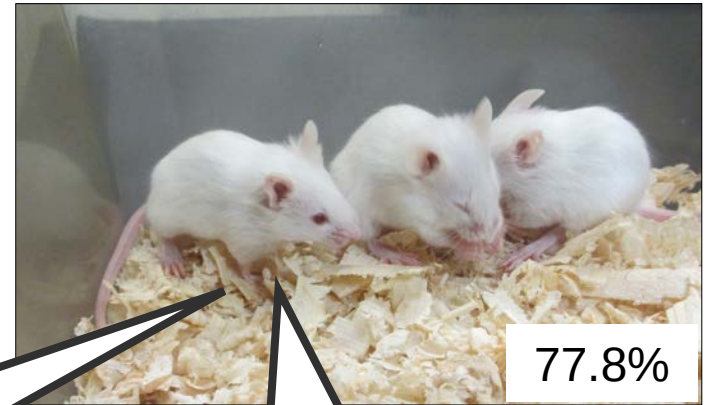
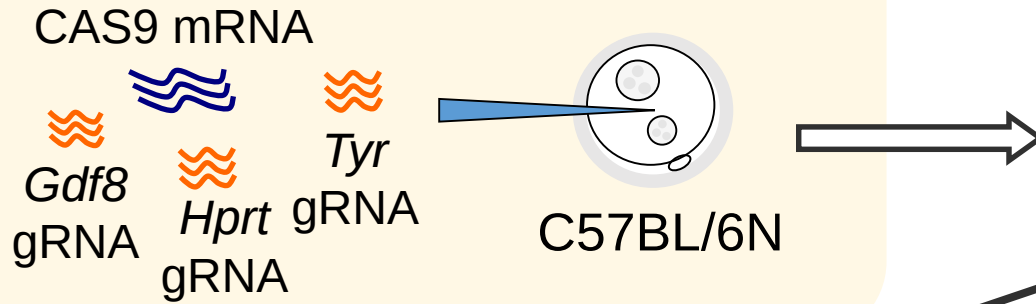
ニワトリ(始原生殖細胞へTALEN)

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

人工ヌクレアーゼによる 応用的アプローチ

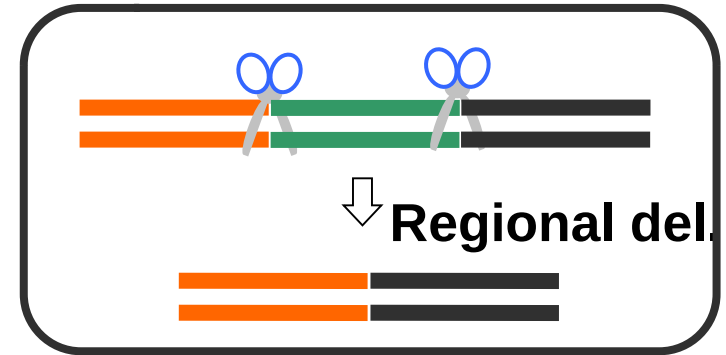
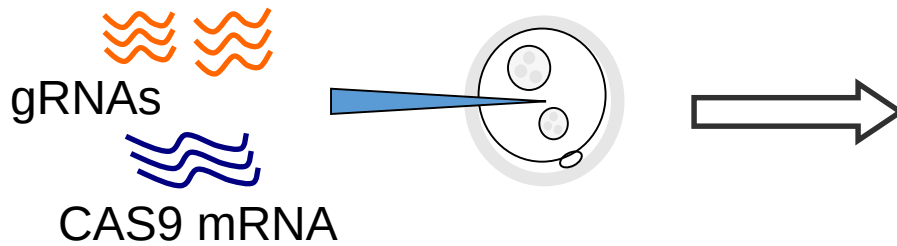
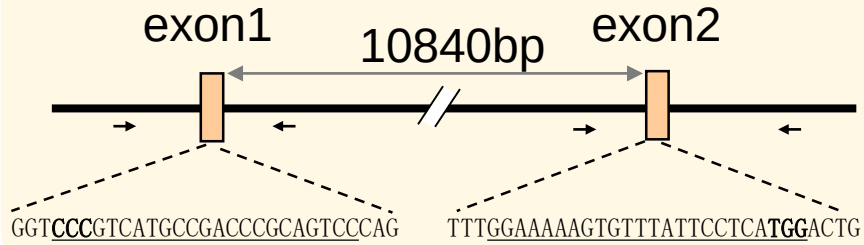
複数遺伝子破壊

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

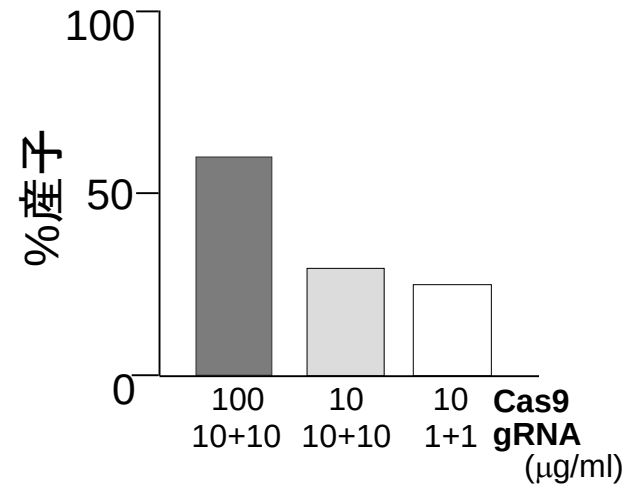


領域欠失

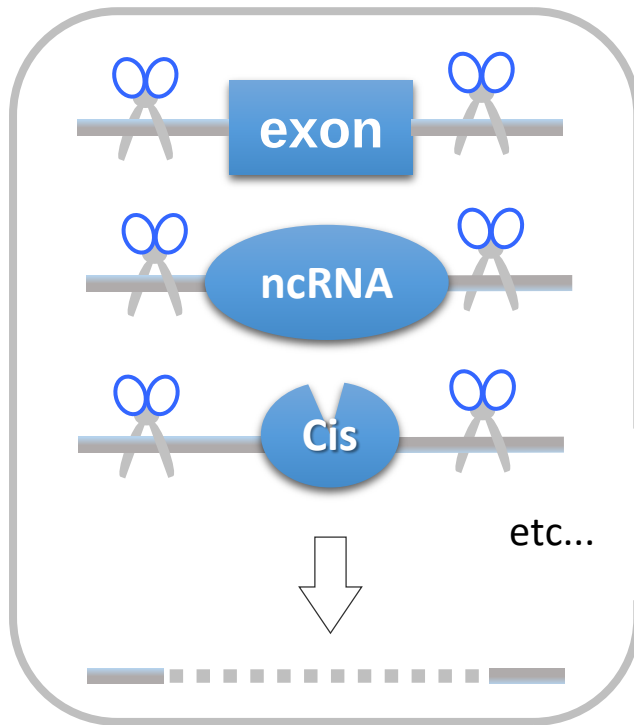
Double restriction at Hprt gene



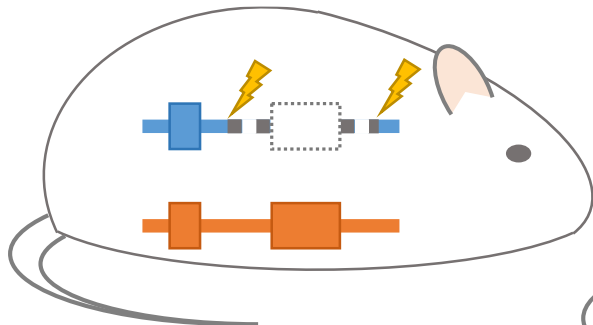
領域欠失効率



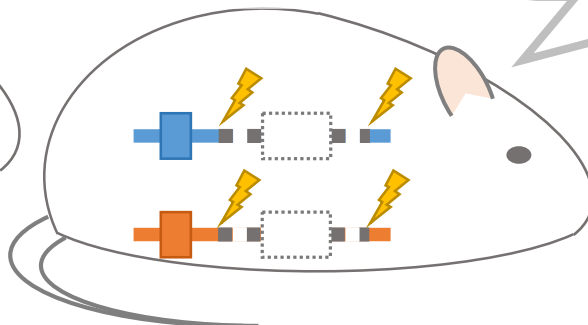
領域欠失マウスの利点



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

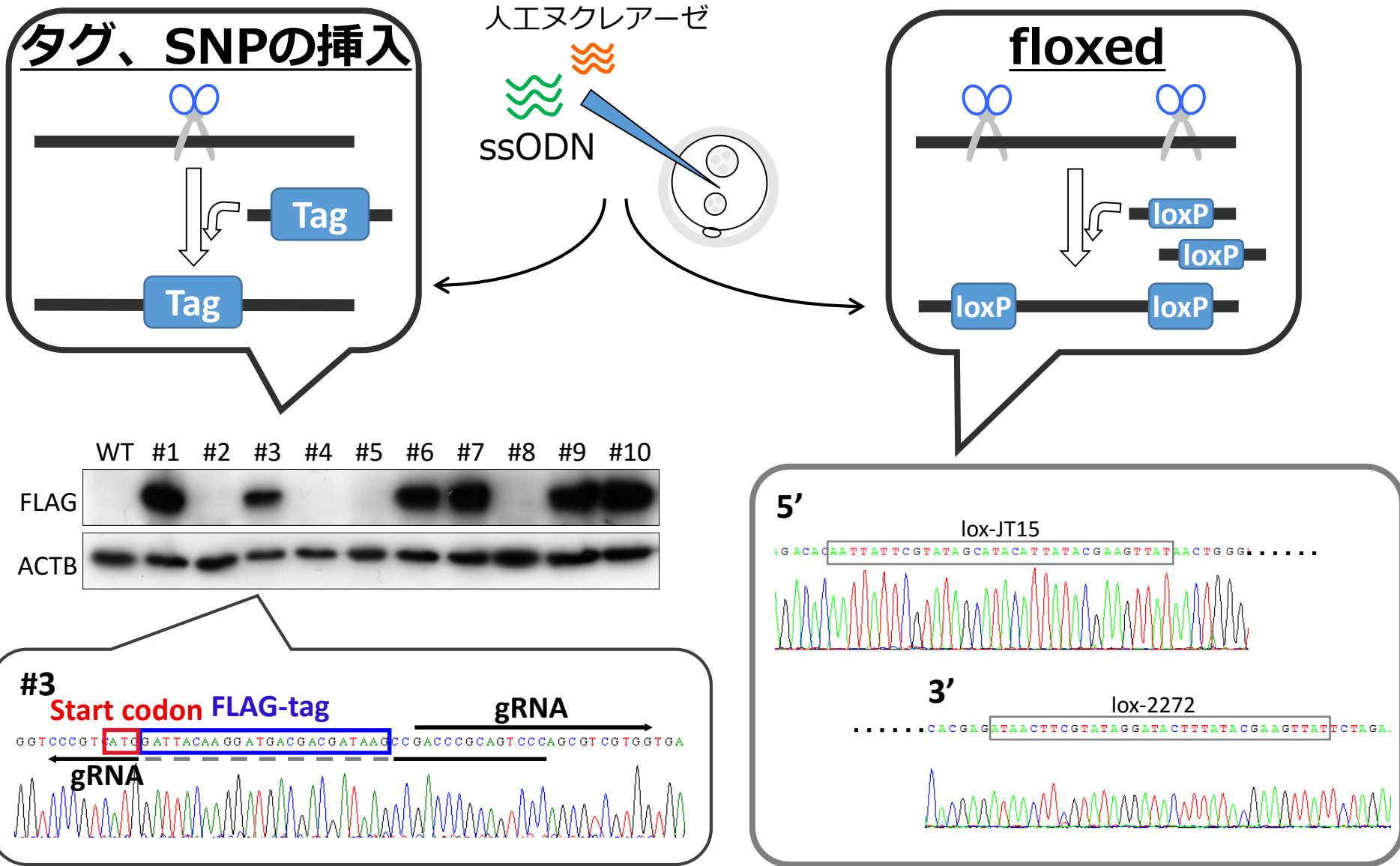


個体2



exonの欠損

外来配列のノックイン



(Fujii et al., BBRC, 2014)

(Fujii et al., Unpublished)

作製方法の基礎

実験の流れ

標的配列の設計



人工ヌクレアーゼの入手・
コンストラクション



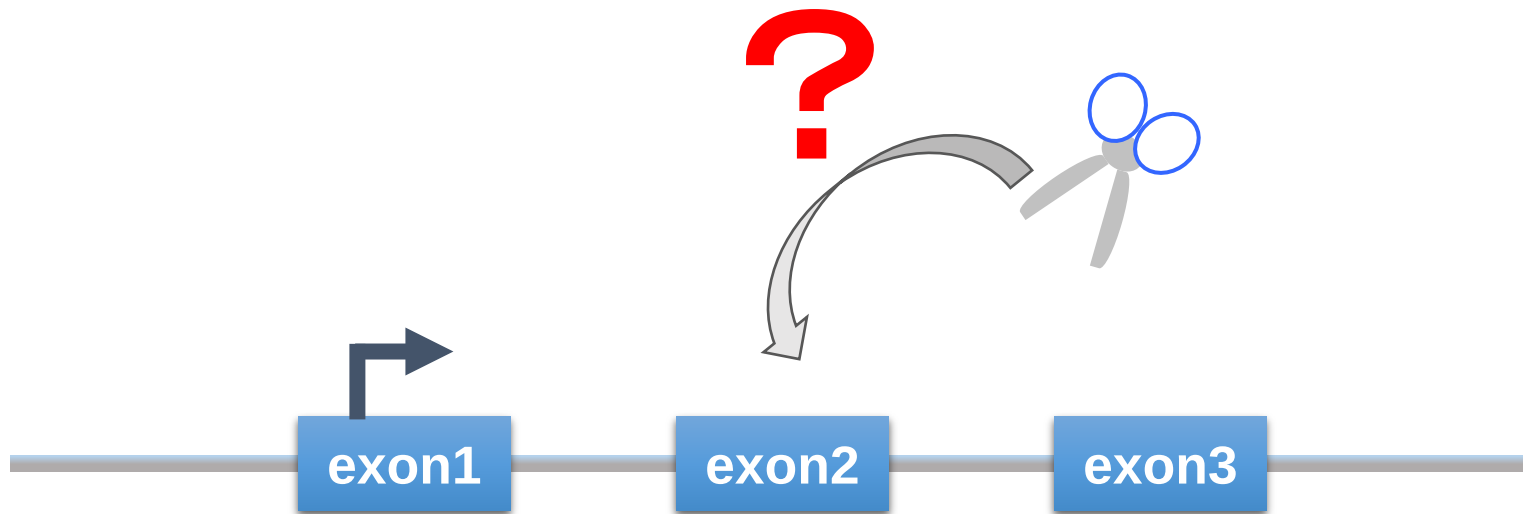
コンストラクトの導入



変異の検出

標的配列の設計： 場所を絞り込む

- 標的遺伝子のORF内にindelが導入されたからといって、ノックアウトとは限らない。遺伝子のドメインや機能をよく理解して標的を決定する必要がある。



オンライン設計ツール

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

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

CHOPCHOP



or paste input sequence

動物種の選択

Accession No.,
染色体領域の入力

☒ CRISPR/Cas9 ☐ TALEN

Find Target Sites!

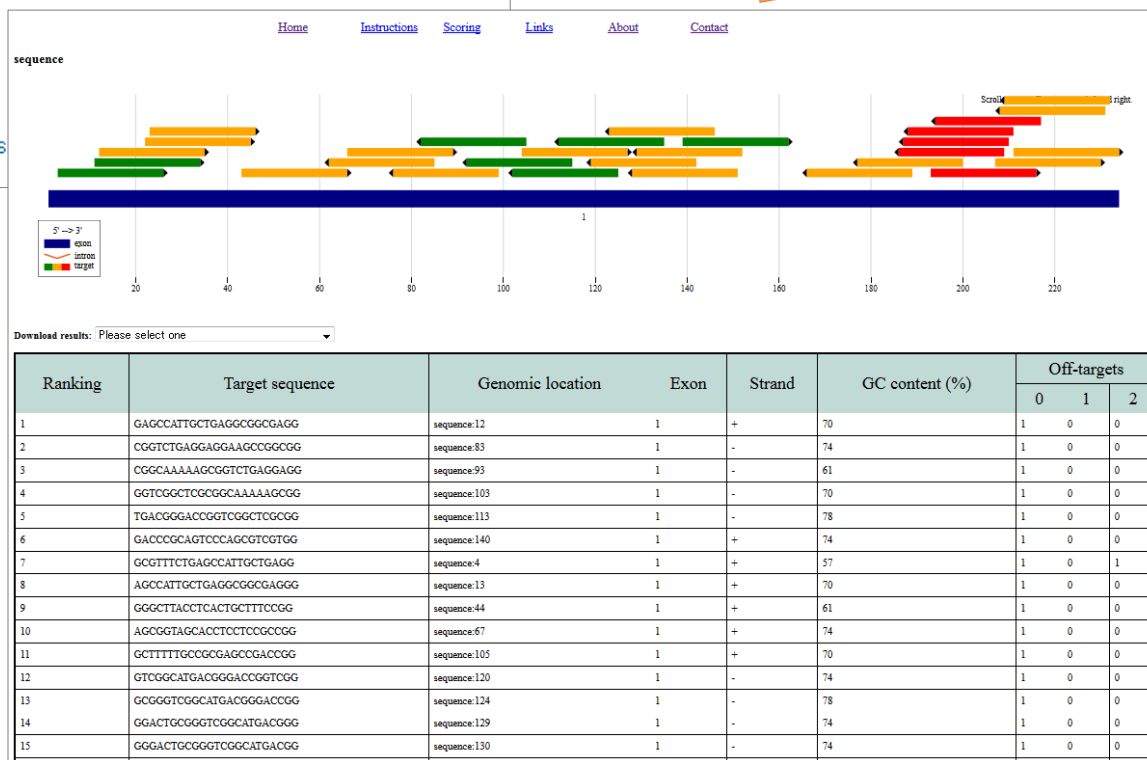
検索開始ボタン

塩基配列の
直接入力

Reset options

Toggle advanced options

使用例) CHOPCHOP



実験の流れ

標的配列の設計



人工ヌクレアーゼの入手・
コンストラクション



コンストラクトの導入



変異の検出

人工ヌクレアーゼの入手

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

人工ヌクレアーゼの入手

- 出来合いのものを購入する
- 報告者にリクエストする
- Addgene (非営利バイオリソースセンター)



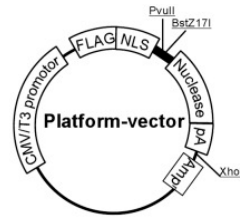
人工ヌクレアーゼは簡単に入手可能

<https://www.addgene.org/>

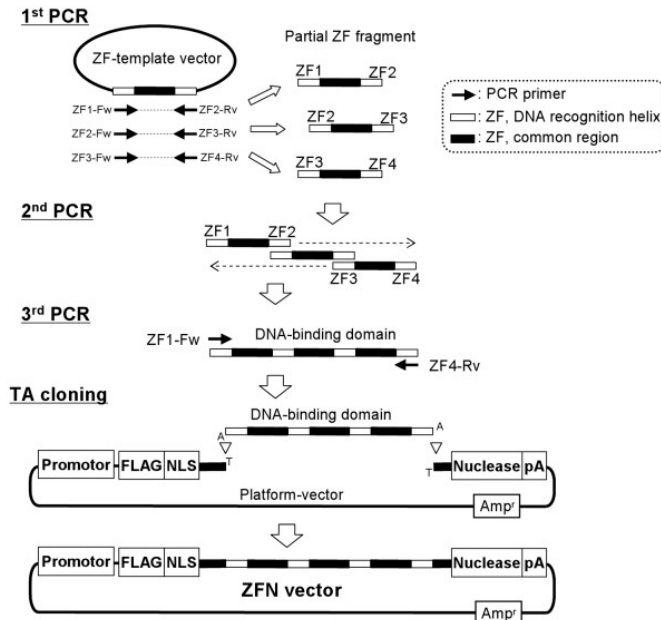
						technology
Human	293T	CMV	Kim	NGG	p3s-Cas9HC	In vitro transcription & transfection of ssRNA
	293T, hESCs	CBh	Zhang	NGG	pX330 , pX260 , pSpCas9 (PX165) , pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) , pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)	Dual expression Cas9 & gRNA on same plasmid
	Pluripotent stem cells (hPSCs)	CAG	Musunuru	NGG	pCas9_GFP	gRNA_Cloning Vector
		CMV	Joung	NGG	JDS246	MLM3636
	hESCs, human IPS cells, 293FT	EF1a	Thomson, Sontheimer	NNNGATT	pSimplell-NLS-NmCas9-HA-NLS(s) , pSimplell-U6-tracr-U6-BsmBI-NLS-NmCas9-HA-NLS(s) , pSimplell-NmCas9-FLAG	Dual expression Cas9 & gRNA on same plasmid
Insect	Drosophila	Hsp70	O'Connor-Giles, Wildonger, Harrison	NGG	pHsp70-Cas9 , pBS-Hsp70-Cas9	pU6-BbsI-chiRNA
Mouse	Embryo	CMV	Huang	NGG	pST1374	In vitro transcription & transfection of ssRNA
	Embryo	CAG/T3	Fujii	NGG	pCAG-T3-hCAS-pA	In vitro transcription & microinjection
	Mouse neuron	CBh	Zhang	NGG	pX330 , pX260	Dual expression Cas9 &

ZFN/TALENの構築

A

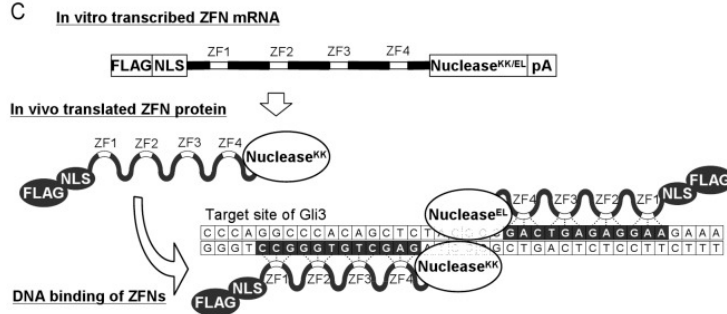


B



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248753>

C

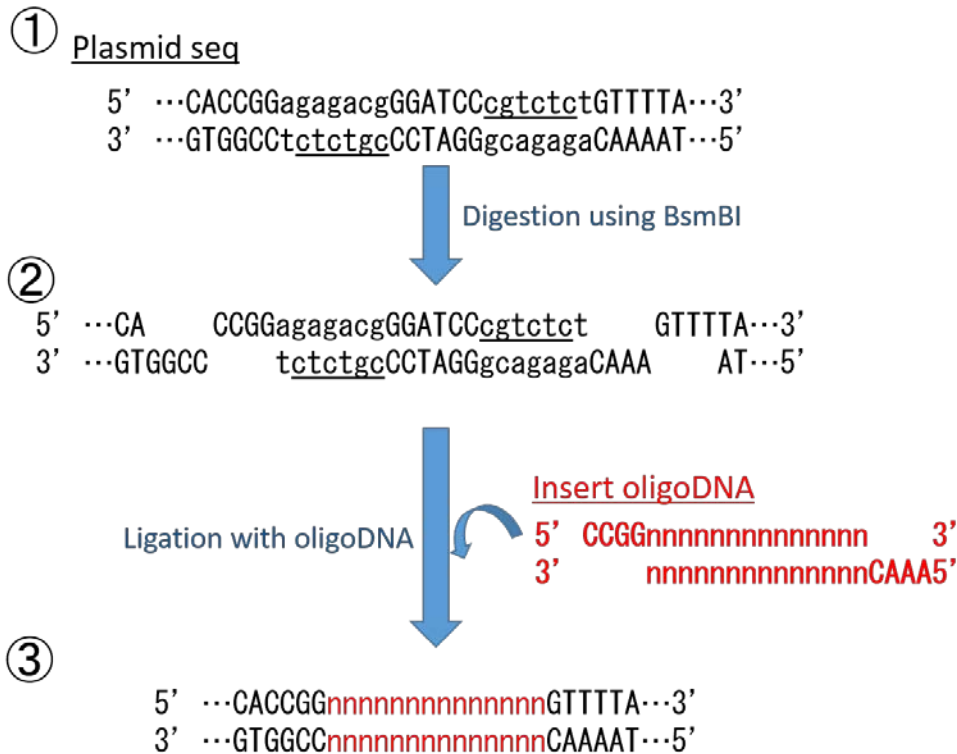


(Fujii et al., PLoS ONE, 2013)

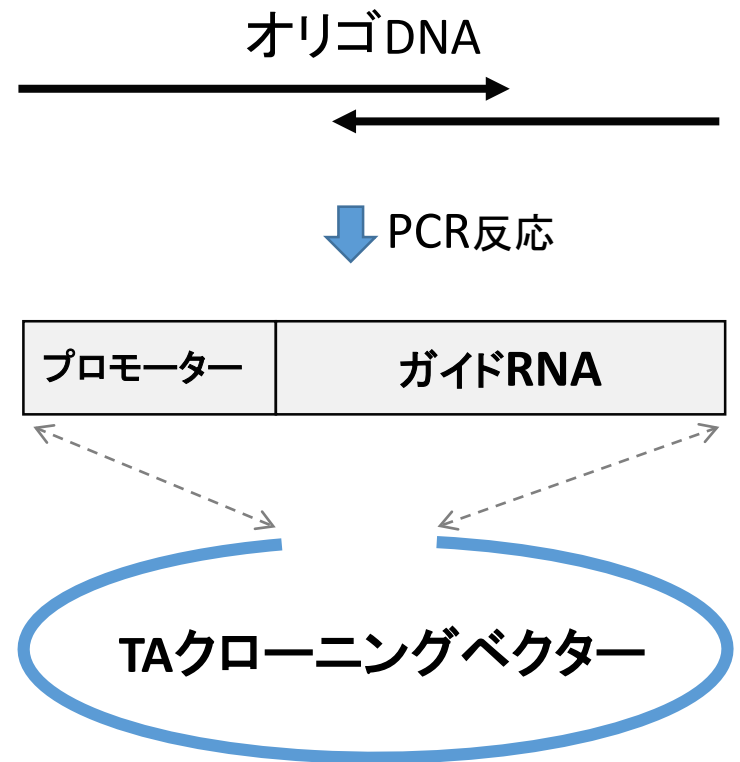
(Zhang et al., Nat Biotech 2011)

gRNAベクターの構築

type IIs制限酵素を 利用する方法



PCRによる合成



実験の流れ

標的配列の設計



人工ヌクレアーゼの入手・
コンストラクション



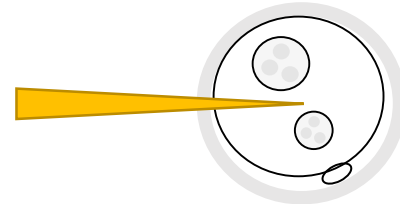
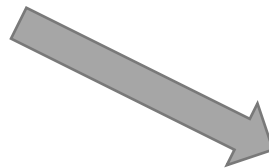
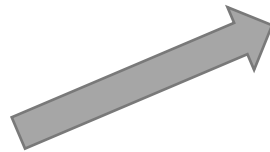
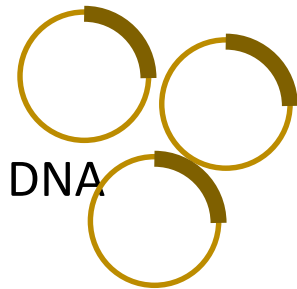
コンストラクトの導入



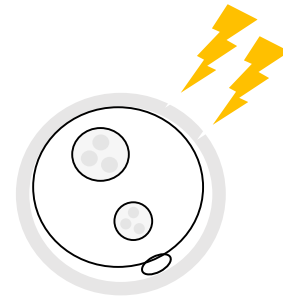
変異の検出

受精卵へのコンストラクトの導入

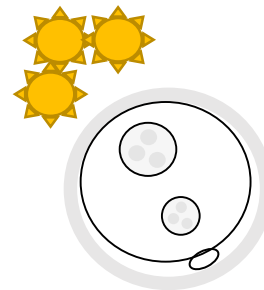
人工ヌクレアーゼ
コンストラクト



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

<http://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を使わない方法

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25269785>

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）

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26096991>

実験の流れ

標的配列の設計



人工ヌクレアーゼの入手・
コンストラクション

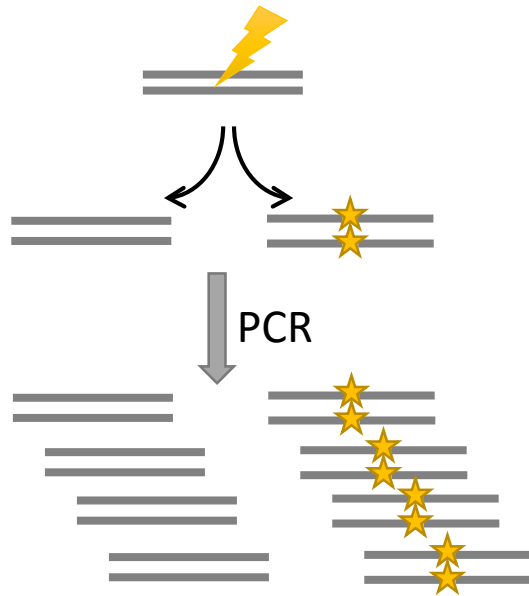


コンストラクトの導入



変異の検出

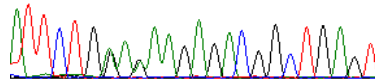
導入変異(indel)の検出方法



①PCR-direct sequencing

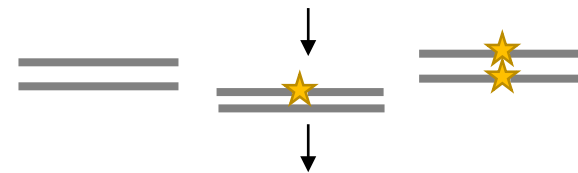


ATTCTGAAAAAGAGACGGCTGAGT



②Surveyor assay

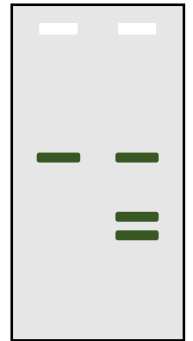
Mix, denature, reannealing



T7EIやCellによるミスマッチ切断



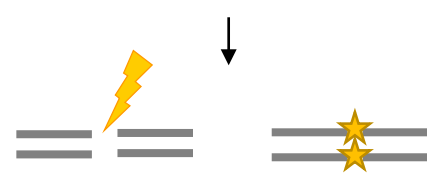
野生型
変異体



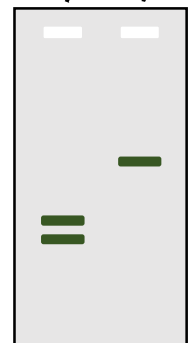
③PCR-RFLP



制限酵素処理



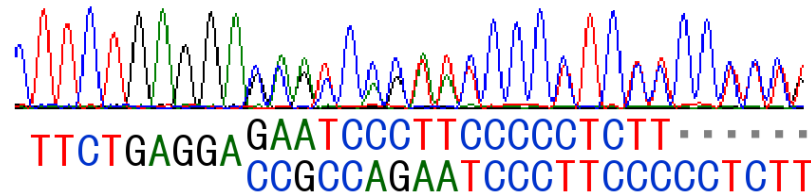
野生型
変異体



波形解析

(A)

DNA waveform data



Predicted sequences of both alleles

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

(B)

Target sequences by TA cloning

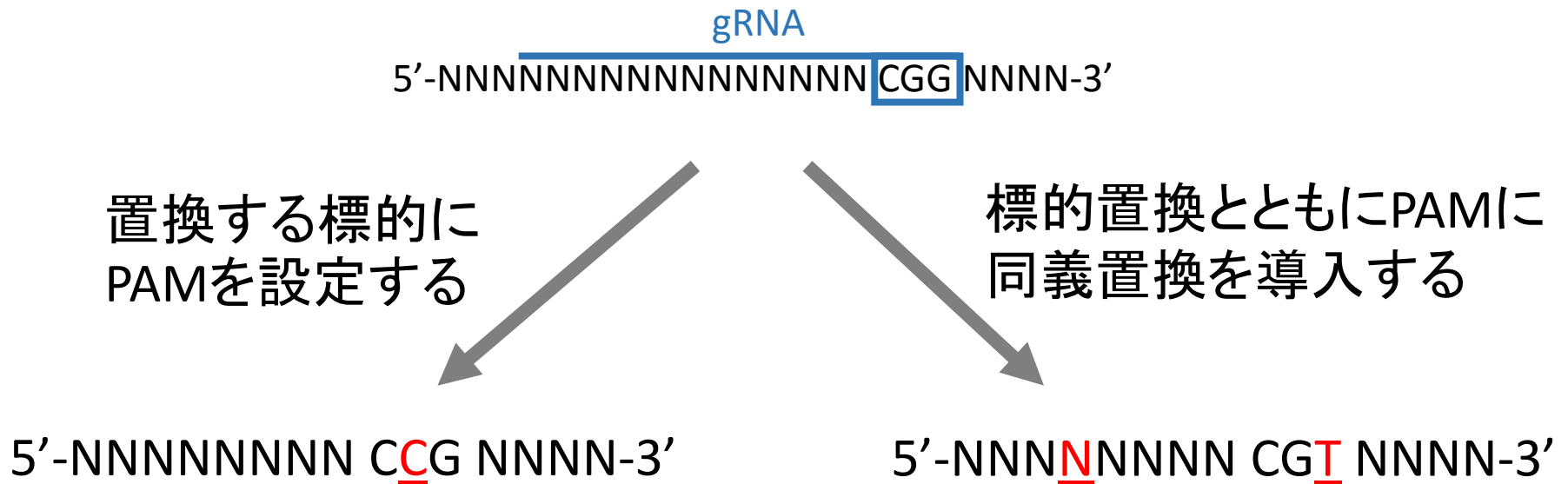
Clone1	TTCTGAGGACCGCC-----AGAATCCCTTCCCCCTCTT
Clone2	TTCTGAGGACCGCC-----AGAATCCCTTCCCCCTCTT
Clone3	TTCTGAGGA-----GAATCCCTTCCCCCTCTT
Clone4	TTCTGAGGACCGCC-----AGAATCCCTTCCCCCTCTT
Clone5	TTCTGAGGA-----GAATCCCTTCCCCCTCTT
Clone6	TTCTGAGGA-----GAATCCCTTCCCCCTCTT
(WT)	TTCTGAGGACCGCCCTGGGCCTGGGAGAATCCCTTCCCCCTCTT

遺伝子ノックアウトデザイン注意

- フレームシフトは期待できるか、重要なドメインが破壊されているか
- 標的座位上の他の遺伝子やエレメントの存在
- ドミナントネガティブ変異体？ハプロ不全？
- オフターゲット変異の有無

ノックインのデザイン

- ノックインされた後には人工ヌクレアーゼが再びアクセスできないように設計したほうが良い。
特に点変異の導入には慎重な設計を。



オフターゲット効果の回避

- 受精卵を介した変異導入では、標的配列を慎重に設計することでオフターゲット変異は避けられる。
- しかし、オフターゲット変異が起こらないわけではない
(SNPやタグの挿入など、座位が選べない場合など)。

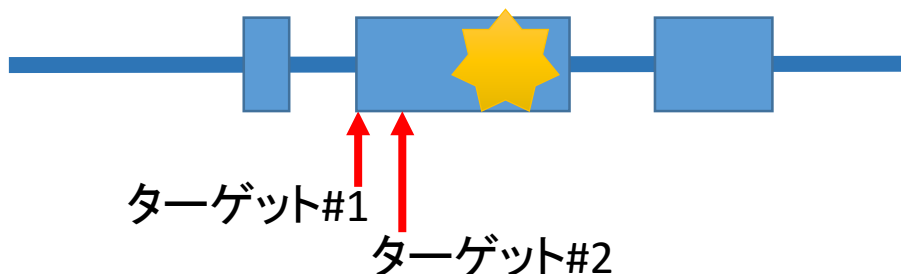
標的配列	No. of mutated pups			変異導入個体 (%)
	100 + 10 ^a (n=8)	10 + 10 ^a (n=7)	10 + 1 ^a (n=5)	
GGATTCTCCCAGGCCCAGGGCGG	7	7	5	95.0
<u>T</u> GATTCTCCCAGGCCCAGGG <u>AAG</u>	2	0	0	10.0
GG <u>C</u> TTCTCCCAGGCCCAGG <u>AT</u> GG	4	0	0	20.0
GGA <u>A</u> TCTCCCAGGC <u>T</u> CAGGG <u>A</u> GG	5	0	0	25.0
GGAG <u>G</u> TCTCCCAGGCC <u>T</u> AGGG <u>T</u> GG	5	6	5	80.0

^aCas9 + gRNA (μg/ml)

(Fujii et al., Nucleic Acid Res, 2013)

解決案①

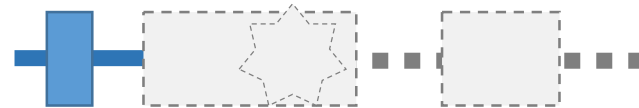
異なる配列を標的とした独立ラインを作製する



#1ライン 標的座位



#2ライン 標的座位



#1ライン

オフターゲット候補座位

WT, ATGCATGCATGCATGC
OT1, ATG**T**ATGCATGCATGC
OT2, ATGCATG**A**ATGCATGC
OT3, A**C**GCATGCATGCAC**C**G



#2ライン

オフターゲット候補座位

WT, CAGTCAGTCAGTCAGT
OT1, CA**C**TCAGTCAGTCAGT
OT2, CAGTCAGT**A**AGTCAGT
OT3, CAGTC**TT**TCAGTCAGT

解決案② ニッカーゼやFokI-dCASを利用する

オフターゲット効果は低減できるが、
設計の自由度は制限される

解決案③

オーソログ Cas9 による CRISPR/Cas システムを利用する

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

(Fonfara et al., Nucl. Acids Res., 2014)

解決案④

オフターゲット活性が低減したCas9を利用する

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

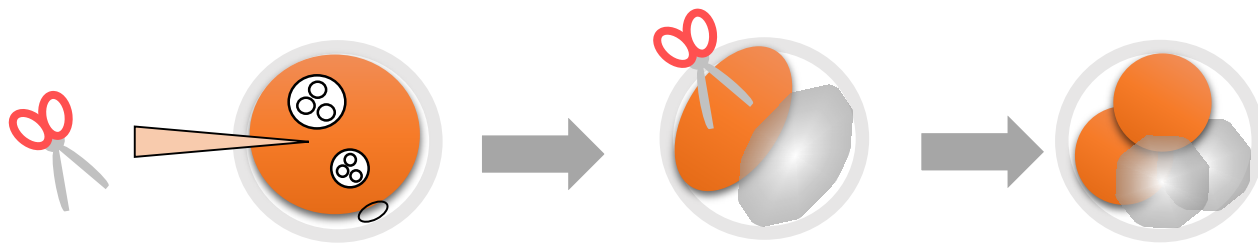
ゲノム編集における今後の課題

ゲノム編集における今後の課題

- 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
- その他

課題:モザイクな変異導入

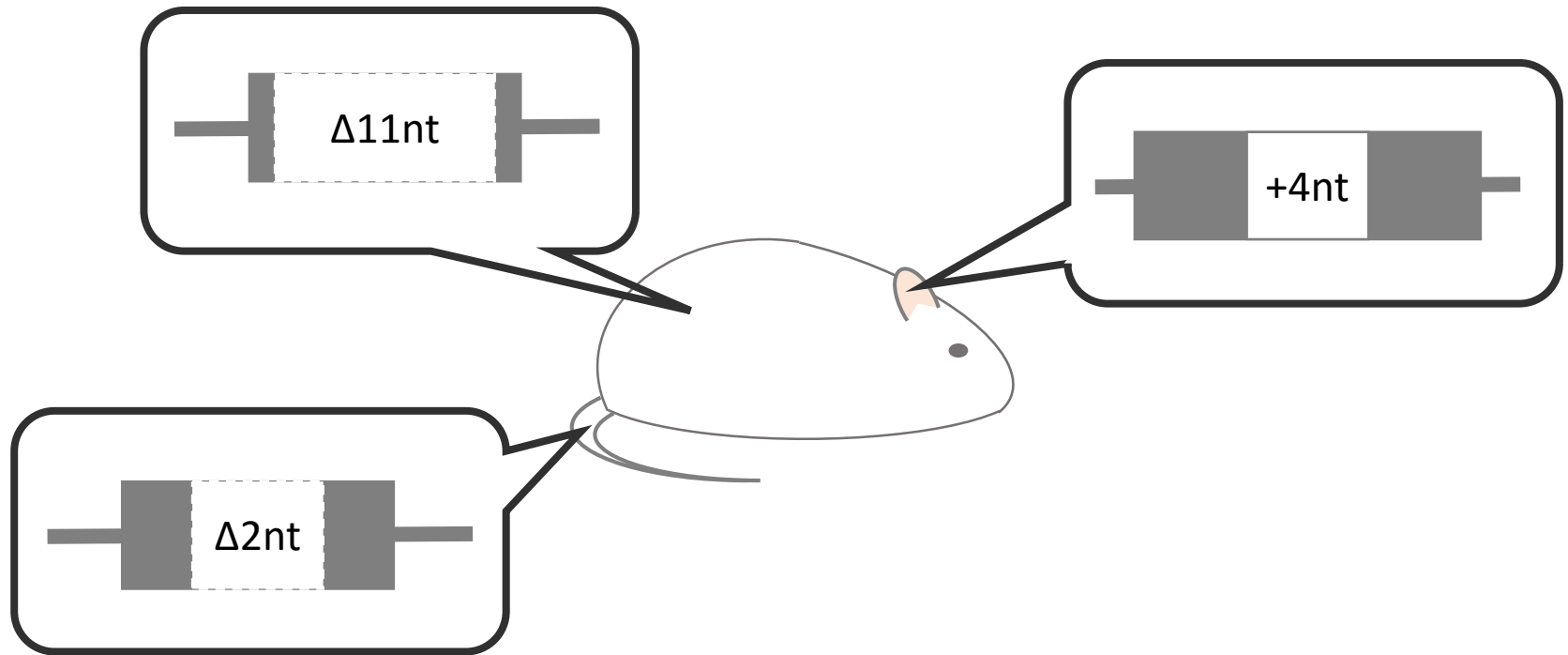
- 人工ヌクレアーゼが1-細胞期以後のそれぞれの割球（細胞）で機能した場合、得られる産子はモザイクを呈する。



Tyrosinase KO

課題:モザイクな変異導入

- 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？

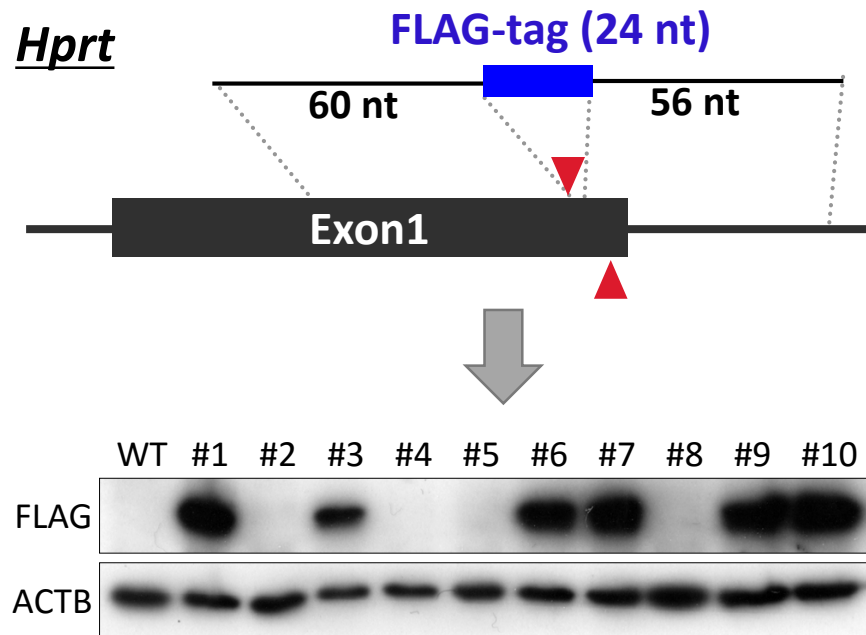
- F1以降の個体で評価を行う。
- 雄性生殖細胞（精子幹細胞、GS細胞）や雌性生殖細胞（未受精卵母細胞）でゲノム改変を行う。
- 新たな人工ヌクレアーゼツールやアプローチの開発

ゲノム編集における今後の課題

- 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
- その他

課題：ノックイン効率

- ssODNによるノックイン(SNPやFlag-tagなど)は高効率



(Fujii et al., BBRC., 2014)

- 長い配列をノックインする場合、プラスミドDNAなど由来する2本鎖DNAをノックインベクターとして利用する

課題：ノックイン効率

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

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

- Floxedマウスの作製効率は低い
- プラスミドDNAを鋳型としたノックイン効率は低い

DNA修復機構

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

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

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 (SCR7, Cytochalasin B, RS-1) によるDNA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

([Miura et al., Sci Rep., 2015](#); [Yoshimi et al., Nat Commun., 2016](#))

今後の課題

Stochastic→Deterministic

ゲノム編集における今後の課題

- 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
- その他

遺伝子治療の議論：受精卵の遺伝子治療

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

生態系の改変: ジェンドライブへの応用

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25908821>

ゲノム編集における今後の課題

- 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
- その他

本日のスライドは下記のホームページに載せておきます

<http://wtrfujii.com/>

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