

Application Note

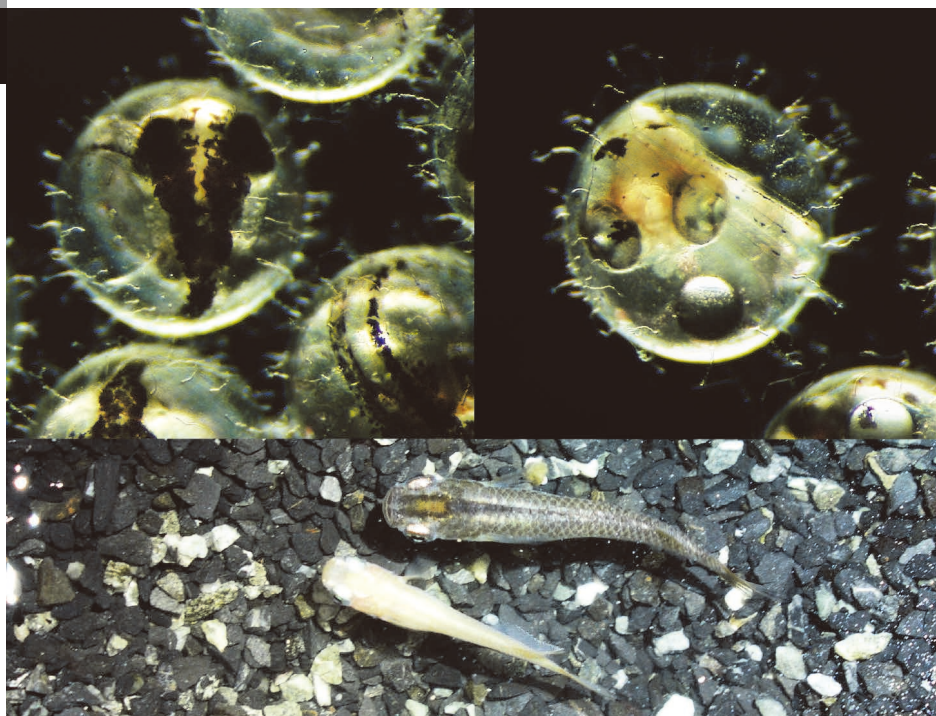
No.36A

ライフサイエンス

メダカへの変異導入と変異系統作製 – MultiNA® の活用 –

Genome Editing and Creating Mutant Strains in Medaka
– Application of MultiNA® –

木下政人^{*1}



Lifescience

1. はじめに

近年, TAL effector nuclease (Transcription Activator-Like Effector Nuclease), CRISPR/Cas System (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein) などと呼ばれるゲノム上の任意の配列に DSB (Double-Strand Break: 二本鎖切断) を導入できるゲノム編集のための技術が開発されました。

TAL effector nuclease はヌクレアーゼドメインを持つキメラタンパク質の人工ヌクレアーゼ, CRISPR/Cas System は RNA を介した RGEN (RNA-Guided EndoNuclease: RNA 誘導体型ヌクレアーゼ) とそれぞれ原理が異なります。^{1, 2, 3)} その後, これらを基にした様々なツールが日進月歩の勢いで開発されています。

この技術がもたらした最大の貢献の一つは, これまで ES 細胞等が存在するマウスなど極限られたモデル生物でしか行い得なかった選択的なジーンターゲッティング (遺伝子破壊) が, 多くの生物でも容易に行えるようになったということである。

そしてこれまでに, 線虫, ショウジョウバエ, カイコ, コオロギ, ホヤ, カエル, イモリなどで遺伝子破壊が報告されています。⁴⁾ DSB によるジーンターゲッティングの機構を図 1 に示します。DSB が起ると, 細胞はその修復を行います。その修復には大きく分けて 2 つの経路があります。その 1 つは, 正常な姉妹染色体を鋳型として修復する Homology-Directed Repair です。この場合, 染色体の傷が元通りに修復されるため変異は導入されません。一方, もう一つの Non-Homologous End Joining では, 染色体切断という急場をしのぐため “とりあえず” 染色体をつなぎます。この時に塩基の欠失や付加 (insertion/deletion, in/del) という変異が導入され, その結果として遺伝子が破壊されます。

ジーンターゲッティングそのものは可能となりましたが, 実際に変異系統を樹立するには, 作製した TAL effector nuclease あるいは CRISPR/Cas の活性評価, 目的の変異が導入された個体の選別, 同一の変異を持つ個体の選別, 両アリル

^{*1} 京都大学大学院 農学研究科 応用生物科学専攻

に同一変異を持つ個体の選別など、費用や労力を要するいくつかの行程が存在します。

我々はこの評価や選別には後述する HMA (Heteroduplex Mobility Assay: ヘテロ二本鎖移動度分析) という手法を用いています。HMA は従来、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で行います。しかしながらゲルの作製や多検体処理において多くの手間と時間を要してしまうのが難点です。

マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA® は自動で電気泳動を実施する分析装置です。必要な試薬とサンプルをセットするだけで分析を実施することができます。

ここでは、変異個体の評価や選別に MultiNA® を活用した効率的な変異系統の作製についてご紹介します。^{5, 6, 7)}

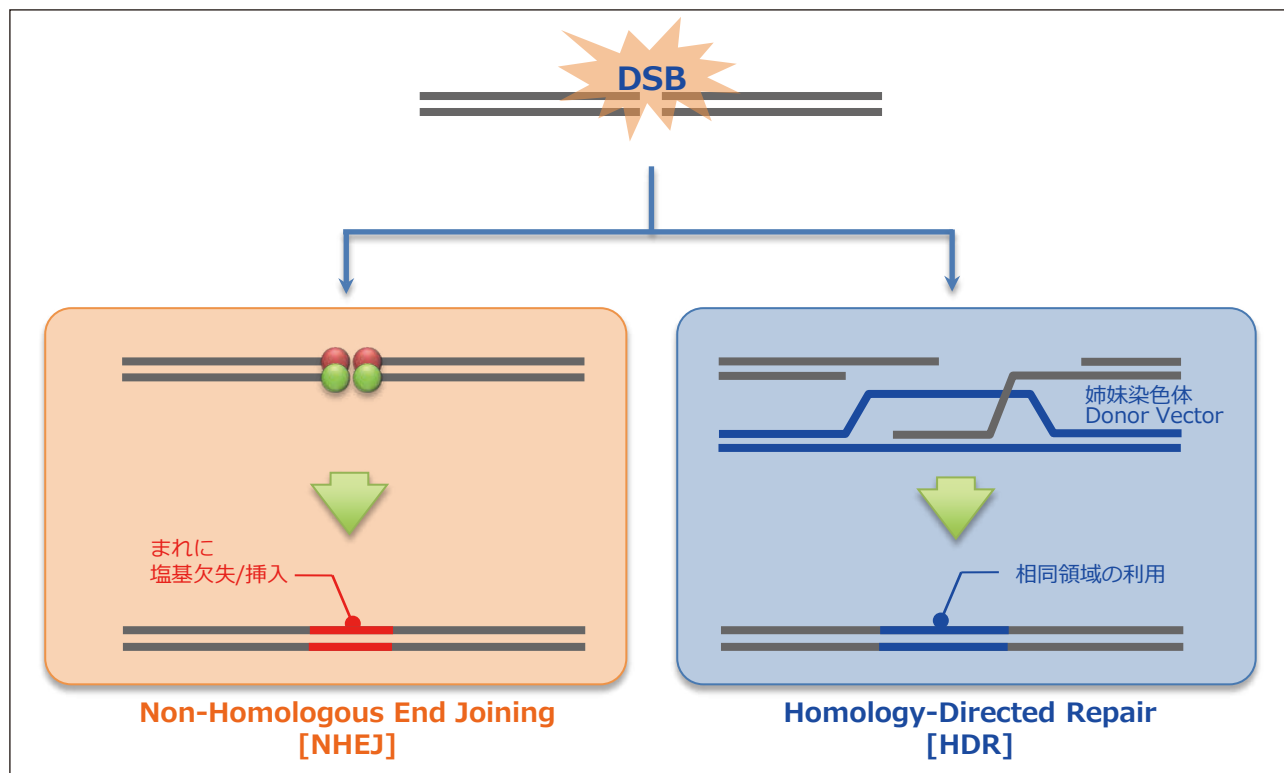


図1 DSBによるジーンターゲティングの機構 (染色体の二重鎖切断と修復方法)

2. メダカへの変異導入と変異系統作製までの流れ

基本的な流れを図2に示します。以下にステップ2以降の行程での、MultiNA® の活用法について紹介いたします。なお、ステップ1の TAL effector nuclease または、CRISPR/Cas System の設計や RNA 作製方法については、他の総説⁴⁾ や下記サイト等をご参考ください。

- TAL effector nuclease assemble protocol
<http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/strain/laboManual.jsp>
- sgRNA の設計
<http://viewer.shigen.info/cgi-bin/crispr/crispr.cgi>
- メダカにおける Off-target site 検索
<http://viewer.shigen.info/medakavw/crisprtool/>

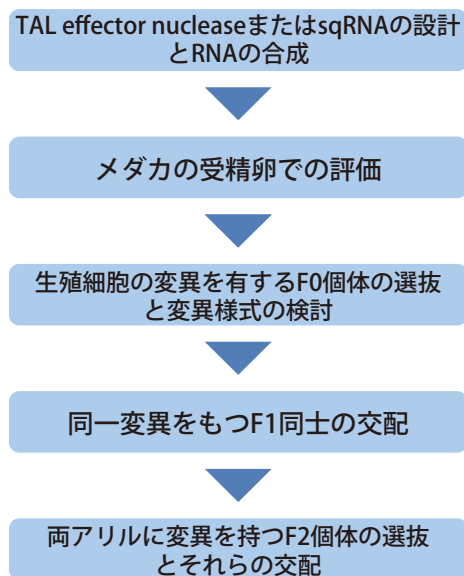


図2 ジーンターゲティングメダカ系統確立までの流れ

3. HMA による TAL effector nuclease, CRISPR/Cas を用いて変異導入した個体のチェック

同じ長さの二本鎖 DNA を電気泳動する際に、完全相補的なホモ二本鎖 DNA は分子量に依存した移動度を示します。しかしながら一部にミスマッチが起きているヘテロ二本鎖 DNA は、ミスマッチ部分における立体構造がホモ二本鎖 DNA とは異なるため泳動速度が遅くなります。

HMA はこの現象を利用して変異の有無を検出します。

変異導入後の個体において欠失 / 挿入近傍領域に対する PCR 後、PCR 産物を変性⇒再アニールすることでヘテロ二本鎖を形成させます。その後、試料の泳動パターンを MultiNA® で確認することで、鎖長差だけでは判別困難な短い欠失の有無を構造変化によって確認することができます。

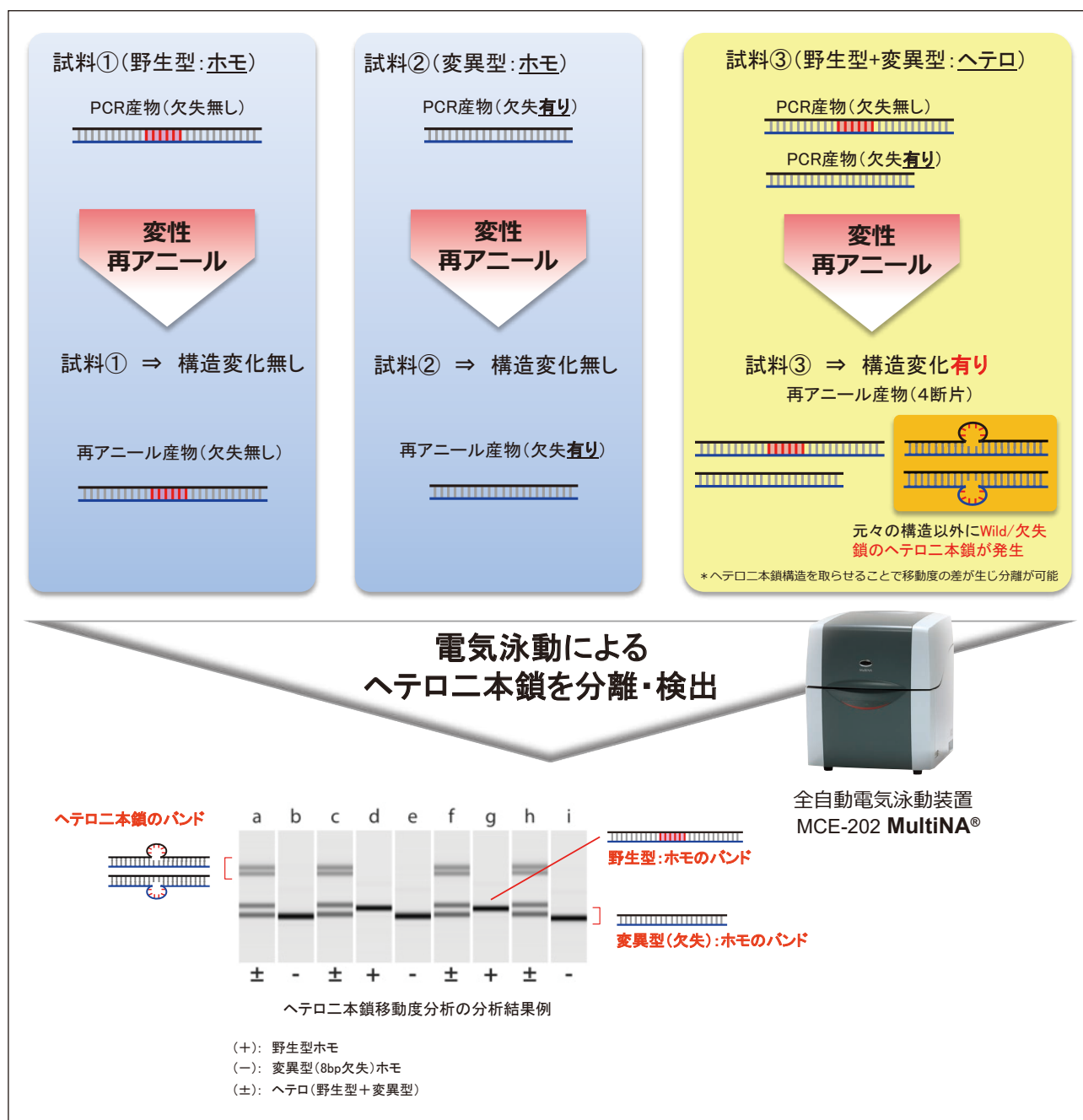


図3 HMA の原理と分析手法

4. 作製した TAL effector nuclease または RGEN のメダカ受精卵での変異導入活性の評価

マイクロインジェクション法により 1 細胞期の受精卵に TAL effector nuclease または RGEN を導入します。受精後 3 ～ 5 日の各胚をアルカリ溶液 (25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA) 中で卵膜を破壊した後、95 °C で 10 分間加熱します。等量の 40 mM Tris, pH 8.0 を加え中和し、これをテンプレートとしてターゲット部位を含む 100 ～ 250 塩基の断片を PCR により増幅します。(MultiNA® では PCR 産物を 250 塩基より小さくなるように設計した方がよい分解能で結果を得られます。)

PCR 産物を DNA-500 kit を用いて MultiNA® で分析します。TAL effector nuclease または RGEN を導入した世代では、複数のタイプの変異 (in/del) が導入されるため、多種の PCR バンドが見られます。

図 3 に同一遺伝子に対して作製した 2 種の TAL effector nuclease の結果を示します。複数のバンドが確認された場合、

その個体には変異が入っていることになります。TAL effector nuclease1, TAL effector nuclease2 を導入したいずれの胚でも全ての胚に複数のバンドが確認されました。しかしながら、TAL effector nuclease2 を導入した胚の方が、野生型 (WT) で見られるバンド (図 3 矢印) は、TAL effector nuclease1 を導入したものに比べて薄く、また、より多くのバンドが見られます。このことから、TAL effector nuclease2 の方が高い変異導入活性であることが分かります。実際にこれらの胚からの PCR 産物をサブクローニングの後、塩基配列を確認したところ、TAL effector nuclease1 導入胚では、30 %, TAL effector nuclease2 導入胚では、53 % に変異が導入されていました。また、RGEN 導入においても、TAL effector nuclease と同様に MultiNA® を用いた解析により変異の導入を評価できます。

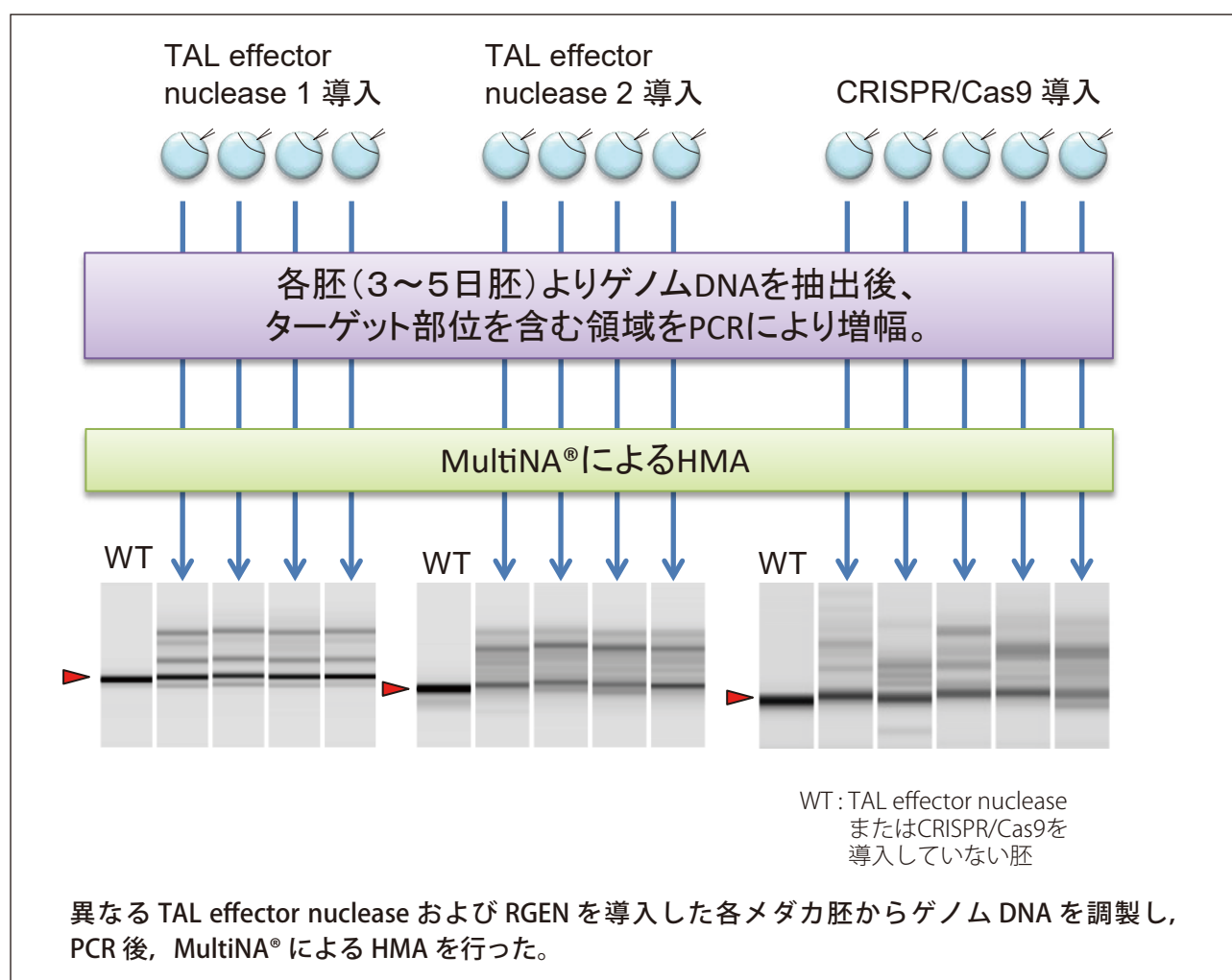


図 4 TAL effector nuclease または RGEN の変異導入活性の検討

5. 生殖細胞に変異を有する F0 個体の選抜と変異様式の検討

変異導入活性が確認された TAL effector nuclease または RGEN を導入した受精卵を培養し、成魚にまで飼育します。F0 世代での変異は、モザイク状に導入されるため（全ての細胞に導入される訳ではない）F0 個体の生殖細胞に変異が導入されたかどうか、また、どのような変異が導入されたかをまず確認します。

図 5 に示すように、TAL effector nuclease または RGEN を導入後、成熟した個体を野生型（WT）個体と交配し、受精卵（F1 世代）を得ます。これらの各胚を用いて PCR 産物を MultiNA® により HMA を行います。F0 の生殖細胞に変異が導入されている場合、野生型と交配した F1 世代では変異をヘテロ（片方のアリル）に有するため HMA で複数のバンドが観察されます。

F0 に於ける変異解析では、同一個体に複数種の変異が導入されているためバンドは多数観察されましたが、F1 個体では、変異は 1 種類であるためバンドの数は限られ、また、各変異により特有のパターンが観察されます。図 5 では、4 種類のバンドパターンが観察されます。#3 と #4 は、バンドが 1 本のみ確認されるため、これらは変異が導入されていない個体であると判断できます。一方、#1、#2 および #5 では複数のバンドが観察され、かつ、それらのパターンは胚により異なります。そしてこれらの塩基配列を解析した所、それぞれ 15 塩基、7 塩基、および 14 塩基の欠失があることが分かりました。この様に MultiNA® を用いた HMA によるパターン解析により、個体ごとの変異のタイプを区別することができます。

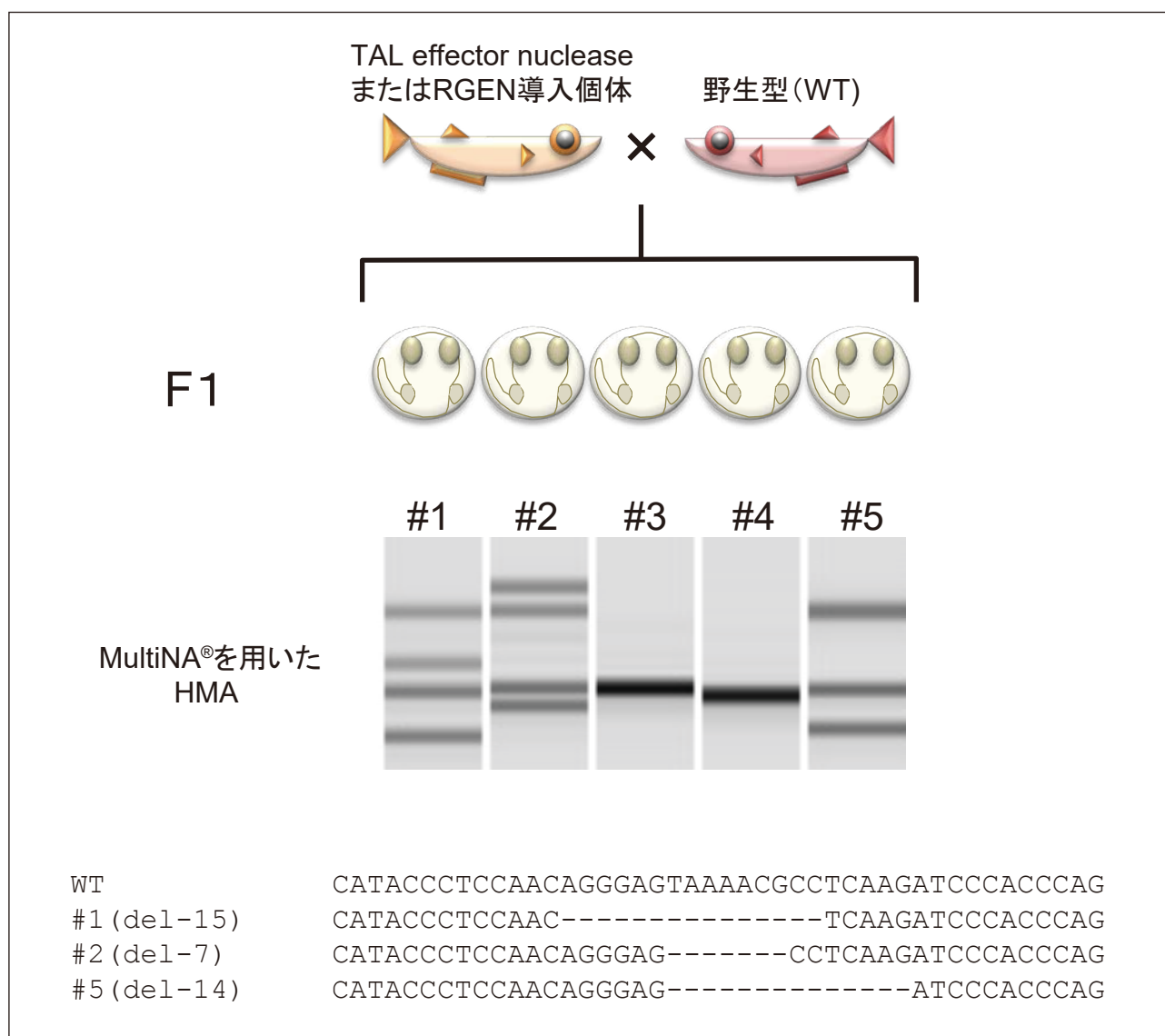


図 5 生殖細胞に変異を有する F0 個体の選抜と変異様式の検討

6. 同一変異を持つ F1 の選別と交配

前述のように F0 の生殖細胞に変異の導入が確認されたので、次に F1 個体を飼育し、各個体から尾ビレを切り取り、個体は 1 尾ずつ小さなカップで飼育を続け、切り取った各尾ビレからゲノム DNA を抽出し、前述の胚の場合と同様に MultiNA® による HMA を行います。図 6 に示すように F1 個体で複数のバンドパターンが観察されます。それらを分類すると、野生型を除いて、A, B, C, そして D の 4 パターンに分類できます。その中で、C パターンは、図 5 で示した #2 と同一のバンドパターンであることが分かります。つまり 7 塩基の欠失を持つ個体です。

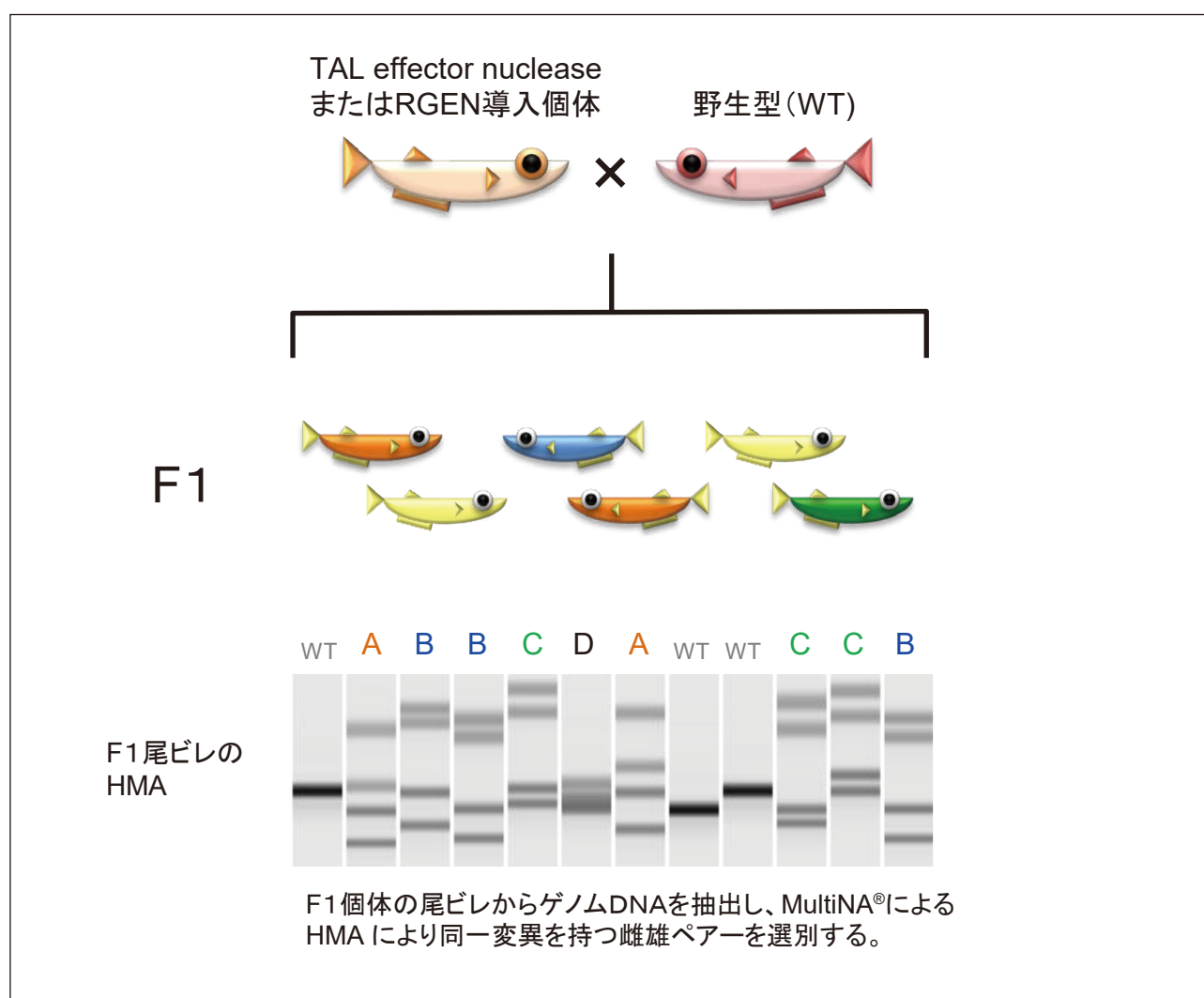


図 6 同一変異を持つ F1 の選別

7. 両アリルに変異を持つ F2 個体の選抜と変異系統の確立

変異系統を確立するために図 6 で見られた C パターンの雌雄を交配します。これら F1 の交配により、F2 世代では野生型、ヘテロ変異体、ホモ変異体 (KO 個体) が 1 : 2 : 1 の比率で出現することが予想されます。まず、これまでと同様に HMA を行います。(1st HMA) ここでは、ヘテロ変異体は複数のバンドを示し、野生型とホモ変異体と容易に区別できます。一方、野生型とホモ変異体は、共に一本のバンドを示します。変異個体の塩基の挿入や欠失が比較的大きなときは、これらのバンドは MultiNA® 上でサイズによる区別は可能です。今回の場合では変異型は 7 塩基欠失していますので、野生型のバンドよりは移動速度が速くなります。

そのためレーン 3 と 6 がホモ変異体で、レーン 2、7 と 8 が、野生型であると判断できます。しかし、変異の程度が小さかつ

たり、1 塩基の挿入や欠失であったり、どちらがホモ変異体であるのか判断に迷ってしまったりする場合があります。このような場合、また、より確実に野生型とホモ変異体を区別したい場合には、以下の様な 2 度目の HMA を行います。

一本のバンドパターンを示した PCR 産物に、別に調製しておいた野生型の PCR 産物を加え、加熱 (95 °C, 5 分) 後、緩やかに室温に戻し、リアニールさせます。これを再度、MultiNA® を用いて HMA (2nd HMA) を行くと、野生型では一本のバンドを示すのに対し (レーン 2', 7', 8'), ホモ変異体 (レーン 3', 6') では新たに形成されたヘテロデュプレックスのため複数のバンドを示します。この様に 2nd HMA を行うことにより野生型とホモ変異体を明瞭に区別することが出来ます。

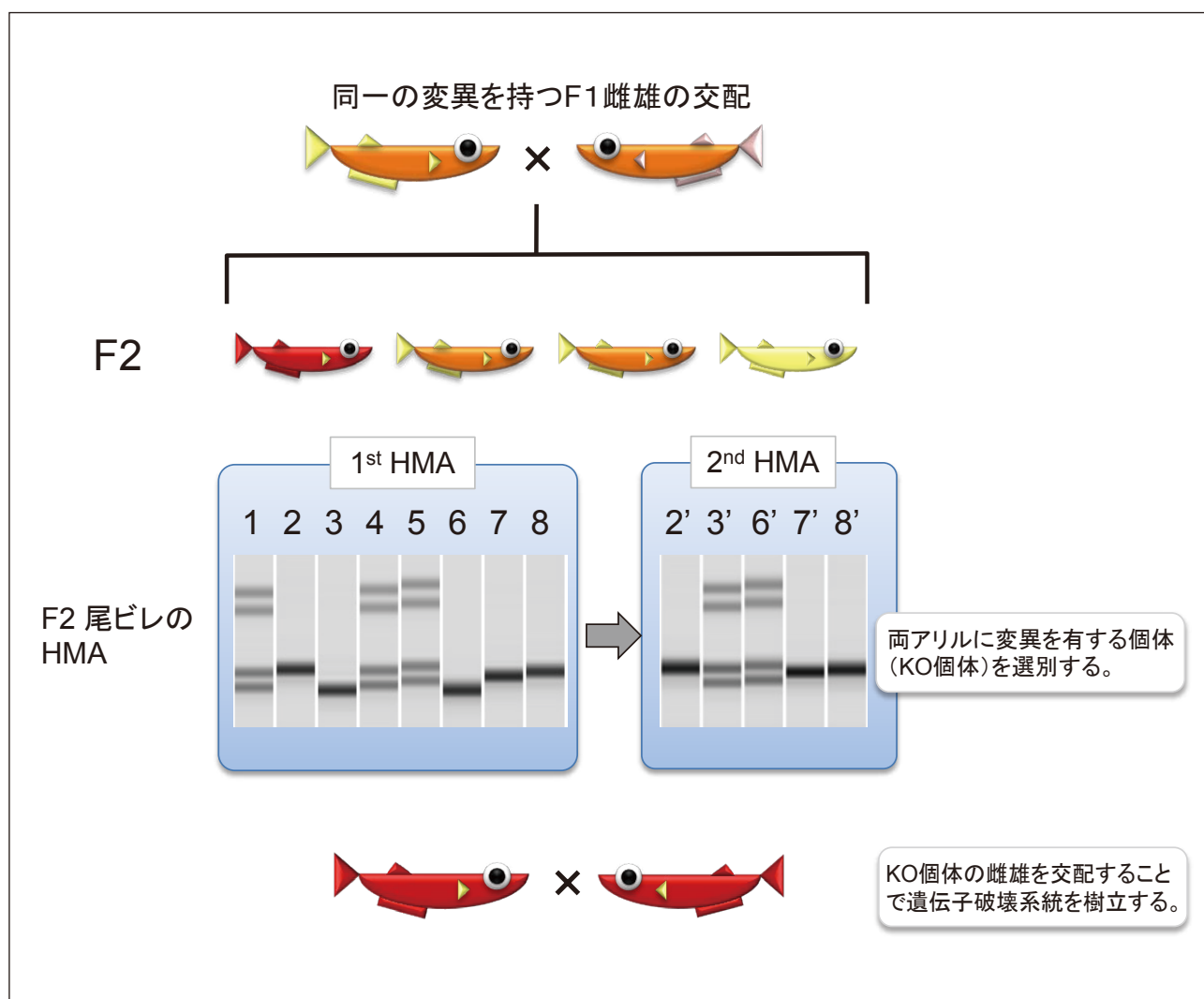


図 7 両アリルに変異を持つ F2 個体の選抜とそれらの交配による KO 系統の樹立

8. おわりに

TAL effector nuclease または RGEN を用いたジーンターゲティングは、動物、植物を問わず多くの生物での適用が可能となりました。しかし、TAL effector nuclease または RGEN 処理したものの中から目的の変異体を見つけ出すのは、手間がかかります。今回で紹介したように MultiNA® を用いることにより、その労力を大きく軽減でき、効率的かつスピーディーに変異体を得ることができます。

MultiNA® を用いる場合には PCR 産物のサイズを 250 塩基よりも小さく設計することでより良い結果を得ることができます。

PCR 産物のサイズが大きくなるとヘテロ二本鎖の分解能が低くなり、異なる変異に由来する移動度の変化が見分けにくくなってしまいます。

引用文献

- 1) Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ. Nat Biotechnol. 2011 Feb;29(2):143-8. doi: 10.1038/nbt.1755. Epub 2010 Dec 22. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing.
- 2) systems. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F, Science. 2013 Feb 15;339(6121):819-23. doi: 10.1126/science.1231143. Epub 2013 Jan 3. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas
- 3) Mali P1, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM, Science. 2013 Feb 15;339(6121):823-6. doi: 10.1126/science.1232033. Epub 2013 Jan 3. RNA-guided human genome engineering via Cas9.
- 4) 山本卓編「今すぐ始めるゲノム編集」 実験医学別冊（2014）羊土社
- 5) Ansai S, Sakuma T, Yamamoto T, Ariga H, Uemura N, Takahashi R, Kinoshita M. (2013) Efficient Targeted Mutagenesis in Medaka Using Custom-Designed Transcription Activator-Like Effector Nucleases. GENETICS, 193, 739-749.
- 6) Ansai S, Inohaya K, Yoshiura Y, Scharf M, Uemura N, Takahashi R, Kinoshita M. (2014) Design, evaluation, and screening methods for efficient targeted mutagenesis with TALENs in medaka. Develop. Growth Differ., 56, 98-107.
- 7) Ansai S and Kinoshita M. (2014) Targeted mutagenesis using CRISPR/Cas system in medaka. Biology Open, 3, 362-371.

マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 MultiNA[®] “マルチナ”

アガロースゲル電気泳動法は試薬の調合、ゲルの作成、電気泳動、結果の画像取得、後片付けと一連の作業に多くの時間と手間を要します。さらにデータに関しては感度、分離、再現性、定量性など客観性に乏しいものです。

マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA[®]” はアガロースゲル電気泳動の問題を解決します。



マイクロチップ電気泳動装置
MCE-202 “MultiNA[®]”

高い分析性能

MultiNA[®]によるマイクロチップ電気泳動分析では、アガロース電気泳動分析と比べて、より優れた分離能、感度、再現性、定量性を実現します。

最大108検体まで全自動分析

試料と試薬をセットするだけで、あとは最大108検体まで自動分析できます。分析前処理と分析泳動の並列処理により1分析あたりの時間はわずか80秒です。*

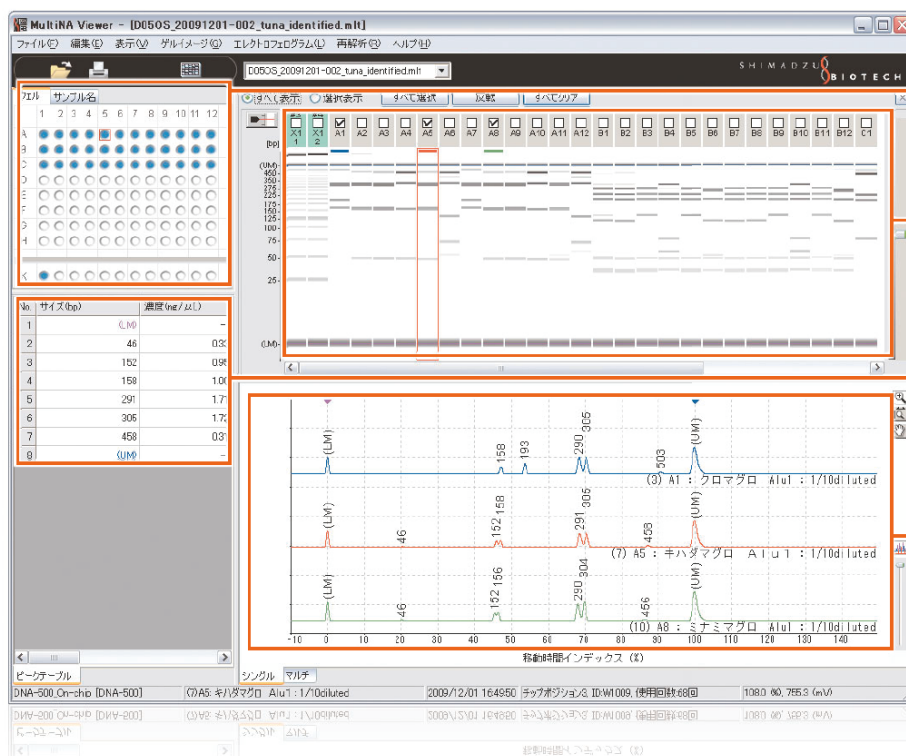
使いやすさを徹底追及

MultiNA[®]による分析操作は非常に簡便です。分析スケジュールを作成し、あとは試料と試薬をセットしてスタートボタンをクリックするだけです。

分析コストを低減

繰返し利用可能な高性能マイクロチップが安価なランニングコストを実現します。

* DNA標準分析（DNA1000キット/プレミックス）でマイクロチップを4枚使用時。ただし初期洗浄・あと洗浄の時間及び初回分析は含みません。



サンプルウェル表示
分析の進行状況で色で表示します。

ゲルイメージ
画像データ（JPG, BMP, TIF）として保存することができます。

ピークテーブル
サイズ推定値や濃度などCSVファイルとして出力することができます。

エレクトロフェログラム
画像データ（JPG, BMP, TIF）として保存することができます。

MultiNA ViewerTM の分析結果表示

■MultiNA®専用試薬キット

各分析条件に応じた試薬キットにより高い分析性能を実現します。



■マイクロチップ

すべての試薬キットに共通して使用します。

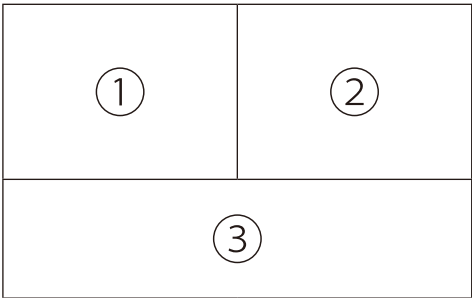


■チップクリーニングキットRA

蛍光色素やサンプルに含まれる試薬成分がマイクロチップ流路内に吸着することで分離性能を低下させ、再利用回数が少なくなることがあります。このような場合本キットでマイクロチップを洗浄することにより、吸着成分を除去し、マイクロチップの分離性能を改善（再生）します。



※ MultiNA は、株式会社島津製作所の登録商標です。
※ MultiNA Viewer は、株式会社島津製作所の商標です。



- 表紙写真
- ① 野生型の黒いメダカの5日目の胚
 - ② TAL effector nuclease をもちいて、ヒメダカの原因遺伝子を破壊した F0 胚です。黒色素の欠失具合は、F0 はモザイクのため、個体により異なります。
 - ③ ①②の胚が成長した個体です。黒い方は、野生型（TAL effector nuclease を導入していない）。白い方は、TAL effector nuclease によりヒメダカの原因遺伝子（slc45a2）が、ほぼ完全に破壊されたためヒメダカの体色になっています。（メラノフォアが形成されない）