

小型魚類を対象とした
標的ヌクレオチドの置換編集

田中 慎吾

目次

要旨	4-5
1. 序論	6-7
2. 結果	8-18
2-1. Target-AID による生体内ヌクレオチド置換編集の効果検証ストラテジー	
2-2. <i>chd</i> 遺伝子におけるヌクレオチド置換効果の検証	
2-3. <i>oep</i> 遺伝子におけるヌクレオチド置換効果の検証	
2-4. <i>chd</i> 遺伝子における挿入欠失変異効果の検証	
2-5. <i>oep</i> 遺伝子における挿入欠失変異効果の検証	
2-6. ウラシル DNA グリコシラーゼの融合による挿入欠失変異効果の促進	
2-7. AP エンドヌクレアーゼの共導入による挿入欠失変異効果の促進	
2-8. 変異体作出に適した Target-AID コンストラクトの選定	
2-9. <i>chd</i> 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有する G ₀ 世代ゼブラフィッシュの作出	
2-10. <i>oep</i> 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有する G ₀ 世代ゼブラフィッシュの作出	
2-11. <i>chd</i> 遺伝子における標的ヌクレオチドの置換変異は次世代に伝達する	
2-12. <i>oep</i> 遺伝子における標的ヌクレオチドの置換変異は次世代に伝達する	
2-13. <i>chd</i> 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有する F ₁ 世代ゼブラフィッシュの同定	
2-14. <i>oep</i> 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有する F ₁ 世代ゼブラフィッシュの同定	
2-15. <i>chd</i> 遺伝子の標的化に際する off-target 効果の検証	
2-16. <i>oep</i> 遺伝子の標的化に際する off-target 効果の検証	
2-17. <i>chd</i> 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有するホモ接合体は頭部縮小と血島拡大の表現型を示す	
2-18. <i>oep</i> 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有するホモ接合体は単眼の	

表現型を示す

2-19. *oep* 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有するホモ接合体は中胚葉マーカーの発現低下を示す

3. 考察

19–22

3-1. Target-AID による脊椎動物を対象とした標的ヌクレオチドの置換編集

3-2. ニックの形成と挿入欠失変異頻度の関係性

3-3. Target-AID による挿入欠失変異の誘導メカニズム

3-4. PAM 配列からの距離とヌクレオチド置換効率の関係性

3-5. 体細胞と生殖細胞におけるヌクレオチド置換効率の相違

3-6. Target-AID による A>C 置換の誘導

3-7. Target-AID による off-target 効果

3-8. Target-AID の遺伝子治療への応用可能性

4. 実験材料と方法

23–30

4-1. ゼブラフィッシュ

4-2. mRNA の合成

4-3. sgRNA の合成

4-4. RNA のインジェクション

4-5. 尾びれの切断

4-6. ゲノム DNA の調製

4-7. 変異アレルのクローニング

4-8. コロニーPCR 産物のシーケンシング

4-9. Heteroduplex mobility assay (HMA)

4-10. ダイレクトシーケンシングによるジェノタイピング

4-11. Allele-specific PCR によるジェノタイピング

4-12. ゼブラフィッシュ胚の表現型観察

4-13. Whole-mount *in situ* hybridization (WISH)

4-14. WISH 染色胚からのゲノム DNA の調製

4-15. Allele-specific PCR による WISH 染色胚のジェノタイピング

参考文献	31–35
謝辞	36–37
図表	38–60

要旨

CRISPR/Cas9 は標的 DNA 配列上に DNA 二本鎖切断を引き起こすことで簡便かつ高効率に DNA 配列を編集することができる画期的な技術である。その編集効果の特異性の高さから、遺伝性疾患を引き起こす異常な DNA 配列を編集し、正常な DNA 配列に修正するという遺伝子治療が可能になると期待されている。しかしながら、CRISPR/Cas9 により導入される DNA 二本鎖切断は挿入欠失変異および置換変異をランダムに引き起こすため、編集後の DNA 配列は一意には定まらない。また、DNA 二本鎖切断が細胞死や癌化を引き起こす可能性も指摘されている。これらは遺伝子治療に向けたゲノム編集技術の応用の可能性を狭める要因となっている。従って、動物個体に適用可能であり、かつ DNA 二本鎖切断を介さないゲノム編集技術の開発が望まれている。

本研究ではシトシンの脱アミノ化を介するゲノム編集技術である Target-AID をゼブラフィッシュに適用し、脊椎動物個体を対象とした標的ヌクレオチドの置換編集が可能であることを実証した。まず、2 種類の遺伝子(*chordin (chd)*, *one-eyed pinhead (oep)*)を標的遺伝子として設定し、ゼブラフィッシュ受精卵を対象とした Target-AID によるヌクレオチド置換効果の検証を行った。その結果、Target-AID は各遺伝子上の標的としたヌクレオチドを構成するシトシンをチミンに置換することが明らかになった。一方で、標的外のヌクレオチドに対する置換変異を副次的に誘導し得ることを示唆する結果も得られた。次に挿入欠失変異効果の検証を行った結果、Target-AID が標的 DNA 配列上において挿入欠失変異も誘導し得ることが明らかになった。これらの挿入欠失変異はシトシンの脱アミノ化により生じたウラシルに対する塩基除去修復の過程で生じていると推察された。そこで、DNA 上に生じたウラシルの除去を担うウラシル DNA グリコシラーゼを Target-AID と融合して発現させたところ、挿入欠失変異効果の促進が認められた。この時、ウラシルの除去により生じる脱塩基部位の切断を担う AP エンドヌクレアーゼを過剰発現させると、挿入欠失変異効果は更に促進されることが明らかになった。これらの結果は、ウラシルの除去の抑制及び脱塩基部位の切断の抑制が Target-AID による挿入欠失変異効果の抑制に繋がることを示唆している。

次に、Target-AID により引き起こされた変異の遺伝性について検証した。上

述の遺伝子に対して Target-AID によるゲノム編集を施したゼブラフィッシュと野生型ゼブラフィッシュを交配させたところ、各遺伝子上の標的ヌクレオチドを構成するシトシンがチミンに置換されたアリルを有するヘテロ接合体の子孫が得られた。さらにこれらの置換を有するヘテロ接合体同士で交配を行ったところ、得られた子孫において、各遺伝子の欠失変異体が示す既知の表現型が認められた。

以上の結果から、Target-AID は脊椎動物であるゼブラフィッシュに於いて、標的ヌクレオチドの置換編集を実現できる技術であると結論づけた。

1. 序論

ゲノム編集技術は標的とした DNA 配列に DNA 二本鎖切断を生じさせることで DNA 配列の編集を行う画期的な技術である(Christian et al., 2010; Jinek et al., 2012; Kim et al., 1996)。これらの技術はモデル動物の変異体作成に用いられるだけでなく、ヒト遺伝性疾患を根本的に治療できる可能性も秘めている(Cox et al., 2015)。実際、ゲノム編集技術を利用して非相同末端連結を介した遺伝子の破壊(Bakondi et al., 2016; Ding et al., 2014; Lin et al., 2014; Tebas et al., 2014)や遺伝子の修正(Nelson et al., 2016)、あるいは相同組み換え修復を介した遺伝子の修正(Long et al., 2014; Schwank et al., 2013; Wu et al., 2013)や遺伝子の導入(De Ravin et al., 2016)を行うことにより、遺伝性疾患の治療が可能であることがモデル動物を対象とした研究で示されてきた。しかしながら、ゲノム編集技術は DNA 二本鎖切断を生じさせるヌクレアーゼを利用した技術であるため、細胞死や癌化を引き起こす危険性が指摘されている(Nambiar and Raghavan, 2011; Rich et al., 2000)。また、DNA 二本鎖切断は挿入欠失変異および置換変異をランダムに引き起こすため、編集後の DNA 配列を一意に定めることは困難である。これらは動物個体を対象としたゲノム編集を実施する上で潜在的なリスクとなり、ゲノム編集技術の医療応用を妨げる要因となる。従って、動物個体に適用可能であり、かつ DNA 二本鎖切断を介さないゲノム編集技術の開発が望まれている。

近年、ゲノム編集技術のひとつである CRISPR/Cas9 を基盤技術として開発された DNA 二本鎖切断を介さないヌクレオチド置換編集技術(Target-AID)が報告された(Nishida et al., 2016) (Figure 1)。Target-AID によるヌクレオチド置換編集では、Cas9 の持つ 2 つのヌクレアーゼ活性を両方とも失活させた nuclease-dead Cas9 (dCas9)あるいは一方のヌクレアーゼ活性のみを失活させた nickase Cas9 (nCas9(D10A)) (Jinek et al., 2012)と、ヤツメウナギに由来する活性化誘導シトシンデアミナーゼ(PmCDA1) (Muramatsu et al., 1999)の融合タンパク質 (dCas9-PmCDA1, nCas9-PmCDA1)が用いられる。これらの融合タンパク質は single-guide RNA (sgRNA)と共に細胞内に導入されることで標的 DNA に結合する。標的 DNA に結合した融合タンパク質は特定の範囲内に位置するヌクレオチドに対して、PmCDA1 による C の脱アミノ化を引き起こす。脱アミノ化された C はウラシル(U)そのものである。DNA 複製過程あるいは nCas9 のヌクレアーゼ

活性により生じた DNA の一本鎖切断を目印としたミスマッチ修復の過程において、U を含む DNA 鎖を鋳型に相補 DNA 鎖が合成されると、グアニン(G)を塩基とするヌクレオチドが挿入されるべき位置に、アデニン(A)を塩基とするヌクレオチドが誤って挿入される。さらに、この A に対して相補 DNA が合成される事で標的ヌクレオチドの位置にチミン(T)を塩基とするヌクレオチドが挿入される。このように、Target-AID による C の脱アミノ化と細胞内での DNA の合成を介して、標的ヌクレオチドを構成する C を T に置換することが出来る。これまでに出芽酵母と哺乳動物の培養細胞において Target-AID が標的化したヌクレオチドの置換を誘導することが示されてきた(Nishida et al., 2016)。しかしながら、動物個体を対象とした Target-AID による標的ヌクレオチドの置換編集効果は実証されていない。

本研究では、脊椎動物個体に於いて、Target-AID による標的ヌクレオチドの置換編集が可能であることを実証した。Target-AID のヌクレオチド置換効果を導入個体で検証するだけでなく、置換されたヌクレオチドの遺伝性も検証するために、i) 遺伝子導入が容易であり、ii) 世代時間が約 50 日と短いという理由から、脊椎動物のモデル生物としてゼブラフィッシュを選択した。誘導された置換変異の遺伝性の有無を明確に示すために、変異体の表現型が既知である *chordin (chd)* 遺伝子と *one-eyed pinhead (oep)* 遺伝子上に未成熟終止コドンをもつ点突然変異体の作出を目指した。置換変異が誘導されると未成熟終止コドンが生じるようなヌクレオチドを標的化するために、適当な sgRNA を合成した。dCas9-PmCDA1 あるいは nCas9-PmCDA1 をコードした mRNA を sgRNA と共にゼブラフィッシュ受精卵に導入し、期待される変異が導入されるかどうかを検証した。また、それらの変異が安定的に継承されるかどうかを 3 世代にわたって解析した。

2. 結果

2-1. Target-AID による生体内ヌクレオチド置換編集の効果検証ストラテジ

ゼブラフィッシュ生体内での Target-AID の効果を検証するために pCS2+発現ベクターを構築し(pCS2+ dCas9-PmCDA1, pCS2+ nCas9-PmCDA1)、dCas9-PmCDA1 mRNA と nCas9-PmCDA1 mRNA の *in vitro* 合成を行った。変異体の表現型が、劣性で既知であるという理由から、Target-AID の標的遺伝子として *chd* 遺伝子と *oep* 遺伝子を選択した。Target-AID は protospacer adjacent motif (PAM)配列(5'-NGG for *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9)) (Jinek et al., 2012)を基準として、16 ヌクレオチド上流の位置から 20 ヌクレオチド上流の位置までの 5 ヌクレオチドの範囲内に位置するヌクレオチド上の C を脱アミノ化することが知られている(Nishida et al., 2016)。本研究では、この範囲内に位置し、かつ C の脱アミノ化によりヌクレオチドの置換が生じると未成熟終止コドンとなるようなヌクレオチドを検索した。*chd* 遺伝子においてはコード配列中の 232 番目にあたる C (c.232C)を塩基とするヌクレオチドを標的として選択した(Figure 2)。*oep* 遺伝子においてはコード配列中の 178 番目にあたる C (c.178C)を塩基とするヌクレオチドを標的として選択した(Figure 3)。これらの標的ヌクレオチドに対して pDR274 発現ベクターを構築し(pDR274 *chd* sgRNA, pDR274 *oep* sgRNA)、*chd* sgRNA と *oep* sgRNA をそれぞれ *in vitro* で合成した。

2-2. *chd* 遺伝子におけるヌクレオチド置換効果の検証

Target-AID 導入胚において *chd* 遺伝子上の標的ヌクレオチドの置換効果を検証するために、ゼブラフィッシュ受精卵に dCas9-PmCDA1 mRNA もしくは nCas9-PmCDA1 mRNA を *chd* sgRNA と共にマイクロインジェクション法により導入した。これらの受精卵を受精後 3 日目まで育成したのち、各条件から 5 個体ずつ個別にゲノム DNA の調製を行った。調製したゲノム DNA を鋳型に標的 DNA 配列を PCR で増幅した。増幅産物をクローニングしたプラスミド (pBluescript II KS (+))をコンピテントセルに導入し、アンピシリン含有寒天培地上で大腸菌コロニーを形成させた。ゼブラフィッシュの個体毎に 20 個程度の大腸菌コロニーに対して標的 DNA 配列の解析を行い、標的ヌクレオチドの置換効

率を検証した。未導入胚では 105 個の大腸菌コロニーに対する解析において標的ヌクレオチドの位置に T は検出されなかったものの、PAM 配列上において、A を塩基とする標的外のヌクレオチドの位置に G が検出された(Figure 4A)。PCR 増幅時には一定頻度で置換変異を導入してしまうことから、この置換変異はゼブラフィッシュゲノム DNA に対する PCR 増幅時に生じたものである可能性が考えられる。dCas9-PmCDA 導入胚では、101 個の大腸菌コロニーに対する解析の結果、5.9%の頻度で C を塩基とする標的ヌクレオチドの位置に T が検出された(c.232C>T) (Figure 4B)。一方で、標的外のヌクレオチドの位置においても置換変異(G>A, A>G)が検出された(Figure 4B)。nCas9-PmCDA1 導入胚では 96 個の大腸菌コロニーに対する解析の結果、3 個の大腸菌コロニーで挿入欠失変異が検出された(3.1%)。残りの 93 個の大腸菌コロニーに対する解析の結果、3.2%の頻度で C を塩基とする標的ヌクレオチドの位置に T が検出された(c.232C>T) (Figure 4C)。dCas9-PmCDA1 導入胚と同様に、標的外のヌクレオチドの位置においても、置換変異(G>A, A>G, C>T)が検出された(Figure 4C)。

2-3. *oep* 遺伝子におけるヌクレオチド置換効果の検証

次に、同様の手順で *oep* 遺伝子上の標的ヌクレオチドの置換効果を検証した。未導入胚では 113 個の大腸菌コロニーに対する解析において標的ヌクレオチドの位置に T は検出されなかったものの、A を塩基とする標的外のヌクレオチドの位置に G が検出された(Figure 5A)。この置換変異も、ゼブラフィッシュゲノム DNA に対する PCR 増幅時に生じたものである可能性が考えられる。dCas9-PmCDA1 導入胚では、113 個の大腸菌コロニーに対する解析の結果、1.8%の頻度で C を塩基とする標的ヌクレオチドの位置に T が検出された(c.178C>T) (Figure 5B)。一方で、標的外のヌクレオチドの位置においても、置換変異(G>A, A>G, C>T)が検出された(Figure 5B)。nCas9-PmCDA1 導入胚では、114 個の大腸菌コロニーに対する解析の結果、1 個の大腸菌コロニーで挿入欠失変異が検出された(0.9%)。残りの 113 個の大腸菌コロニーに対する解析の結果、標的外のヌクレオチドの位置において置換変異(A>G)が検出されたものの、標的ヌクレオチドの位置に T は検出されなかった(Figure 5C)。

2-4. *chd* 遺伝子における挿入欠失変異効果の検証

一般的に脱アミノ化された C は細胞内の DNA 修復機構のひとつである塩基除

去修復により修復されると考えられている(Figure 6)。Target-AIDにより脱アミノ化されたCの修復過程で生じるDNA切断と、自然発生的に生じる反対鎖のDNA切断等によりDNA二本鎖切断が引き起こされた場合、Target-AID導入胚で想定外の挿入欠失変異が生じる可能性がある。そこでTarget-AIDが*chd*遺伝子上の標的ヌクレオチド周辺配列に挿入欠失変異を引き起こしたかどうかを明らかにするために、Target-AID導入胚に対して、挿入欠失変異を検出できるHeteroduplex mobility assay (HMA)を行った(Figure 7)。標的遺伝子上に数bp程度の挿入欠失変異が生じた変異アリルと野生型アリルが混在するモザイク個体に対して、これらのアリルをPCRにより増幅すると、長さの異なる増幅産物同士でミスマッチが起きているヘテロ二本鎖DNA(ヘテロデュプレックス)が生じる。ヘテロデュプレックスはミスマッチが起きていない野生型のホモ二本鎖DNA(ホモデュプレックス)と比較して電気泳動での移動度が異なるため、数bp程度の挿入欠失変異を電気泳動により検出できる。また、数十bp程度の比較的大きな挿入欠失変異が生じたホモデュプレックスも、野生型のホモデュプレックスと比較して電気泳動での移動度が異なる。従って、これらの挿入欠失変異も電気泳動により検出される。dCas9-PmCDA1導入胚においては、解析した16個体のうち1個体で、未導入胚のDNAバンドと比較して移動度が異なるDNAバンドが検出された(Figure 8A)。一方でnCas9-PmCDA1導入胚においては、解析した16個体のうち8個体で、未導入胚のDNAバンドと比較して移動度が異なるDNAバンドが検出された(Figure 8B)。ポジティブコントロールとして解析したCas9導入胚においては16個体のうち12個体で、未導入胚のDNAバンドと比較して移動度が異なるDNAバンドが検出された(Figure 8C)。以上の結果は、dCas9-PmCDA1とnCas9-PmCDA1はいずれも*chd*遺伝子上の標的DNA配列において挿入欠失変異を引き起こし得るが、nCas9-PmCDA1はdCas9-PmCDA1より高頻度に挿入欠失変異を引き起こしたことを示している。

2-5. *oep* 遺伝子における挿入欠失変異効果の検証

次に、*oep* 遺伝子上の標的ヌクレオチド周辺配列に挿入欠失変異が引き起こされたかどうかをHMAにより検証した。dCas9-PmCDA1導入胚においては、解析した16個体のうち2個体で、未導入胚のDNAバンドと比較して移動度が異なるDNAバンドが検出された(Figure 9A)。一方でnCas9-PmCDA1導入胚においては、解析した16個体のうち4個体で、未導入胚のDNAバンドと比較して移動

度が異なる DNA バンドが検出された(Figure 9B)。ポジティブコントロールとして解析した Cas9 導入胚においては 16 個体のうち 13 個体で、未導入胚の DNA バンドと比較して移動度が異なる DNA バンドが検出された(Figure 9C)。以上の結果は、上記の結果と同様に、dCas9-PmCDA1 と nCas9-PmCDA1 はいずれも *oep* 遺伝子上の標的 DNA 配列において挿入欠失変異を引き起こし得るが、nCas9-PmCDA1 は dCas9-PmCDA1 より高頻度に挿入欠失変異を引き起こしたことを示している。

2-6. ウラシル DNA グリコシラーゼの融合による挿入欠失変異効果の促進

ヌクレオチド置換編集に際して挿入欠失変異が生じることは酵母や培養細胞の研究でも示されてきた(Nishida et al., 2016)。これらの挿入欠失変異は脱アミノ化された C の修復過程で生じると想定されている。実際、ウラシル DNA グリコシラーゼのインヒビター(Uracil DNA glycosylase inhibitor (UGI))を Target-AID に付加することで、Target-AID による挿入欠失変異効果が抑制されることが報告されている(Nishida et al., 2016)。しかしながら Target-AID により DNA 上に生じた U の積極的な除去が脱アミノ化を発端とする挿入欠失変異効果に影響を与えるかどうかは検証されていない。これを検証するために、dCas9-PmCDA1 および nCas9-PmCDA1 にゼブラフィッシュ由来のウラシル DNA グリコシラーゼ(Unga)を付加した融合タンパク質(dCas9-PmCDA1-Unga, nCas9-PmCDA1-Unga)を作成した。この融合タンパク質がコードされた mRNA を *oep* sgRNA と共にゼブラフィッシュ受精卵に導入し、受精後 3 日目まで育成した胚に対して HMA を行った。dCas9-PmCDA1 導入胚では、未導入胚の DNA バンドと比較して移動度が異なる DNA バンドは検出されなかったが、dCas9-PmCDA1-Unga 導入胚では検出された(Figure 10A)。一方で、nCas9-PmCDA1-Unga 導入胚では nCas9-PmCDA1 導入胚と比較してより多数の DNA バンドが検出された(Figure 11B)。これらの結果は、U の除去が脱アミノ化を発端とする挿入欠失変異効果を促進することを示している。また、これらの結果は、Target-AID の脱アミノ化により生じた U は細胞内でただちに除去されるわけではなく、ウラシル DNA グリコシラーゼにより除去されるまで DNA 上に維持されていることを示唆している。

2-7. AP エンドヌクレアーゼの共導入による挿入欠失変異効果の促進

DNA 上に生じた U が除去されると脱塩基部位(apurinic/apyrimidinic サイト(AP サイト))が形成される。AP サイトは AP エンドヌクレアーゼ(APEX1)により切断されて DNA 一本鎖切断を生じることが知られているが、Target-AID により生じた AP サイトを積極的に切断することが挿入欠失変異効果に影響を与えるかどうかは検証されていない。これを検証するために、ゼブラフィッシュ由来の APEX1 の pCS2+発現ベクターを構築し、これをコードする mRNA を *in vitro* で合成した。dCas9-PmCDA1-Unga mRNA と *oep* sgRNA のみを導入した胚と比較して、APEX1 mRNA の共導入により APEX1 を過剰発現させた胚では、未導入胚の DNA バンドとは移動度が異なる DNA バンドのシグナル強度が高くなる傾向が認められた(Figure 11A)。一方で、nCas9-PmCDA1-Unga mRNA と *oep* sgRNA のみを導入した胚と比較して、APEX1 を過剰発現させた胚では、未導入胚の DNA バンドとは移動度が異なる DNA バンドのシグナル強度が高くなる傾向が認められた(Figure 11B)。以上の結果は Target-AID による脱アミノ化を発端として形成された AP サイトの切断が挿入欠失変異を促進しうることを示している。また、この結果は、Target-AID により形成された AP サイトは細胞内でただちに切断されるわけではなく、APEX1 により切断されるまで DNA 上に維持されていることを示唆している。さらに、AP サイトを DNA 上に維持しておく方が挿入欠失変異を引き起こしにくいと予想されるため、AP サイトの切断の抑制が挿入欠失変異の頻度を減少させる可能性を示唆している。

2-8. 変異体作出に適した Target-AID コンストラクトの選定

クローニングした変異アリの解析により、標的外ヌクレオチドの置換や挿入欠失変異などの副次的な変異が生じる可能性が示唆されたものの、Target-AID が脊椎動物であるゼブラフィッシュの生体内で標的ヌクレオチドの置換を誘導可能である事が示された。また、HMA 解析により、nCas9-PmCDA1 が dCas9-PmCDA1 より高頻度に挿入欠失変異を引き起こすことが示された。標的ヌクレオチドの置換変異を有するゼブラフィッシュ変異体の作出に nCas9-PmCDA1 を用いる場合、不要な挿入欠失変異の増加が予想される。従って、以下に記述するゼブラフィッシュ変異体の作出には dCas9-PmCDA1 を用いた。

2-9. *chd* 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有する G₀ 世代ゼブラフィ

ツシユの作出

chd 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有する G₀ 世代ゼブラフィッシュを作出するために、dCas9-PmCDA1 mRNA と *chd* sgRNA をゼブラフィッシュ受精卵に導入し、これらの受精卵を成魚まで育成した。以下、これらの成魚を *chd* G₀ fish と記載する。*chd* G₀ fish が、c.232C>T が生じたヌクレオチドを有するかどうかを簡易的に検証するために、*chd* G₀ fish の尾びれに由来するゲノム DNA を鋳型に標的 DNA 配列を PCR により増幅し、この増幅産物に対してダイレクトシーケンシングを行った(Figure 12)。ヌクレオチドの置換は、ダイレクトシーケンシングにより得られた波形データにおいて、メインのピークの直下に現れる小さなピークとして検出された。*chd* G₀ fish では 2 種類の波形パターンが得られた。3 個体の *chd* G₀ fish から得られた波形データには、野生型の波形パターンとの間に顕著な相違は認められなかった。一方で、2 個体の *chd* G₀ fish から得られた波形データには、c.232C におけるメインの C のピークの直下に小さな T のピークが認められた。

2-10. *oep* 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有する G₀ 世代ゼブラフィッシュの作出

oep 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有する G₀ 世代ゼブラフィッシュを作出するために、dCas9-PmCDA1 mRNA を *oep* sgRNA と共にゼブラフィッシュ受精卵に導入し、これらの受精卵を成魚まで育成した。以下、これらの成魚を *oep* G₀ fish と記載する。*chd* G₀ fish の解析と同様に、*oep* G₀ fish のゲノム DNA を鋳型に標的 DNA 配列を PCR により増幅し、この増幅産物に対してダイレクトシーケンシングを行った(Figure 13)。5 個体の *oep* G₀ fish の内、1 個体の *oep* G₀ fish から得られた波形データには、野生型の波形データとの間に顕著な相違は認められなかった(Figure 13 の i)。一方で、残る 4 個体の波形データでは、野生型の波形データとの間に相違が認められた(Figure 13 の ii-v)。波形パターン ii では、c.175C の直下に小さな T のピークが認められた。波形パターン iii では、c.178C の直下に小さな T のピークが認められた。波形パターン iv では、c.175C と c.178C の両方のピークの直下に小さな T のピークが認められた。波形パターン v では、c.175C と c.178C の両方のピークの直下に T のピークが認められた他、c.175C を境にピークのずれが認められた。このことは、少なくとも 1 種類以上の挿入欠失変異が標的 DNA 配列上に生じた事を示している。

2-11. *chd* 遺伝子における標的ヌクレオチドの置換変異は次世代に伝達する

次に、Target-AID が *chd* 遺伝子に誘導した標的ヌクレオチドの置換変異が次世代に伝達するかどうかを検証した。野生型ゼブラフィッシュと *chd* G₀ fish を 1 個体ずつ交配させ、それぞれの子孫を得た。以下、これらの胚を *chd* F₁ embryo とする。3 個体の *chd* G₀ fish から *chd* F₁ embryo が得られた。*chd* F₁ embryo からゲノム DNA を抽出し、標的 DNA 配列に対するダイレクトシーケンシングを行った(Figure 14)。ダイレクトシーケンシングにより得られた波形データにおいて、ヌクレオチドの置換は重複したピークとして検出された。34 個体の *chd* F₁ embryo を解析した結果、10 個体において C と T のピークが c.232C の位置で重複していた。その他の重複したピークは検出されなかった。これらの結果は、Target-AID が *chd* 遺伝子に誘導した標的ヌクレオチドの置換変異が次世代に伝達することを示している。

2-12. *oep* 遺伝子における標的ヌクレオチドの置換変異は次世代に伝達する

Target-AID が *oep* 遺伝子に誘導した標的ヌクレオチドの置換変異が次世代に伝達するかどうかを検証するために、上記と同様に、野生型ゼブラフィッシュと *oep* G₀ fish を 1 個体ずつ交配させ、それぞれの子孫を得た。以下、これらの胚を *oep* F₁ embryo とする。4 個体の *oep* G₀ fish から *oep* F₁ embryo が得られた。*oep* F₁ embryo からゲノム DNA を抽出し、標的 DNA 配列に対するダイレクトシーケンシングを行った(Figure 15)。49 個体の *oep* F₁ embryo を解析した結果、6 個体において C と T のピークが c.175C の位置で重複していた。また、1 個体において C と T のピークが c.178C の位置で重複しており、4 個体において C と T のピークが c.175C と c.178C の両方において重複していた。一方で、c.178C を境にピークのずれが認められる波形データも得られた。さらに、c.173A において A と C のピークが重複しているという想定外の波形データも得られた。これらの結果は、Target-AID が *oep* 遺伝子に誘導した標的ヌクレオチドの置換変異が次世代に伝達することを示している。一方で、標的外のヌクレオチドの置換変異および挿入欠失変異も次世代に伝達しうることを示している。

2-13. *chd* 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有する F₁ 世代ゼブラフィッシュの同定

chd 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異が生じたアリルを有する F₁ 世代ゼ

ブラフィッシュの成魚を同定するために、成魚まで育成した *chd* F₁ embryo (*chd* F₁ fish) に対して、以下の解析を行った。まず、2種類のプライマーセットを用いて Allele-specific PCR を行い、*chd* F₁ fish をスクリーニングした。一方のプライマーセットは *chd_wF* と *chd_wR* で構成され、野生型のアリルを特異的に増幅する(Figure 16A)。このプライマーセットを Figure 16 において”w”と表記した。もう一方のプライマーセットは *chd_mF* と *chd_wR* で構成され、c.232C>T が生じたヌクレオチドを有するアリルを特異的に増幅する(Figure 16A)。このプライマーセットを Figure 16 において”m”と表記した。いずれのプライマーセットも 203 bp の PCR 産物が生じるように設計されている(Figure 16A, B)。また、これらのプライマーセットによる増幅はそれぞれ独立した反応系で行われた。*chd_wF* と *chd_wR* のプライマーセットでのみ増幅が見られた場合には、該当した *chd* F₁ fish を c.232C>T が生じたアリルを有さない成魚と判定した(”negative”と分類)。両方のプライマーセットで増幅が見られた場合には、該当した *chd* F₁ fish を c.232C>T が生じたアリルを有したヘテロ接合体の成魚と判定した(”positive”と分類)。51 個体の *chd* F₁ fish の解析の結果、39 個体が”negative”、12 個体が”positive”に分類された(Figure 16C)。”positive”に分類された 12 個体の *chd* F₁ fish に対してダイレクトシーケンシングを行ったところ、12 個体全てが c.232C>T を有するヘテロ接合体(*chd*^{c.232C>T/+})であった(Figure 16D)。

2-14. *oep* 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有する F₁ 世代ゼブラフィッシュの同定

同様に、*oep* 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異が生じたアリルを有する F₁ 世代ゼブラフィッシュの成魚を同定するために、成魚まで育成した *oep* F₁ embryo (*oep* F₁ fish) に対して、以下の解析を行った。まず、2種類のプライマーセットを用いて Allele-specific PCR を行い、*oep* F₁ fish をスクリーニングした。Allele-specific PCR に際して2種類の allele-specific なプライマーセットを用いた。一方のプライマーセットは *oep_wF* と *oep_wR* で構成され、野生型のアリルを特異的に増幅する(Figure 17A)。このプライマーセットを Figure 17 において”w”と表記した。もう一方のプライマーセットは *oep_wF* と *oep_mR* で構成され、c.178C>T が生じたヌクレオチドを有するアリルを特異的に増幅する(Figure 17A)。このプライマーセットを Figure 17 において”m”と表記した。いずれのプライマーセットも 183 bp の PCR 産物が生じるように設計されている(Figure 17A,

B)。また、これらのプライマーセットによる増幅はそれぞれ独立した反応系で行われた。*oep_wF* と *oep_mR* のプライマーセットでのみ増幅が見られた場合には、該当した *oep* F₁ fish を c.178C>T が生じたヌクレオチドを有さない成魚と判定した(”negative”と分類)。両方のプライマーセットで増幅が見られた場合には、該当した *oep* F₁ fish を c.178C>T が生じたヌクレオチドを有したヘテロ接合体の成魚と判定した(”positive”と分類)。163 個体の *oep* F₁ fish の解析の結果、147 個体が”negative”、16 個体が”positive”に分類された(Figure 17C)。”positive”に分類された 16 個体の *oep* F₁ fish に対してダイレクトシーケンシングを行ったところ、12 個体が c.175C>T と c.178C>T が生じたヌクレオチドを有するヘテロ接合体 (*oep*^{c.175C>T; c.178C>T/+}) であり、残る 4 個体は c.178C>T が生じたヌクレオチドを有するヘテロ接合体(*oep*^{c.178C>T/+})であった(Figure 17D)。

2-15. *chd* 遺伝子の標的化に際する off-target 効果の検証

Target-AID は、標的 DNA 配列と類似した DNA 配列(off-target site)にも変異を誘導してしまう可能性がある(off-target 効果)。*chd* 遺伝子に対する off-target 効果を検証するために、*chd* F₁ fish を対象として、潜在的な off-target sites を CCTop software (Stemmer et al., 2015)で検索し、sgRNA との相補性の指標とされる off-target mismatch score が高いと判定された 3 種類の潜在的な off-target sites を解析対象として選択し、ダイレクトシーケンシングを行った。各 off-target site に対して 48 個体の *chd* F₁ fish を解析した結果、全ての off-target sites において変異は検出されなかった(Figure 18)。これらの結果は、今回の *chd* sgRNA との相補性が高い DNA 配列に対して、Target-AID が off-target 効果を生じさせなかった事を示している。

2-16. *oep* 遺伝子の標的化に際する off-target 効果の検証

oep 遺伝子に対する off-target 効果を検証するために、*oep* F₁ fish を対象として、上記と同様の実験を行った。この実験では、off-target mismatch score が高いと判定された 2 種類の潜在的な off-target sites を解析対象として選択した。各 off-target site に対して 48 個体の *oep* F₁ fish を解析した結果、全ての off-target sites において変異は検出されなかった(Figure 19)。これらの結果と上記の結果を併せて、dCas9-PmCDA1 を用いた Target-AID は、off-target 効果を生じさせ難いと推定した。

2-17. *chd* 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有するホモ接合体は頭部縮小と血島拡大の表現型を示す

標的ヌクレオチド上に c.232C>T が生じることにより、*chd* 遺伝子上に未成熟終止コドンが作出される。ゼブラフィッシュの *chd* 遺伝子欠失変異体は頭部の縮小と血島の拡大の表現型を示すことが報告されている(Hammerschmidt et al., 1996)ため、c.232C>T が生じたヌクレオチドを有するホモ接合体が *chd* 遺伝子欠失変異体に特徴的なこれらの表現型を示すかどうかを検証した。同定した *chd*^{c.232C>T/+} の雌雄ペアを交配させて、F₂ 世代のゼブラフィッシュ胚(*chd* F₂ embryo)を得た。交配実験の結果、28.4% (61/215)の *chd* F₂ embryo で頭部の縮小と血島の拡大が引き起こされた(Figure 20B)。*chd* F₂ embryo に対するダイレクトシーケンシングの結果、このような表現型を呈する *chd* F₂ embryo は、全て c.232C>T が生じたヌクレオチドを有するホモ接合体(*chd*^{c.232C>T/c.232C>T})であった(Figure 20C)。以上の結果から、*chd*^{c.232C>T/c.232C>T} は頭部縮小と血島拡大の表現型を示すことが明らかになった。以上の *chd* 遺伝子に対する解析から、Target-AID を用いて *chd* 遺伝子上の標的ヌクレオチドを人為的に置換し、未成熟終止コドンを有する点突然変異体を作成することに成功したと結論づけた。

2-18. *oep* 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有するホモ接合体は単眼の表現型を示す

標的ヌクレオチド上に c.178C>T が生じることにより、*oep* 遺伝子上に未成熟終止コドンが作出される。ゼブラフィッシュの *oep* 遺伝子欠失変異体は単眼の表現型を示すことが報告されている(Schier et al., 1997)ため、c.178C>T が生じたヌクレオチドを有するホモ接合体が *oep* 遺伝子欠失変異体に特徴的な単眼の表現型を示すかどうかを検証した。同定した *oep*^{c.178C>T/+} の雌雄ペアを交配させて、F₂ 世代のゼブラフィッシュ胚(*oep* F₂ embryo)を得た。交配実験の結果、21.6% (68/315)の *oep* F₂ embryo が単眼の表現型を示した(Figure 21B, D)。*oep* F₂ embryo に対するダイレクトシーケンシングの結果、単眼の表現型を呈する *oep* F₂ embryo は、全て c.178C>T が生じたヌクレオチドを有するホモ接合体(*oep*^{c.178C>T/c.178C>T})であった(Figure 21E)。以上の結果から、*oep*^{c.178C>T/c.178C>T} は単眼の表現型を示すことが明らかになった。

2-19. *oep* 遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有するホモ接合体は中胚

葉マーカーの発現低下を示す

ゼブラフィッシュの *oep* 遺伝子欠失変異体は中胚葉マーカーの発現低下を示すことも報告されている(Schier et al., 1997)。c.178C>T が生じたヌクレオチドを有するホモ接合体が *oep* 遺伝子欠失変異体に特徴的な表現型を示すかどうかを分子の視点から明らかにするために、中胚葉の分子マーカーとして知られる *gooseoid (gsc)* と *hatching gland 1 (hgg1)* に対する RNA プロブを用いて whole-mount *in situ* hybridization (WISH) を行った。WISH 解析の結果、*oep*^{c.178C>T/c.178C>T} では shield 期における *gsc* の発現が低下していることが明らかになった(Figure 22B)。一方で、tailbud 期における *hgg1* の発現も低下していることが明らかになった(Figure 22D)。以上の結果から、*oep*^{c.178C>T/c.178C>T} は中胚葉マーカーの発現低下を示すことが明らかになった。以上の *oep* 遺伝子に対する解析から、Target-AID を用いて *oep* 遺伝子上の標的ヌクレオチドを人為的に置換し、未成熟終止コドンをもつ点突然変異体を作成することに成功したと結論づけた。

3. 考察

3-1. Target-AID による脊椎動物を対象とした標的ヌクレオチドの置換編集

先行研究において、Target-AID および Base editor は酵母と哺乳動物の培養細胞において標的ヌクレオチドの置換を誘導することが示されていた(Komor et al., 2016; Nishida et al., 2016)。Target-AID は CRISPR/Cas9 を基に開発された技術である(Nishida et al., 2016)。CRISPR/Cas9 は無脊椎動物だけでなく、脊椎動物に対しても DNA 二本鎖切断を介した標的遺伝子の編集を可能にする(Ansai and Kinoshita, 2014; Blitz et al., 2013; Friedland et al., 2013; Gratz et al., 2013; Nakayama et al., 2013; Shen et al., 2013; Wang et al., 2013)。従って、Target-AID は C の脱アミノ化を介した脊椎動物におけるヌクレオチド置換編集を実現させる可能性がある。実際、本研究では Target-AID がゼブラフィッシュ生体内における標的ヌクレオチドの置換編集を実現する技術であることを示した。さらに、2 種類の遺伝子上に未成熟終止コドンを導入してゼブラフィッシュの点突然変異体を作成することに世界で初めて成功した(Figure 20–22)。

3-2. ニックの形成と挿入欠失変異頻度の関係性

本研究では Target-AID を構成する 2 種類のコンストラクト(dCas9-PmCDA1, nCas9-PmCDA1)のゲノム編集効果をゼブラフィッシュにおいて検証した。Target-AID に関する先行研究において、C の脱アミノ化が生じない側の DNA 鎖に切れ目(ニック)を生じさせることで標的ヌクレオチドにおける置換変異の効率を向上させることが示されていた(Nishida et al., 2016)。しかしながら本研究ではニックを生じさせる nCas9-PmCDA1 を用いることで標的ヌクレオチドにおける置換変異の効率が向上するという結果は得られなかった(Figure 4, 5)。一方で、ニックを生じさせることにより挿入欠失変異の頻度が上昇するという結果が得られた(Figure 4, 5, 8, 9)。実際、nCas9 を基に開発された Base Editor による標的ヌクレオチドの置換編集においても挿入欠失変異が生じることが確認されている(Zhang et al., 2017)。これらの結果は、ニックを生じさせない dCas9-PmCDA1 を用いることにより、想定外の挿入欠失変異が少ない標的ヌクレオチドの置換編集が可能になることを示唆している。

3-3. Target-AID による挿入欠失変異の誘導メカニズム

本研究では nuclease-dead Cas9 あるいは nickase Cas9 を用いているにも関わらず、標的配列近傍に挿入欠失変異が認められた(Figure 4, 5, 8, 9, 13, 15)。これらの挿入欠失変異は脱アミノ化された C が塩基除去修復される過程で生じる DNA 切断に起因するものである可能性がある。実際、塩基除去修復の過程で U を除去するウラシル DNA グリコシラーゼに対するインヒビターを Target-AID に付加することで、挿入欠失変異の頻度が減少するという報告がある(Nishida et al., 2016)。本研究では、ウラシル DNA グリコシラーゼを Target-AID と融合して U の除去を促進した場合に、挿入欠失変異の頻度が増加することを示す結果が得られた(Figure 10)。さらに、APEX1 の過剰発現により AP サイトの切断を促進した場合にも、dCas9-PmCDA1-Unga 及び nCas9-PmCDA1-Unga による挿入欠失変異の頻度が増加することを示す結果が得られた(Figure 11)。これらの結果は、Target-AID による挿入欠失変異の誘導が塩基除去修復の過程で生じていることを支持している。また、U の除去の抑制及び AP サイトの切断の抑制を行うことが、Target-AID による挿入欠失変異効果の抑制に繋がることを示唆している。今後、DNA 修復関連遺伝子のノックダウン実験や過剰発現実験を行うことにより Target-AID による挿入欠失変異誘導のより詳細なメカニズムの解明が期待される。

3-4. PAM 配列からの距離とヌクレオチド置換効率の関係性

G₀ embryo と F₁ embryo に対する解析から、各標的遺伝子における標的ヌクレオチドの置換効率が異なることが示された。この効率の相違は PAM 配列からの距離の相違が原因となり生じていると推察される。*chd* 遺伝子に対する G₀ embryo の解析では、dCas9-PmCDA1 は PAM 配列から 19 ヌクレオチド上流にあたる標的ヌクレオチドに対して 5.9 %の頻度で置換変異を生じさせた(Figure 4B)。一方で、*oep* 遺伝子に対する G₀ embryo の解析では、dCas9-PmCDA1 は PAM 配列から 16 ヌクレオチド上流にあたる標的ヌクレオチドに対して 1.8 %の頻度で置換変異を生じさせた(Figure 5B)。*chd* 遺伝子に対する F₁ embryo の解析では、29.4%の頻度で標的ヌクレオチドにおける置換変異が検出された(Figure 14)。*oep* 遺伝子に対する F₁ embryo の解析では 20.4%の頻度で、PAM 配列から 19 ヌクレオチド上流にあたるヌクレオチドにおける置換変異が検出され、10.2%の頻度で標的ヌクレオチドにおける置換変異が検出された(Figure 15)。これらの変異頻度

は、Target-AID を出芽酵母に適用した先行研究で得られた変異頻度と類似している(Nishida et al., 2016)。この先行研究では nCas9-PmCDA1 を用いた場合、PAM 配列から 19ヌクレオチド上流にあたるヌクレオチドに対して 25%の頻度で置換変異が検出され、PAM 配列から 16ヌクレオチド上流にあたるヌクレオチドに対して 5%の頻度で置換変異が検出されている。これらの結果は PAM 配列からの相対的な距離が Target-AID による C の脱アミノ化効率に影響を与える可能性を示唆している。また標的ヌクレオチドの置換編集を行う際には不要な脱アミノ化修飾を避けるために、脱アミノ化が促進される可能性が高い範囲にただ一つの C が存在するという条件で Target-AID を適用することが望ましいと考えられる。

3-5. 体細胞と生殖細胞におけるヌクレオチド置換効率の相違

dCas9-PmCDA1 導入胚における標的ヌクレオチド置換効果の検証と F₁ embryo における置換変異の伝達効率の検証の結果、dCas9-PmCDA1 導入胚全体における標的ヌクレオチドの置換効率よりも、導入された置換変異の次世代胚への伝達効率の方が高くなる傾向が認められた(Figure 4B, 5B, 14, 15)。このことは dCas9-PmCDA1 により導入された標的ヌクレオチドの置換変異が体細胞よりも生殖細胞でより効率よく生じる可能性を示唆している。dCas9-PmCDA1 は脱アミノ化した DNA 鎖の反対鎖にニックを生じさせないため、ミスマッチ修復を介したヌクレオチド置換を引き起こさない。そのため、dCas9-PmCDA1 による標的ヌクレオチドの置換誘導は DNA 複製時の DNA 合成に依存することになる。従って、細胞分裂回数に制限がある体細胞よりも、細胞分裂回数に制限のない生殖細胞において標的ヌクレオチドの置換変異が蓄積しやすい可能性が考えられる。

3-6. Target-AID による A>C 置換の誘導

oep F₁ embryo におけるヌクレオチド置換の伝達効率の検証の結果、一定の頻度で A>C 置換が生じたヌクレオチドを有する oep F₁ embryo が生じていることを見出した(Figure 15)。先行研究では Target-AID により誘導される A>C 置換によるヌクレオチド置換は 1%未満の頻度で生じる稀な変異であると報告されている(Nishida et al., 2016)。脱アミノ化されたアデニン(ヒポキサンチン)は C と塩基対をなすため、アデニンの脱アミノ化により A>G 置換を生じたヌクレオチドが

検出されることが、大腸菌を対象とした研究で報告されている(Nordmann et al., 1988)。しかしながらこの変異メカニズムは本研究で認められた A>C 置換を説明するものではない。今後、A>C 置換の *in vitro* における再現や DNA 修復関連遺伝子のノックダウンおよびノックアウト実験を行うことにより Target-AID による A を塩基とするヌクレオチドの置換誘導メカニズムの解明が期待される。

3-7. Target-AID による off-target 効果

F₁ fish に対する off-target 効果の検証により、本研究で用いた sgRNA との相補性が高い DNA 配列に対しては、dCas9-PmCDA1 を用いた Target-AID が off-target 効果を生じさせていない事が示された(Figure 18, 19)。これらの結果は、ゼブラフィッシュを対象とした Target-AID による置換変異の誘導には sgRNA と DNA の間に厳密な塩基対の形成が必要であることを示している。しかしながら、sgRNA と dCas9-PmCDA1 の複合体が実際にゲノム DNA 上のどの位置に結合しているかは未検証である。ChIP-seq を行い、sgRNA と dCas9-PmCDA1 の複合体の結合配列を特定することでより厳密な off-target 効果の検証が可能になると考えられる。

3-8. Target-AID の遺伝子治療への応用可能性

本研究では Target-AID を用いて未成熟終止コドンをもつゼブラフィッシュ点突然変異体を作成することに成功し、脊椎動物を対象とした Target-AID による標的ヌクレオチドの置換効果を実証した。Target-AID を用いた将来的な応用技術として、生体内での転写活性の制御やスプライシングの制御が挙げられる。ランダムな挿入欠失変異を導入する CRISPR/Cas9 では、プロモーターやエンハンサー及びスプライシングサイトを正確に編集し、活性を制御することは困難である。対照的に、Target-AID はこれらの DNA 配列上の標的ヌクレオチドを置換編集することができるため、転写活性やスプライシングのパターン及び効率の精緻な調節が可能になると考えられる。従って、Target-AID を用いたこれらの応用技術は遺伝子発現やスプライシングの異常による遺伝性疾患を治療する可能性を秘めている。今後、遺伝性疾患のモデル動物に対して Target-AID を適用することで、これらの可能性を実証することができると考えられる。

4. 実験材料と方法

4-1. ゼブラフィッシュ

オレゴン大学の Zebrafish International Resource Center より取り寄せた AB 系統ゼブラフィッシュを先行研究に記載の方法に従って飼育した(Aoyama et al., 2015)。AB 系統ゼブラフィッシュの雌雄ペアを交配させて AB 系統ゼブラフィッシュ胚を得た。これらを野生型胚として実験に用いた。ゼブラフィッシュを用いた全ての実験は京都大学動物実験委員会の承認を経て行われた。

4-2. mRNA の合成

dCas9-NLS-FLAG-PmCDA1 (dCas9-PmCDA1) と nCas9-NLS-FLAG-PmCDA1 (nCas9-PmCDA1) の DNA コード配列を以下のプライマーセットを用いて PCR により増幅した。神戸大学の西田敬二先生より戴いた pRS315 dCas9-PmCDA1 と pRS315 nCas9-PmCDA1 を鋳型として用いた。

d/nCas9-NLS-FLAG-PmCDA1_F:

5' -TCTTTTTGTCAGGATCATGGACAAGAAGTAC-3'

d/nCas9-NLS-FLAG-PmCDA1_R:

5' -GAGAGGCCTTGAATTGGATCCTTATCCGGA-3'

Unga と Target-AID の融合タンパク質を作成するために、まず dCas9-PmCDA1 及び nCas9-PmCDA1 の DNA コード配列を以下のプライマーセットを用いて PCR により増幅した。神戸大学の西田敬二先生より戴いた pRS315 dCas9-PmCDA1 と pRS315 nCas9-PmCDA1 を鋳型として用いた。

d/nCas9-NLS-FLAG-PmCDA1-GGS_F:

5' -TCTTTTTGTCAGGATCATGGACAAGAAGTAC-3'

d/nCas9-NLS-FLAG-PmCDA1_GGS_R:

5' -TTTCTGTCCGATCATAGAACCTCCTCTAGAAACAGCAGGACTCTT-3'

次に、Unga の DNA コード配列を以下のプライマーセットを用いて PCR により増幅した。受精後 24 時間胚から抽出した total RNA を鋳型として用いた。

GGS_Unga_F:

5' -ATGATCGGACAGAAAAGCATCAAG-3'

GGS_Unga_R:

5' -TCACTATAGTTCTAGATTAAGTCTAGAGCTTTCCAGTC-3'

ゼブラフィッシュ由来の APEX1 の DNA コード配列を以下のプライマーセットを用いて PCR により増幅した。受精後 24 時間胚から抽出した total RNA を鋳型として用いた。

APEX1_F:

5' -TCTTTTTGTCAGGATCATGCCCAAAGAGCC-3'

APEX1_R:

5' -TCACTATAGTTCTAGATTACACTGCCAAAACAAGG-3'

上記のプライマーセットにより得られた PCR 産物を InFusion 法(Takara, Kusatsu, Japan)により pCS2+ベクターにクローニングしたのち、シーケンシング解析により DNA 配列の確認を行った。得られたプラスミド(pCS2+ dCas9-PmCDA1、pCS2+ nCas9-PmCDA1、pCS2+ dCas9-PmCDA1-Unga、pCS2+ nCas9-PmCDA1-Unga、pCS2+ APEX1)と京都大学の木下政人先生より戴いた pCS2+ Cas9 を NotI で直鎖化したのち、これらを鋳型として mRNA を *in vitro* で合成した。mRNA の *in vitro* 合成には mMESSAGE mMACHINE SP6 kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)を使用した。

4-3. sgRNA の合成

Table 1 に記載したオリゴヌクレオチド (*chd_sense*, *chd_antisense*, *oep_sense*, *oep_antisense*)を Invitrogen 社より購入した。それぞれのオリゴヌクレオチドのペアを 95 °C で 2 分間インキュベートしたのち、25 °C で 1 時間インキュベートし、アニーリングさせた。アニーリングさせたオリゴヌクレオチドのペアを、BsaI で消化した pDR274 ベクター(Ansai and Kinoshita, 2014; Hwang et al., 2013)にクローニングした。ライゲーション反応には Ligation high Ver. 2 (Toyobo, Osaka, Japan)を使用した。得られたプラスミドを DraI で直鎖化したのち、これらを鋳型として sgRNA を *in vitro* で合成した。*in vitro* 合成には MEGAshortscript T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)を使用した。

4-4. RNA のインジェクション

ゼブラフィッシュ受精卵に 1 nl の RNA 溶液を導入した。RNA 溶液の導入にはマイクロインジェクション法を用いた。導入した RNA 溶液は dCas9-PmCDA1 mRNA + *chd* sgRNA (100 ng/μl dCas9-PmCDA1 mRNA、25 ng/μl *chd* sgRNA)、nCas9-PmCDA1 mRNA + *chd* sgRNA (100 ng/μl nCas9-PmCDA1 mRNA、25 ng/μl

chd sgRNA)、 Cas9 mRNA + *chd* sgRNA (100 ng/μl Cas9 mRNA、 25 ng/μl *chd* sgRNA)、 dCas9-PmCDA1 mRNA + *oep* sgRNA (100 ng/μl dCas9-PmCDA1 mRNA、 25 ng/μl *oep* sgRNA)、 nCas9-PmCDA1 mRNA + *oep* sgRNA (100 ng/μl nCas9-PmCDA1 mRNA、 25 ng/μl *oep* sgRNA)、 Cas9 mRNA + *oep* sgRNA (100 ng/μl Cas9 mRNA、 25 ng/μl *oep* sgRNA)、 dCas9-PmCDA1-Unga mRNA + *oep* sgRNA (100 ng/μl dCas9-PmCDA1-Unga mRNA、 25 ng/μl *oep* sgRNA)、 nCas9-PmCDA1-Unga mRNA + *oep* sgRNA (100 ng/μl nCas9-PmCDA1-Unga mRNA、 25 ng/μl *oep* sgRNA)、 APEX1 mRNA (10 ng/μl)、 nCas9-PmCDA1-Unga mRNA + *oep* sgRNA + APEX1 mRNA (100 ng/μl nCas9-PmCDA1-Unga mRNA、 25 ng/μl *oep* sgRNA、 10 ng/μl APEX1 mRNA)である。*chd* sgRNA を用いた解析では、受精後 3 日目の時点で野生型のゼブラフィッシュ胚と同様の正常な表現型を示した胚の割合は未導入胚で 96.6%、dCas9-PmCDA1 導入胚で 77.8%、nCas9-PmCDA1 導入胚で 76.4%、Cas9 導入胚で 61.4%であった。*oep* sgRNA を用いた解析では、受精後 3 日目の時点で野生型のゼブラフィッシュ胚と同様の正常な表現型を示した胚の割合は未導入胚で 95.2%、dCas9-PmCDA1 導入胚で 67.3%、nCas9-PmCDA1 導入胚で 57.6%、Cas9 導入胚で 47.2%であった。受精後 3 日目の時点で正常な表現型を示した胚のみ解析に用いた。

4-5. 尾びれの切断

ゼブラフィッシュ成魚を 0.6 mM トリカイン溶液(Sigma-Aldrich, St Louis, USA)で麻酔したのち、尾びれの一部をサージカルブレード(No. 10, FEATHER Safety Razor, Mino, Japan)を用いて切断した。

4-6. ゲノム DNA の調製

先行研究に従ってゲノム DNA の調製を行った(Ansai and Kinoshita, 2014)。切断したゼブラフィッシュ成魚の尾びれ、または受精後 3 日目のゼブラフィッシュ胚を 25 μl の alkaline lysis buffer (25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA (pH 8.0))に入れ、95 °C で 15 分間インキュベートした。サンプルをボルテックスで十分に混合したのち、25 μl の 40 mM Tris-HCl (pH 8.0)をサンプルに加え中和した。この溶解液をゲノム DNA サンプルとして PCR 反応の鋳型に用いた。

4-7. 変異アレルのクローニング

変異アリのクローニングに用いたプライマー(*chd_cloning_F*, *chd_cloning_R*, *oep_cloning_F*, *oep_cloning_R*)の配列を Table 1 に記載した。条件毎に 5 個体のゼブラフィッシュ胚を解析に用いた。受精後 3 日目のゼブラフィッシュ胚を個体毎に溶解し、これらの溶解液を PCR 反応に用いた。*chd* 遺伝子と *oep* 遺伝子上の各標的 DNA 配列を PCR により増幅した。PCR による DNA 配列の増幅には BIOTAQ DNA Polymerase (Bioline, London, UK)を用いた。増幅産物を BamHI と HindIII で消化した pBluescript II KS (+)にクローニングした。ライゲーション反応には Ligation high Ver. 2 (Toyobo, Osaka, Japan)を使用した。ライゲーション産物とコンピテントセルを混合し、形質転換処理を行った。形質転換処理産物をアンピシリン含有寒天培地に塗布し、37 °C で一晩静置した。形成されたコロニーを 1x TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0))に懸濁したのち、PCR 反応に用いた。

4-8. コロニーPCR 産物のシーケンシング

ゼブラフィッシュ胚毎に 20 個程度の大腸菌コロニーに対して M13 Forward プライマーと M13 Reverse プライマーを用いて PCR を行った。PCR による DNA 配列の増幅には BIOTAQ DNA Polymerase (Bioline, London, UK)を用いた。増幅産物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Germany)を用いて精製した。シーケンシング反応は Fasmac (Atsugi, Japan)あるいは MacroGen Japan (Kyoto, Japan)により行われた。シーケンシング反応時のプライマーには M13 Forward プライマーを用いた。

4-9. Heteroduplex mobility assay (HMA)

HMA (Ansai and Kinoshita, 2014)に用いたプライマー(*chd_HMA_F*, *chd_HMA_R*, *oep_HMA_F*, *oep_HMA_R*)の配列を Table 1 に記載した。受精後 3 日目のゼブラフィッシュ胚の溶解液を PCR 反応に用いた。*chd* 遺伝子と *oep* 遺伝子上の各標的 DNA 配列を PCR により増幅した。PCR による DNA 配列の増幅には BIOTAQ DNA Polymerase (Bioline, London, UK)を用いた。これらのプライマーのペアは、*chd* 遺伝子に対して 117 bp の DNA 配列を増幅し、*oep* 遺伝子に対して 132 bp の DNA 配列を増幅した。増幅産物を 8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。バンドのシグナル強度を ImageJ 上で算出した。対照区(未導入胚)で検出された全体のシグナル強度を用いて、実験区で検出された全体

のシグナル強度を標準化した。標準化ののち、野生型のホモデュプレックスを示す DNA バンドとは異なる移動度を示した実験区の DNA バンドのシグナル強度から、対照区で検出された同様の DNA バンドのシグナル強度を差し引いて、シグナル強度の補正を行なった。各実験区で得られた補正後のシグナル強度を比較し、シグナルの増減を百分率で示した。

4-10. ダイレクトシーケンシングによるジェノタイピング

ゼブラフィッシュのゲノム DNA に対するダイレクトシーケンシングに用いたプライマー(*chd_direct_F*, *chd_direct_R*, *oep_direct_F*, *oep_direct_R*)の配列を Table 1 に記載した。*chd* 遺伝子と *oep* 遺伝子上の各標的 DNA 配列を PCR により増幅した。PCR による DNA 配列の増幅には BIOTAQ DNA Polymerase (Bioline, London, UK)を用いた。増幅産物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Germany)を用いて精製した。シーケンシング反応は Fasmac (Atsugi, Japan)あるいは Macrogen Japan (Kyoto, Japan)により行われた。シーケンシング反応時のプライマーには Table 1 に記載の *chd_direct_F* と *oep_direct_F* を用いた。

4-11. Allele-specific PCR によるジェノタイピング

ゼブラフィッシュのゲノム DNA に対する Allele-specific PCR (Newton et al., 1989)に用いたプライマーの配列を Table 1 に記載した。*chd_wF* と *chd_mF* を *chd* 遺伝子上の 2nd intron と 3rd exon のアンチセンス鎖にアニールするように設計した。*chd_wF* と *chd_mF* の 3'末端を *chd* 遺伝子上の標的ヌクレオチドの相補ヌクレオチドにアニールするように設計した。一方で *chd_wR* を *chd* 遺伝子上の 3rd intron のセンス鎖にアニールするように設計した。各 Forward プライマーと *chd_wR* で構成されたプライマーセットが標的 DNA 配列を増幅させるかどうかを検証することで、*chd* 遺伝子上の標的ヌクレオチド置換を検出する。更に、*chd_wF*、*chd_mF* は 3'末端から 2 番目のヌクレオチドに T を有する。この T と 鋳型との間で C/T のミスマッチが生じることにより、Allele-specific PCR による標的ヌクレオチド置換の検出感度の向上が期待される。

oep_wF を *oep* 遺伝子上の 2nd intron のアンチセンス鎖にアニールするように設計した。一方で *oep_wR* と *oep_mR* を *oep* 遺伝子上の 3rd exon のセンス鎖にアニールするように設計した。*oep_wR* と *oep_mR* の 3'末端を *oep* 遺伝子上の標的

ヌクレオチドにアニールするように設計した。*oep_wR* は 3'末端に G を有し、*oep_mR* は 3'末端に A を有する。各 Reverse プライマーと *oep_wF* で構成されたプライマーセットが標的 DNA 配列を増幅させるかどうかを検証することで、*oep* 遺伝子上の標的ヌクレオチド置換を検出する。

chd_bF と *chd_bR* および *oep_bF* と *oep_bR* のプライマーペアは各標的ヌクレオチドから 800–1400 bp 下流の DNA 配列を増幅する。これらのプライマーペアを内部コントロールとして用いた。Allele-specific PCR による DNA 配列の増幅には BIOTAQ DNA Polymerase (Bioline, London, UK) を用いた。増幅産物を 2% アガロースゲル電気泳動により分離した。PCR の反応条件を以下に示した。

For *chd* gene;

pre-denaturation	94 °C	5 min	
denaturation	94 °C	20 s	30 times
annealing	60 °C	20 s	
extension	72 °C	20 s	
final extension	72 °C	1 min	

For *oep* gene;

pre-denaturation	94 °C	5 min	
denaturation	94 °C	20 s	25 times
annealing	55 °C	20 s	
extension	72 °C	20 s	
final extension	72 °C	1 min	

4-12. ゼブラフィッシュ胚の表現型観察

受精後 1 日目のゼブラフィッシュ胚を MicroPublisher 5.0 camera (QImaging, Surrey, Canada) を搭載した SZX16 stereo microscope (Olympus, Tokyo, Japan) 下で撮影した。

4-13. Whole-mount *in situ* hybridization (WISH)

gooseoid (*gsc*) 遺伝子と *hatching gland 1* (*hgg1*) 遺伝子を検出する RNA プローブを先行研究に従って合成した(Maegawa et al., 2006)。WISH は先行研究に従って行われた(Tanaka et al., 2017)。

4-14. WISH 染色胚からのゲノム DNA の調製

WISH 染色胚からのゲノム DNA の調整を先行研究に記載の方法に従って行った(Gansner et al., 2008)。WISH で染色した胚を 4% PFA/PBS で固定したのち、以下のプロトコールに従って処理した。

1. 24 ウェルプレートの各ウェルに胚を移す。
2. 1 ml の 1x PBS-T (0.1% Tween 20) をウェルに加え、室温で 1 時間振盪する。
3. 1x PBS-T を捨てる。
4. ステップ 2 と 3 を繰り返す。
5. 1 ml の 1x PBS-T (0.1% Tween 20) をウェルに加え、室温で一晩振盪する。
6. 1x PBS-T を捨てる。
7. 1 ml の 300 mM NaCl-T (0.1% Tween 20) をウェルに加え、65 °C で 4 時間静置する。
8. 300 mM NaCl-T を捨てる。
9. 1 ml の超純水をウェルに入れる。
10. 胚を 1.5 ml エッペンチューブに移す。
11. 超純水を捨てる。
12. 25 μ l の alkaline lysis buffer を 1.5 ml エッペンチューブに加え、95 °C で 15 分間静置する。
13. サンプルをボルテックスで十分に混合する。
14. 25 μ l の 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) を 1.5 ml エッペンチューブに加え、中和する。
15. サンプルを 4 °C もしくは -20 °C で保存する。

4-15. Allele-specific PCR による WISH 染色胚のジェノタイピング

WISH 染色胚から調製したゲノム DNA に対して、Allele-specific PCR を行った。Allele-specific PCR による DNA 配列の増幅には BIOTAQ DNA Polymerase (Bioline, London, UK) を用いた。検出感度を高めるため、Forward プライマーと Reverse プライマーの終濃度をそれぞれ 0.8 μ M に設定して PCR 反応を行った。増幅産物を 2% アガロースゲル電気泳動により分離した。PCR の反応条件を以下に示した。

pre-denaturation	94 °C	5 min	
denaturation	94 °C	20 s	45 times
annealing	55 °C	20 s	
extension	72 °C	20 s	
final extension	72 °C	1 min	

参考文献

- Ansai, S., and Kinoshita, M. (2014). Targeted mutagenesis using CRISPR/Cas system in medaka. *Biology Open* 3, 362-371.
- Aoyama, Y., Moriya, N., Tanaka, S., Taniguchi, T., Hosokawa, H., and Maegawa, S. (2015). A Novel Method for Rearing Zebrafish by Using Freshwater Rotifers (*Brachionus calyciflorus*). *Zebrafish* 12, 288-295.
- Bakondi, B., Lv, W.J., Lui, B., Jones, M.K., Tsai, Y., Kim, K.J., Levy, R., Akhtar, A.A., Breunig, J.J., Svendseni, C.N., *et al.* (2016). In Vivo CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter-3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Molecular Therapy* 24, 556-563.
- Blitz, I.L., Biesinger, J., Xie, X.H., and Cho, K.W.Y. (2013). Biallelic Genome Modification in F-0 *Xenopus tropicalis* Embryos Using the CRISPR/Cas System. *Genesis* 51, 827-834.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. (2010). Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics* 186, 757-U476.
- Cox, D.B.T., Platt, R.J., and Zhang, F. (2015). Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature Medicine* 21, 121-131.
- De Ravin, S.S., Reik, A., Liu, P.-Q., Li, L., Wu, X., Su, L., Raley, C., Theobald, N., Choi, U., Song, A.H., *et al.* (2016). Targeted gene addition in human CD34(+) hematopoietic cells for correction of X-linked chronic granulomatous disease. *Nature Biotechnology* 34, 424-+.
- Ding, Q.R., Strong, A., Patel, K.M., Ng, S.L., Gosis, B.S., Regan, S.N., Cowan, C.A., Rader, D.J., and Musunuru, K. (2014). Permanent Alteration of PCSK9 With

In Vivo CRISPR-Cas9 Genome Editing. *Circulation Research* 115, 488-+.

Friedland, A.E., Tzur, Y.B., Esvelt, K.M., Colaiacovo, M.P., Church, G.M., and Calarco, J.A. (2013). Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nature Methods* 10, 741-+.

Gansner, J.M., Madsen, E.C., Mecham, R.P., and Gitlin, J.D. (2008). Essential Role for fibrillin-2 in Zebrafish Notochord and Vascular Morphogenesis. *Developmental Dynamics* 237, 2844-2861.

Gratz, S.J., Cummings, A.M., Nguyen, J.N., Hamm, D.C., Donohue, L.K., Harrison, M.M., Wildonger, J., and O'Connor-Giles, K.M. (2013). Genome Engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-Guided Cas9 Nuclease. *Genetics* 194, 1029-+.

Hammerschmidt, M., Pelegri, F., Mullins, M.C., Kane, D.A., vanEeden, F.J.M., Granato, M., Brand, M., FurutaniSeiki, M., Haffter, P., Heisenberg, C.P., *et al.* (1996). *dino* and *mercedes*, two genes regulating dorsal development in the zebrafish embryo. *Development* 123, 95-102.

Hwang, W.Y., Fu, Y.F., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.R.J., and Joung, J.K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* 31, 227-229.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337, 816-821.

Kim, Y.G., Cha, J., and Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 1156-1160.

Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A., and Liu, D.R. (2016).

Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533, 420-+.

Lin, S.R., Yang, H.C., Kuo, Y.T., Liu, C.J., Yang, T.Y., Sung, K.C., Lin, Y.Y., Wang, H.Y., Wang, C.C., Shen, Y.C., *et al.* (2014). The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 3.

Long, C.Z., McAnally, J.R., Shelton, J.M., Mireault, A.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2014). Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science* 345, 1184-1188.

Maegawa, S., Varga, M., and Weinberg, E.S. (2006). FGF signaling is required for beta-catenin-mediated induction of the zebrafish organizer. *Development* 133, 3265-3276.

Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *Journal of Biological Chemistry* 274, 18470-18476.

Nakayama, T., Fish, M.B., Fisher, M., Oomen-Hajagos, J., Thomsen, G.H., and Grainger, R.M. (2013). Simple and Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis in *Xenopus tropicalis*. *Genesis* 51, 835-843.

Nambiar, M., and Raghavan, S.C. (2011). How does DNA break during chromosomal translocations? *Nucleic Acids Research* 39, 5813-5825.

Nelson, C.E., Hakim, C.H., Ousterout, D.G., Thakore, P.I., Moreb, E.A., Rivera, R.M.C., Madhavan, S., Pan, X., Ran, F.A., Yan, W.X., *et al.* (2016). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 351, 403-407.

- Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J.C., and Markham, A.F. (1989). Analysis of any point mutation in DNA - The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research* *17*, 2503-2516.
- Nishida, K., Arazoe, T., Yachie, N., Banno, S., Kakimoto, M., Tabata, M., Mochizuki, M., Miyabe, A., Araki, M., Hara, K.Y., *et al.* (2016). Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* *353*, 1248-+.
- Nordmann, P.L., Makris, J.C., and Reznikoff, W.S. (1988). Inosine induced mutations. *Molecular & General Genetics* *214*, 62-67.
- Rich, T., Allen, R.L., and Wyllie, A.H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* *407*, 777-783.
- Schier, A.F., Neuhauss, S.C.F., Helde, K.A., Talbot, W.S., and Driever, W. (1997). The one-eyed pinhead gene functions in mesoderm and endoderm formation in zebrafish and interacts with no tail. *Development* *124*, 327-342.
- Schwank, G., Koo, B.K., Sasselli, V., Dekkers, J.F., Heo, I., Demircan, T., Sasaki, N., Boymans, S., Cuppen, E., van der Ent, C.K., *et al.* (2013). Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients. *Cell Stem Cell* *13*, 653-658.
- Shen, B., Zhang, J., Wu, H.Y., Wang, J.Y., Ma, K., Li, Z., Zhang, X.G., Zhang, P.M., and Huang, X.X. (2013). Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Research* *23*, 720-723.
- Stemmer, M., Thumberger, T., Keyer, M.d.S., Wittbrodt, J., and Mateo, J.L. (2015). CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *Plos One* *10*.

- Tanaka, S., Hosokawa, H., Weinberg, E.S., and Maegawa, S. (2017). Chordin and dickkopf-1b are essential for the formation of head structures through activation of the FGF signaling pathway in zebrafish. *Developmental biology* 424, 189-197.
- Tebas, P., Stein, D., Tang, W.W., Frank, I., Wang, S.Q., Lee, G., Spratt, S.K., Surosky, R.T., Giedlin, M.A., Nichol, G., *et al.* (2014). Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV. *New England Journal of Medicine* 370, 901-910.
- Wang, H.Y., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., and Jaenisch, R. (2013). One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell* 153, 910-918.
- Wu, Y.X., Liang, D., Wang, Y.H., Bai, M.Z., Tang, W., Bao, S.M., Yan, Z.Q., Li, D.S., and Li, J.S. (2013). Correction of a Genetic Disease in Mouse via Use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* 13, 659-662.
- Zhang, Y.H., Qin, W., Lu, X.C., Xu, J.S., Huang, H.G., Bai, H.P., Li, S., and Lin, S. (2017). Programmable base editing of zebrafish genome using a modified CRISPR-Cas9 system. *Nature Communications* 8.

謝辞

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Shingo Tanaka, Shin Yoshioka, Keiji Nishida, Hiroshi Hosokawa, Akira Kakizuka, and
Shingo Maegawa

In vivo targeted single-nucleotide editing in zebrafish

Scientific Reports, **8**, 11423, 1–11, 2018

京都大学大学院生命科学研究科・高次生体統御学分野の垣塚彰教授に深く感謝致します。学部時代より進めてきたゼブラフィッシュの研究を継続する機会を設けてくださりました。また終始寛大なお心で、丁寧なご指導と的確な助言を賜りました。心より感謝申し上げます。

神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科の西田敬二教授と吉岡伸特命助教に感謝致します。次世代シーケンシングを利用した解析とディスカッションにお時間を割いてくださりました。また貴重な実験材料を提供してくださりました。心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、ご指導をいただきました京都大学大学院情報学研究科・脳情報学分野の前川真吾助教と細川浩講師に感謝申し上げます。ゼブラフィッシュを対象とした実験手法だけではなく、研究と教育に対する姿勢も学ばせていただきました。心より感謝致します。

京都大学大学院医学研究科・形態形成機構学分野の木村亮助教と医学部医学科4回生の鈴木志穂さんをはじめ、ゼブラフィッシュ研究の生命線といえるゼブラフィッシュの飼育に携わって下さいましたすべての方々に深く感謝致します。

研究者として生きる上で貴重なアドバイスをくださいました京都大学大学院生命科学研究科・高次生体統御学分野の今村博臣准教授、竹安邦夫名誉教授に深く感謝申し上げます。また、研究生生活をサポートして下さいました高次生体統御学分野の皆様心より感謝致します。

両親をはじめ、研究生生活と家庭生活を辛抱強く見守り続けてくれた家族に深く感謝致します。また他界されました祖父母、義祖父、義母には生前励ましの言

葉を沢山いただきました。心より感謝致しますとともに、ご冥福をお祈り申し上げます。

最後に、掛け替えのない妻と息子と娘に感謝します。共に歩んでくれた妻と、天真爛漫な息子と娘から研究を続けていくためのエネルギーを貰いました。本当にありがとう。

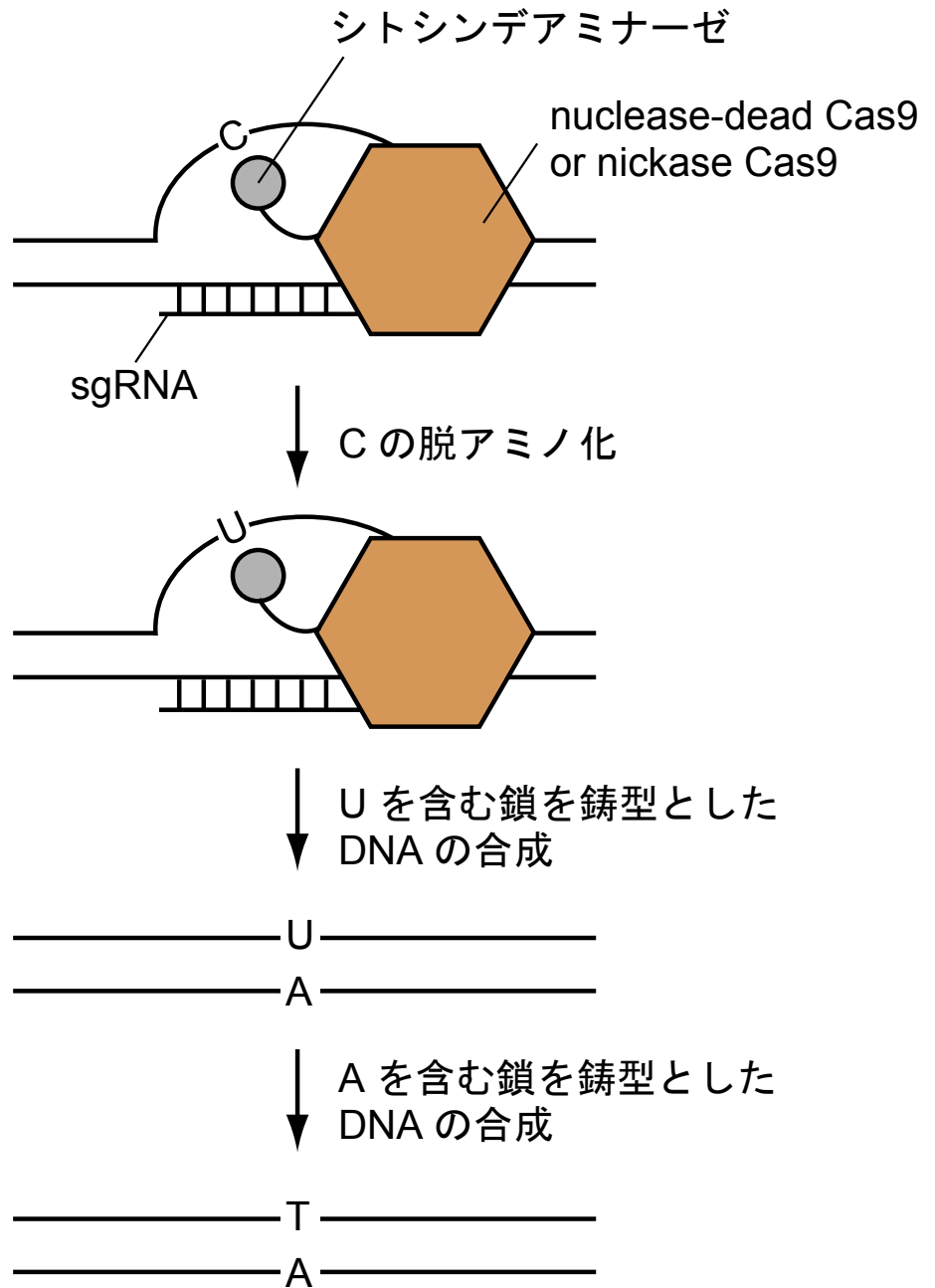


Figure 1. Target-AIDによる標的ヌクレオチドの置換編集

Target-AIDによる標的ヌクレオチドの置換編集には、ヌクレアーゼ欠失型 Cas9 (nuclease-dead Cas9, nickase Cas9) とシトシンデアミナーゼの融合タンパク質が用いられる。シトシンデアミナーゼにより脱アミノ化されたCはUとなる。DNAの複製や修復の過程でDNAの合成が起こることにより標的ヌクレオチドを構成するCがTに置換される。

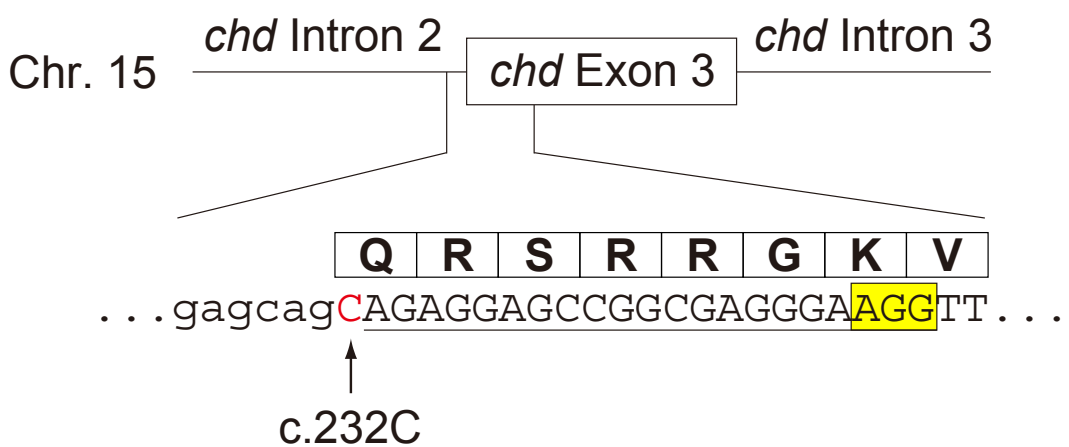


Figure 2. *chd*遺伝子における標的DNA配列

大文字で表記されたDNA配列はExon上のDNA配列を示している。小文字で表記されたDNA配列はIntron上のDNA配列を示している。DNA配列に引かれた下線は*chd* sgRNAの認識配列を示している。黄色で囲まれたDNA配列はPAM配列を示している。赤色で表記されたCは標的ヌクレオチドを構成するC (c.232C)を示している。DNA配列の上部にアミノ酸の略号を一文字表記で記載した。

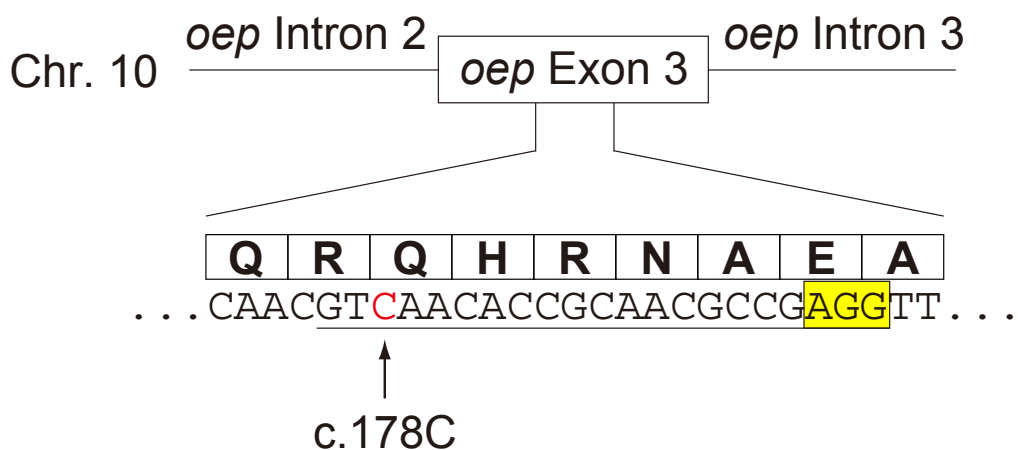


Figure 3. *oep*遺伝子における標的DNA配列

DNA配列に引かれた下線は*oep* sgRNAの認識配列を示している。黄色で囲まれたDNA配列はPAM配列を示している。赤色で表記されたCは標的ヌクレオチドを構成するC (c.178C)を示している。DNA配列の上部にアミノ酸の略号を一文字表記で記載した。

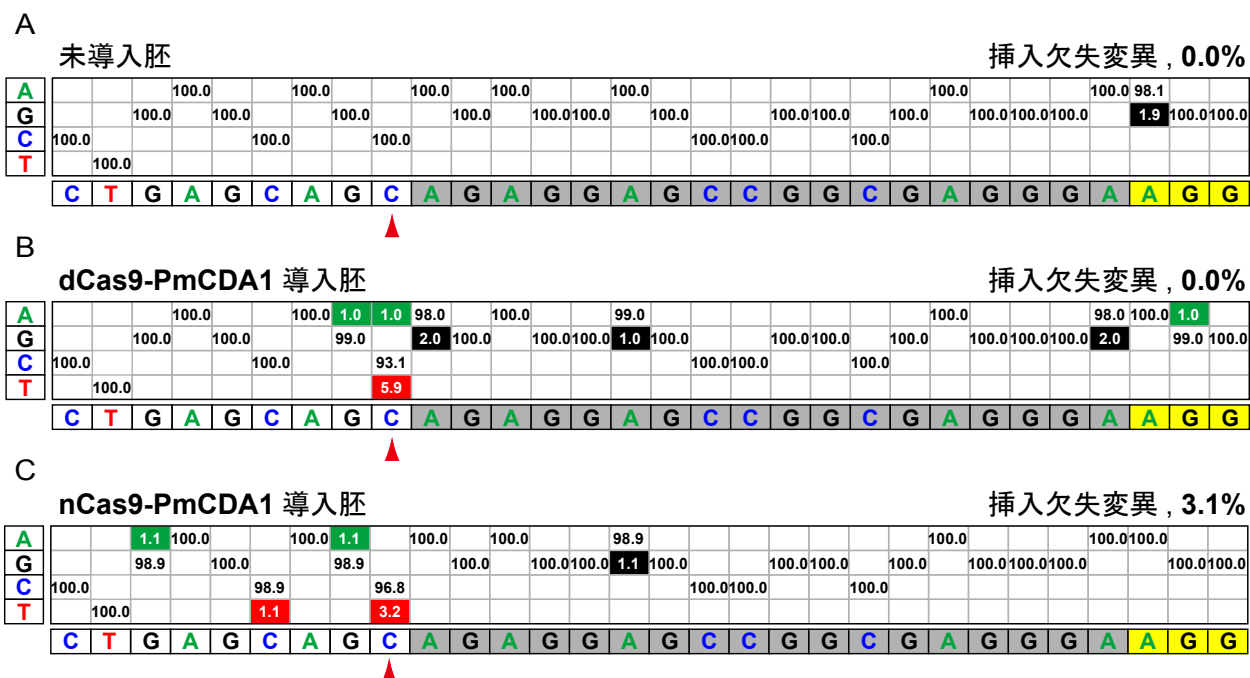


Figure 4. *chd*遺伝子上における標的DNA配列の変異スペクトラム

野生型のDNA配列を表の下部に示した。*chd* sgRNAの認識配列とPAM配列をそれぞれ灰色と黄色で示した。赤色の矢頭は標的ヌクレオチドの位置を示している。DNA配列上の各位置におけるヌクレオチド出現頻度をDNA配列の上部に記載した。Aへの置換を緑色で、Gへの置換を黒色で、Tへの置換を赤色で示した。各条件毎に標的DNA配列をPCRで増幅した。増幅産物をクローニングしたプラスミド(pBluescript KS (+))をコンピテントセルに導入し、アンピシリン含有寒天培地上で大腸菌コロニーを形成させた。(A)未導入胚では105個の大腸菌コロニーに対するシーケンシングの結果から変異スペクトラムを得た。(B)dCas9-PmCDA1導入胚では101個の大腸菌コロニーに対するシーケンシングの結果から変異スペクトラムを得た。(C)nCas9-PmCDA1導入胚では96個の大腸菌コロニーに対してシーケンシングを行なった結果、3個の大腸菌コロニーで挿入欠失変異が検出された。残りの93個の大腸菌コロニーに対するシーケンシングの結果から変異スペクトラムを得た。

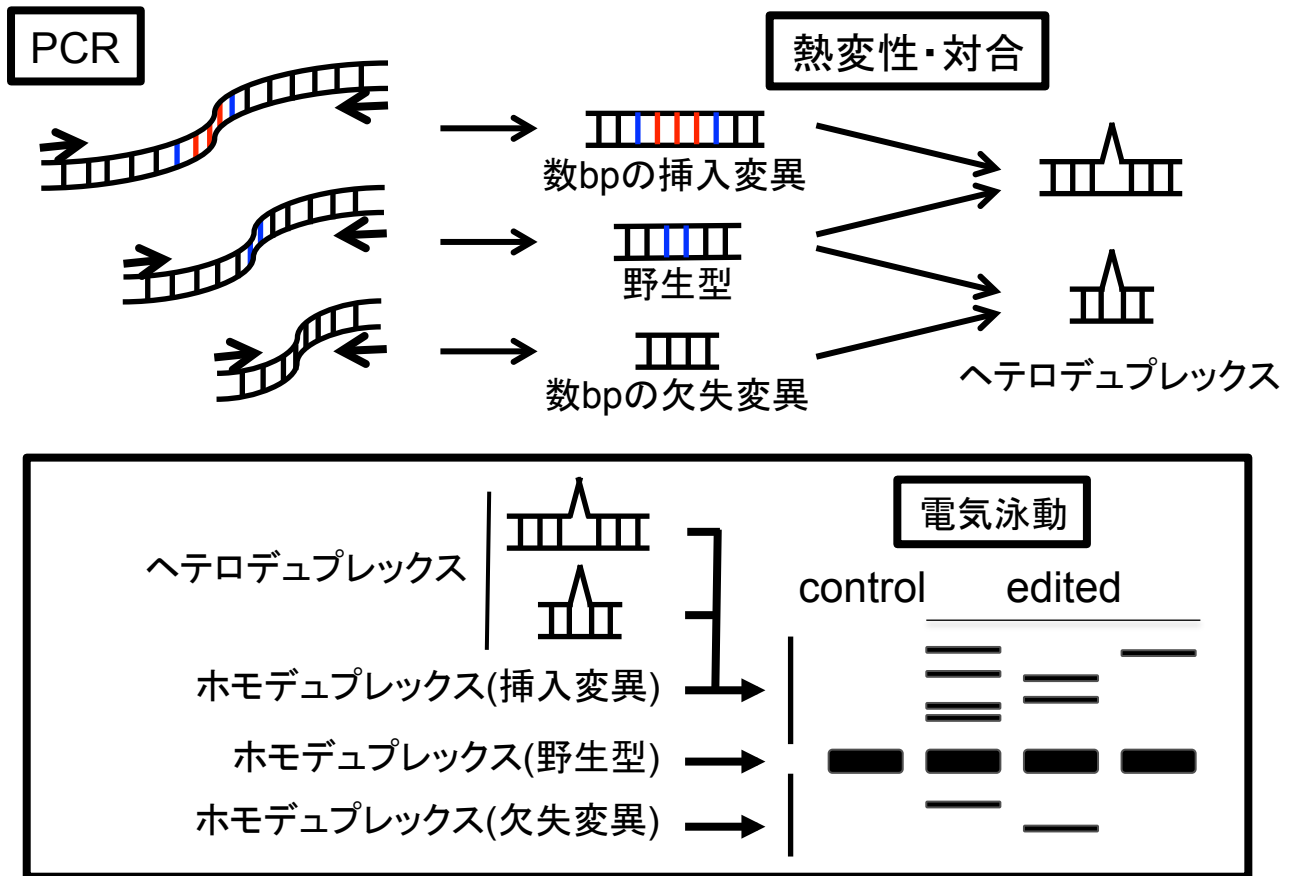


Figure 7. Heteroduplex mobility assay (HMA)

標的遺伝子上に数bp程度の挿入欠失変異が生じた変異アリルと野生型アリルが混在するゲノムDNAプールに対してPCRによる標的DNAの増幅を行ったのち、増幅産物に対して熱変性と冷却を行うと、長さの異なる増幅産物同士でミスマッチが起きているヘテロ二本鎖DNA (ヘテロデュプレックス)が生じる。ヘテロデュプレックスはミスマッチが起きていない野生型のホモ二本鎖DNA(ホモデュプレックス)と比較して電気泳動での移動度が変化するため、数bp程度の挿入欠失変異が電気泳動により検出できる。また、数十bp程度の比較的大きな挿入欠失変異が生じたホモデュプレックスに関しても、野生型のホモデュプレックスと比較して電気泳動での移動度が変化する。従って、これらの挿入欠失変異も電気泳動により検出される。

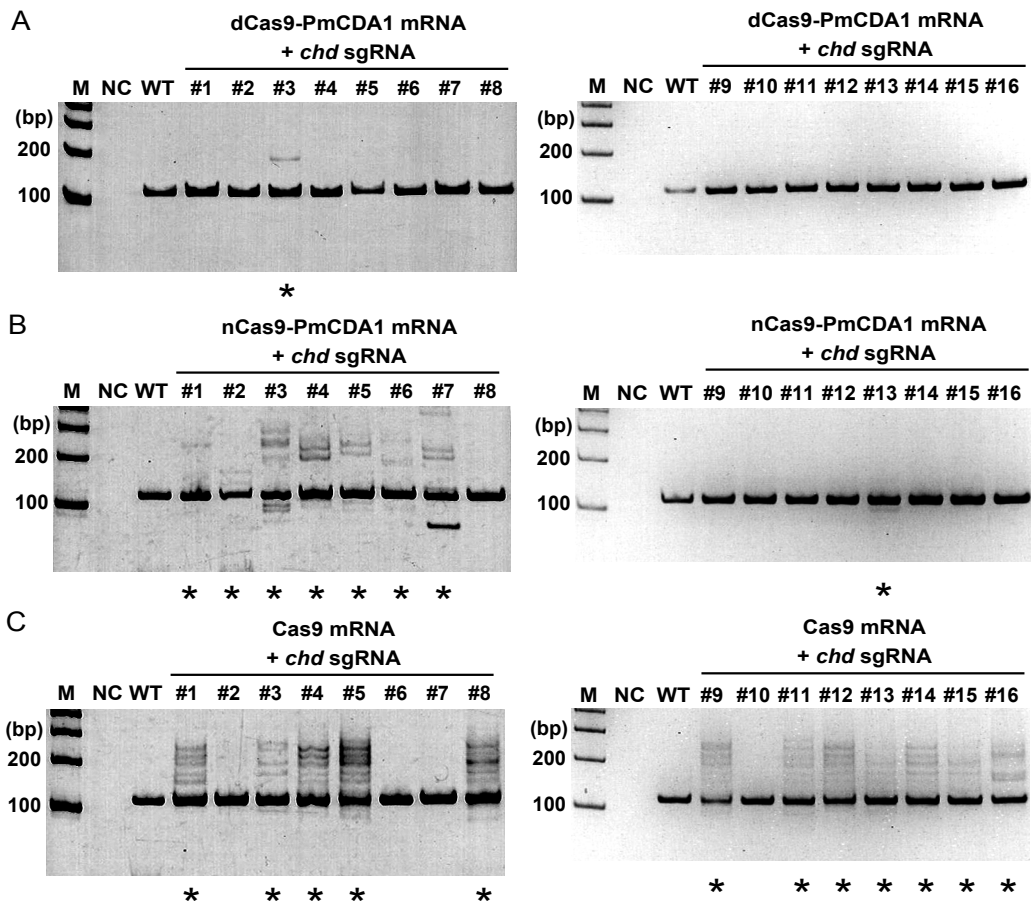


Figure 8. *chd*遺伝子に対するHMA

(A)dCas9-PmCDA1導入胚、(B)nCas9-PmCDA1導入胚、(C)Cas9導入胚から個体ごとに抽出したゲノムDNAを用いてHMAを行った。野生型の*chd*遺伝子に対して117 bpの増幅産物が生じるようにプライマーを設計した。MはDNAマーカーを示している。NCは鋳型DNAをPCR反応液に含まないネガティブコントロールを示している。WTは未導入胚を示している。アスタリスクは未導入胚のDNAバンドと比較して、移動度の異なるDNAバンドが生じたレーンを示す。

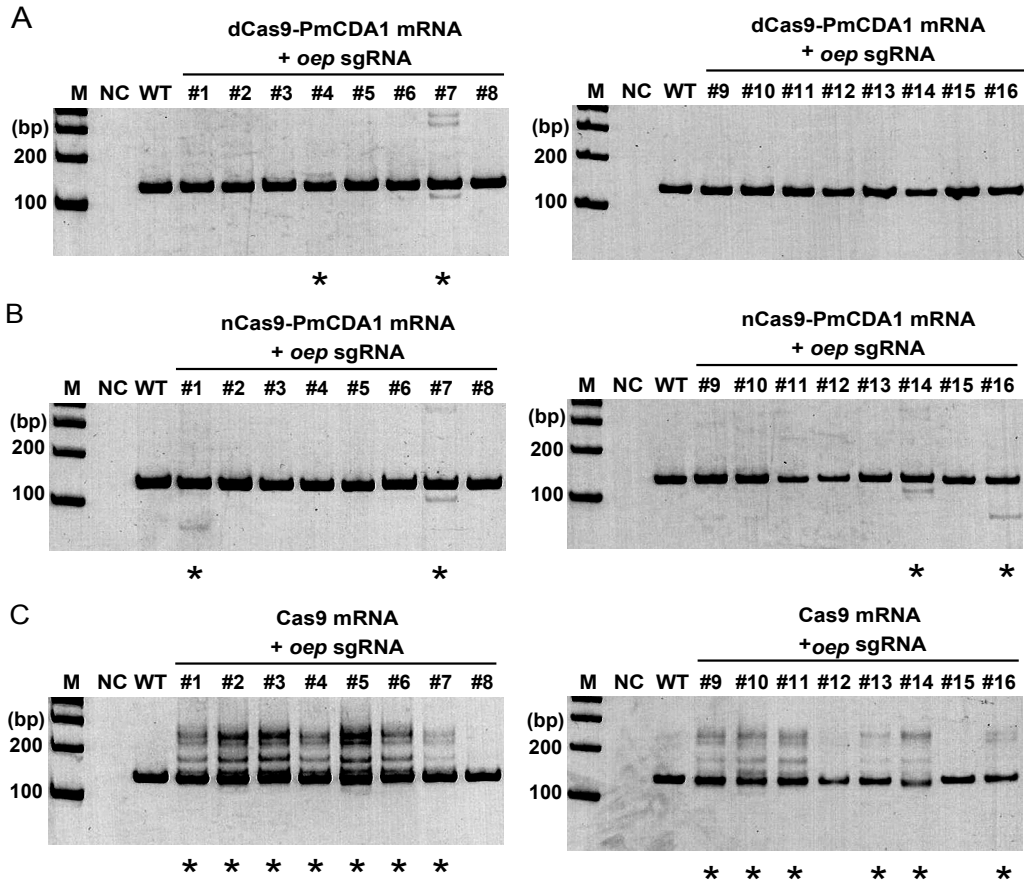


Figure 9. *oep*遺伝子に対するHMA

(A)dCas9-PmCDA1導入胚、(B)nCas9-PmCDA1導入胚、(C)Cas9導入胚から個体ごとに抽出したゲノムDNAを用いてHMAを行った。野生型の*oep*遺伝子に対して132 bpの増幅産物が生じるようにプライマーを設計した。MはDNAマーカーを示している。NCは鋳型DNAをPCR反応液に含まないネガティブコントロールを示している。WTは未導入胚を示している。アスタリスクは未導入胚のDNAバンドと比較して、移動度の異なるDNAバンドが生じたレーンを示す。

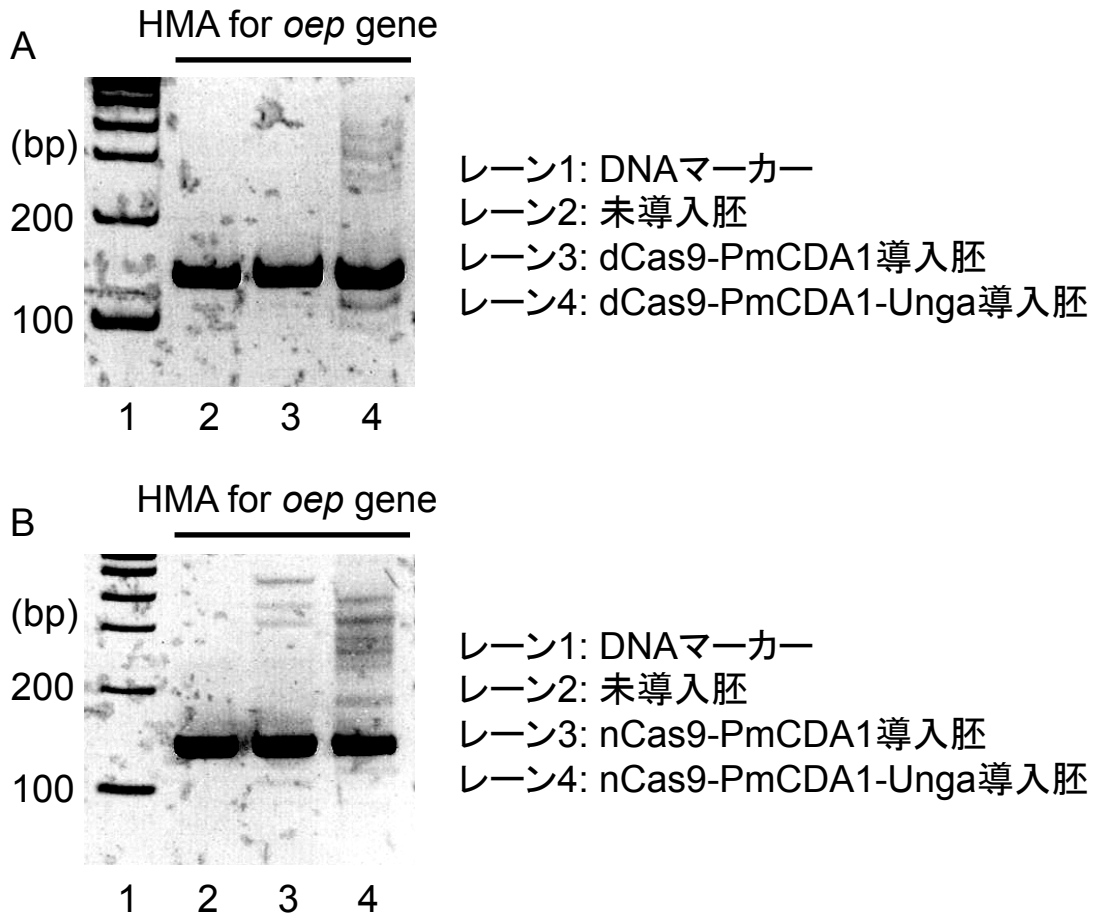
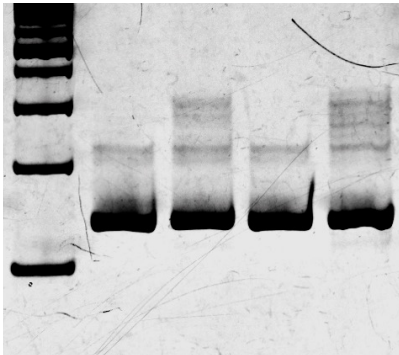


Figure 10. Target-AIDへのウラシルDNAグリコシラーゼの付加は挿入欠失変異効果を促進する

(A) dCas9-PmCDA1にウラシルDNAグリコシラーゼを付加したdCas9-PmCDA1-UngaをコードするmRNAと*oep* sgRNAの導入胚に対するHMAの結果。各条件に対し10個体の胚から抽出したゲノムDNAの混合液をPCR反応の鋳型として使用した。
(B) nCas9-PmCDA1にウラシルDNAグリコシラーゼを付加したnCas9-PmCDA1-UngaをコードするmRNAと*oep* sgRNAの導入胚に対するHMAの結果。各条件に対し10個体の胚から抽出したゲノムDNAの混合液をPCR反応の鋳型として使用した。

A

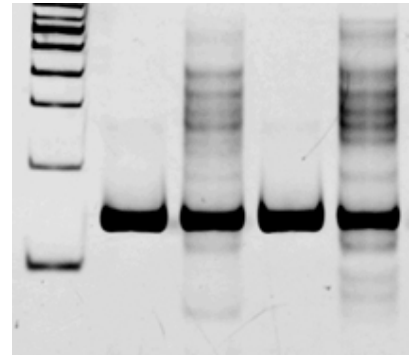
	HMA for <i>oep</i> gene			
dCas9- PmCDA1-Unga	-	+	-	+
APEX1	-	-	+	+



シグナル強度の変化率: 127.5%

B

	HMA for <i>oep</i> gene			
nCas9- PmCDA1-Unga	-	+	-	+
APEX1	-	-	+	+



シグナル強度の変化率: 150.5%

Figure 11. APEX1 mRNAの共導入は挿入欠失変異効果を促進する

(A) dCas9-PmCDA1-Unga mRNA、*oep* sgRNAおよびAPEX1 mRNAの共導入胚に対するHMAの結果。各条件に対し10個体の胚から抽出したゲノムDNAの混合液をPCR反応の鋳型として使用した。(B) nCas9-PmCDA1-Unga mRNA、*oep* sgRNAおよびAPEX1 mRNAの共導入胚に対するHMAの結果。各条件に対し6個体の胚から抽出したゲノムDNAの混合液をPCR反応の鋳型として使用した。バンドのシグナル強度をImageJにより算出し、APEX1の共導入によるシグナル強度の変化率を写真の下部に百分率で示した。

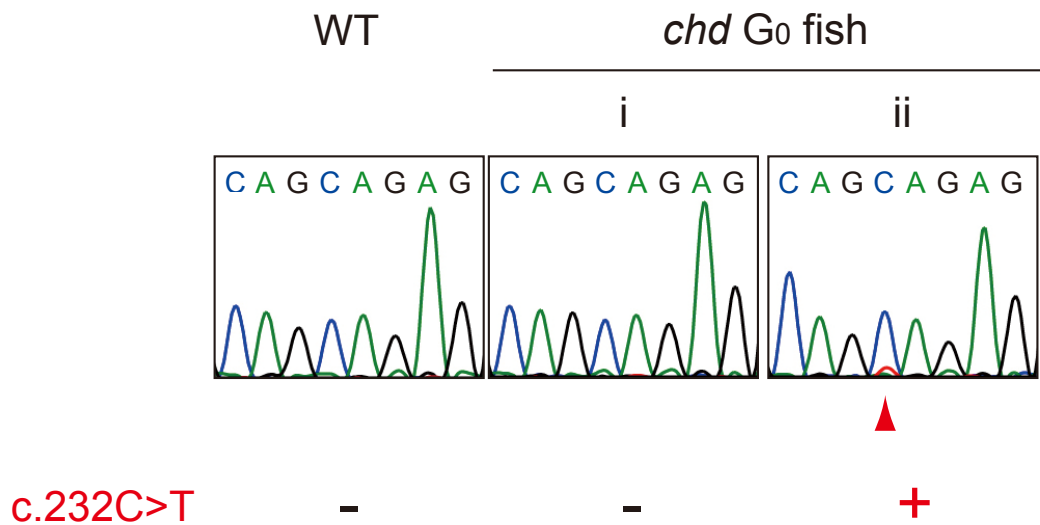


Figure 12. *chd* G₀ fishに対するダイレクトシーケンシング

chd G₀ fishの尾びれの細胞から抽出したゲノムDNAを鋳型として増幅した*chd* 遺伝子上の標的配列に対し、ダイレクトシーケンシングを行った。WTは野生型ゼブラフィッシュを示している。赤色の矢頭はTが検出された標的ヌクレオチドの位置を示している。波形データの上にあるローマ数字(i, ii)は波形データのパターンを示している。

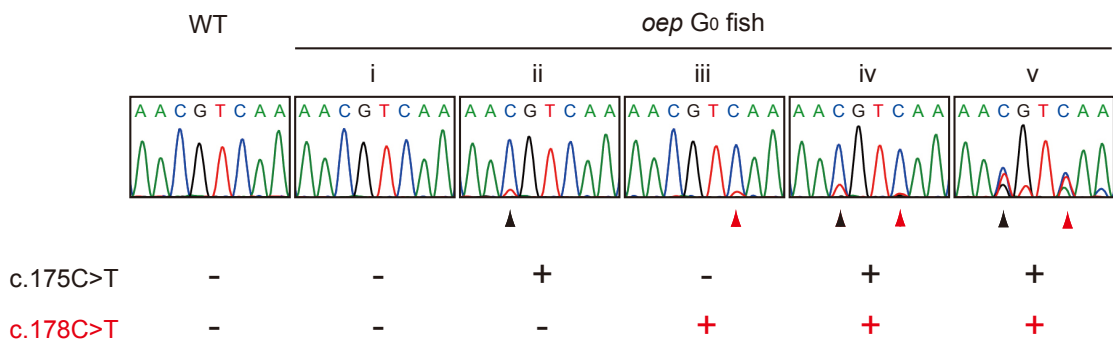
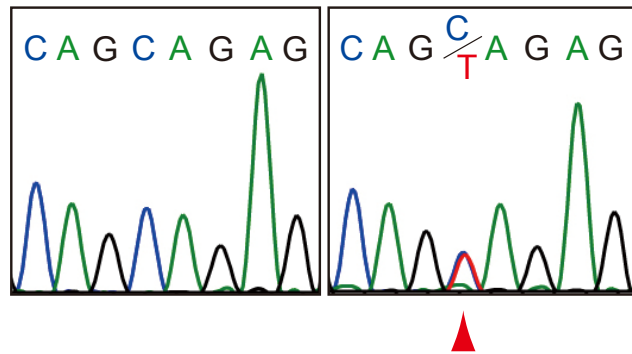


Figure 13. *oep* G₀ fishに対するダイレクトシーケンシング

oep G₀ fishの尾びれの細胞から抽出したゲノムDNAを鋳型として増幅した*oep* 遺伝子上の標的配列に対し、ダイレクトシーケンシングを行った。WTは野生型ゼブラフィッシュを示している。赤色の矢頭はC>T置換が検出された標的ヌクレオチドの位置を示している。黒色の矢頭はC>T置換が検出された標的外のヌクレオチドの位置を示している。波形データの上部にあるローマ数字(i-v)は波形データのパターンを示している。

chd F₁ embryos



c.232C>T

-

+

Total

n =	24	10	34
%	70.6	29.4	100.0

Figure 14. *chd*遺伝子における標的ヌクレオチドの置換変異は次世代に伝達する

chd F₁ embryoに対するダイレクトシーケンシングで得られた波形データ。赤色の矢頭はC>T置換が検出された標的ヌクレオチドの位置を示している。各波形データの出現数と出現率を波形データ下部の枠内に記載した。

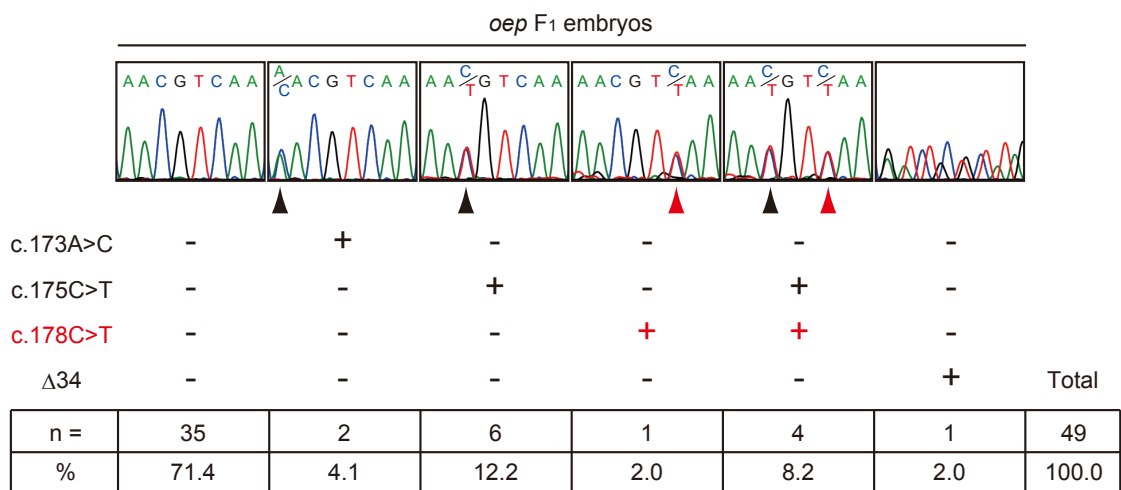


Figure 15. *oep*遺伝子における標的ヌクレオチドの置換変異は次世代に伝達する

oep F₁ embryoに対するダイレクトシーケンシングで得られた波形データ。赤色の矢頭はC>T置換が検出された標的ヌクレオチドの位置を示している。黒色の矢頭は置換が検出された標的外のヌクレオチドの位置を示している。各波形データの出現数と出現率を波形データ下部の枠内に記載した。各波形データの出現率の合計は、四捨五入による端数処理のため100%とならない。

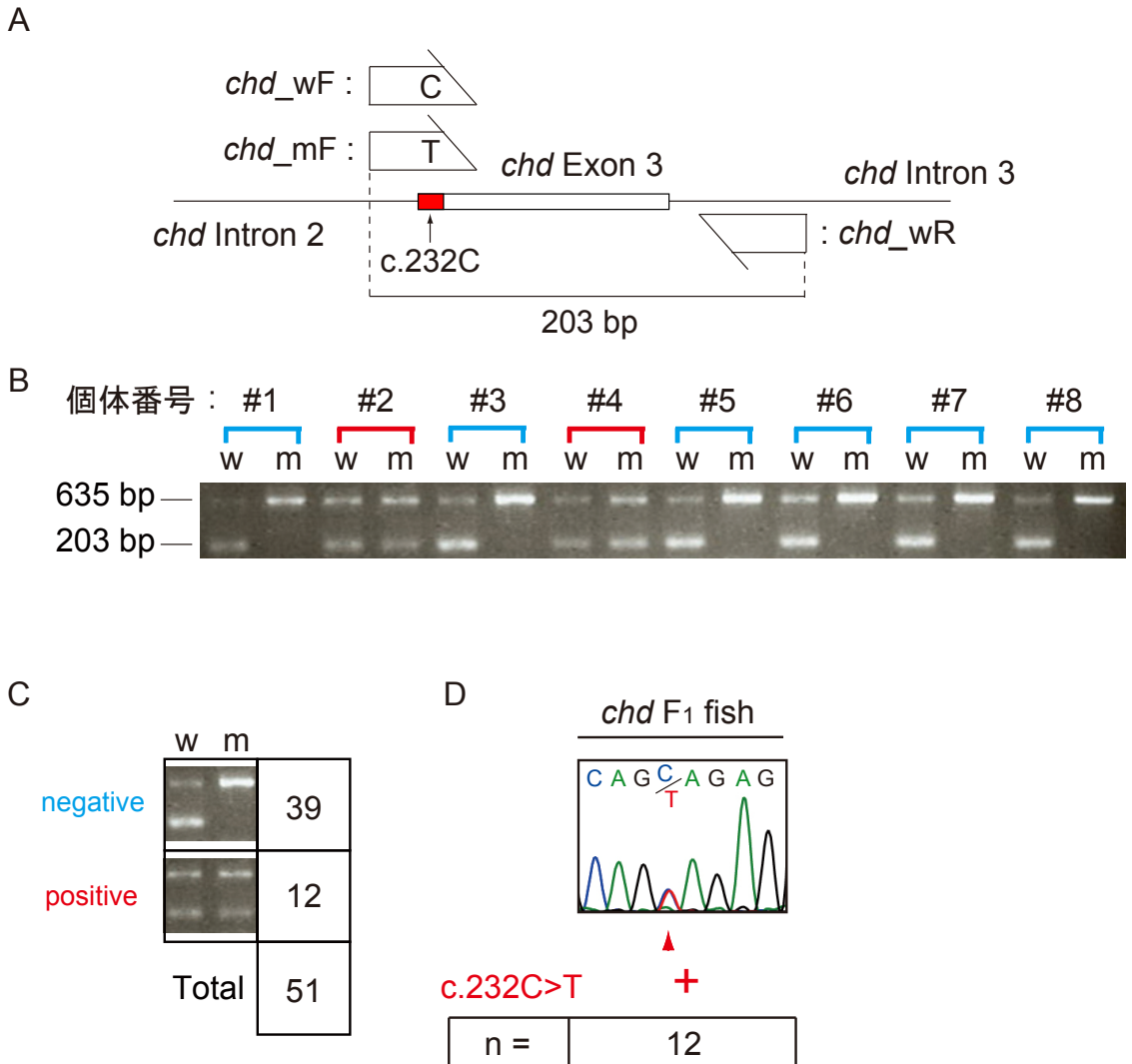


Figure 16. *chd*遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有する*chd* F₁ fishの同定

(A) *chd*遺伝子における標的ヌクレオチドの置換変異を検出するために行った Allele-specific PCRの概略図。標的ヌクレオチドを構成するC (c.232C)の位置を赤色で示した。(B) Allele-specific PCRにより得られた電気泳動像の一例。“w”の表記があるレーンにおける203 bpのバンドは*chd_wF*と*chd_wR*のプライマーセットで増幅されたDNAを示している。“m”の表記があるレーンにおける203 bpのバンドは*chd_mF*と*chd_wR*のプライマーセットで増幅されたDNAを示している。635 bpのバンドは内部コントロールとして増幅したDNAを示している。(C) Allele-specific PCRの解析結果。“negative”に分類された個体は標的ヌクレオチドの置換変異を有しないと判定した。“positive”に分類された個体は標的ヌクレオチドの置換変異を有すると判定した。各項目の出現数を枠内に記載した。(D) “positive”に分類された12個体に対するシーケンシングの結果。波形データの出現数を波形データ下部の枠内に記載した。赤色の矢頭はC>T置換が検出された標的ヌクレオチドの位置を示している。

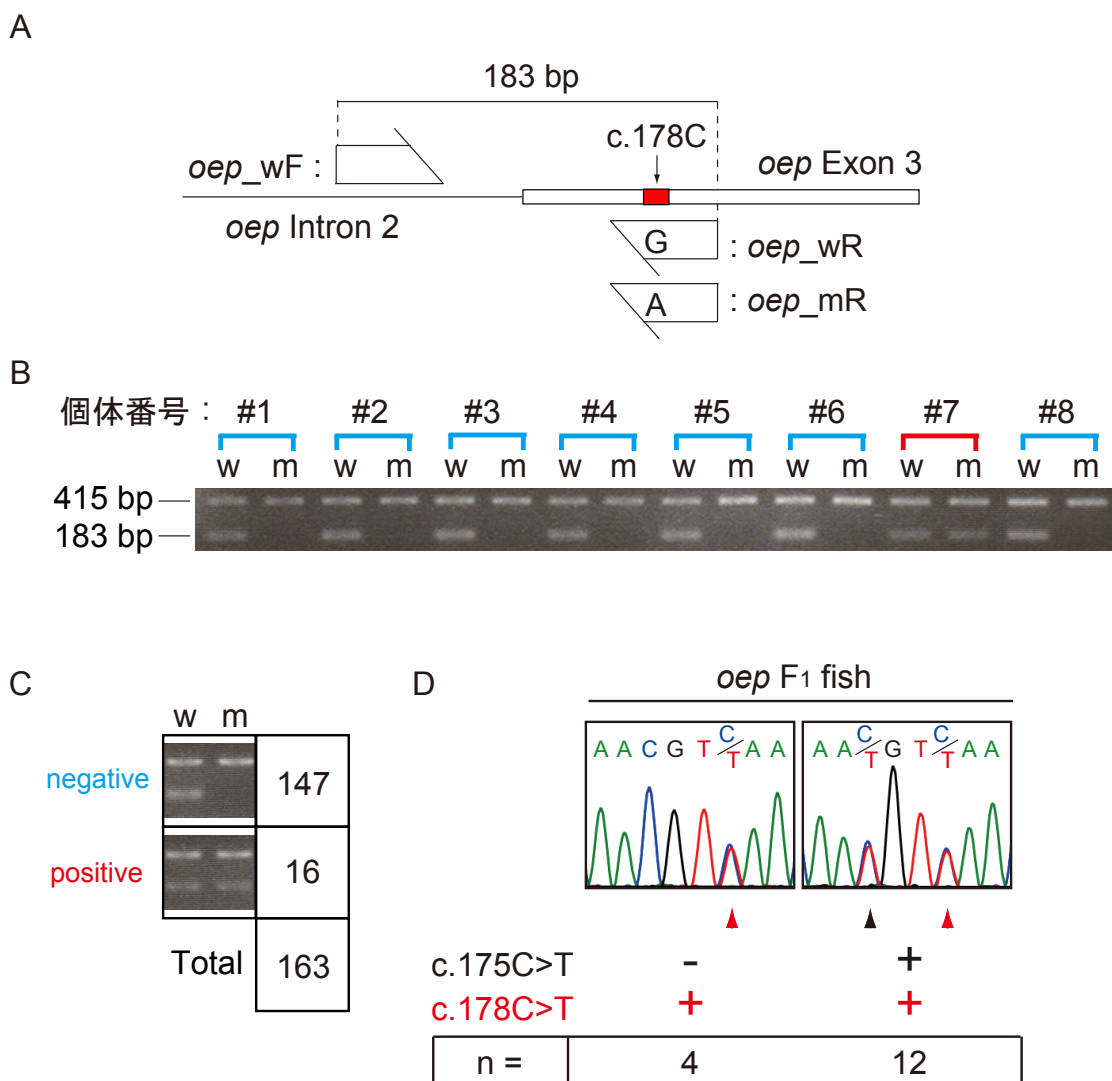


Figure 17. *oep*遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有する*oep* F₁ fishの同定

(A) *oep*遺伝子における標的ヌクレオチドの置換変異を検出するために行った Allele-specific PCRの概略図。標的ヌクレオチドを構成するC (c.178C)の位置を赤色で示した。(B) Allele-specific PCRにより得られた電気泳動像の一例。“w”の表記があるレーンにおける183 bpのバンドは*oep_wF*と*oep_wR*のプライマーセットで増幅されたDNAを示している。“m”の表記があるレーンにおける183 bpのバンドは*oep_wF*と*oep_mR*のプライマーセットで増幅されたDNAを示している。415 bpのバンドは内部コントロールとして増幅したDNAを示している。(C) Allele-specific PCRの解析結果。“negative”に分類された個体は標的ヌクレオチドの置換変異を有しないと判定した。“positive”に分類された個体は標的ヌクレオチドの置換変異を有すると判定した。各項目の出現数を枠内に記載した。(D) “positive”に分類された16個体に対するシーケンシングの結果。各波形データの出現数を波形データ下部の枠内に記載した。赤色の矢頭はC>T置換が検出された標的ヌクレオチドの位置を示している。黒色の矢頭はC>T置換が検出された標的ではないヌクレオチドの位置を示している。

	Sequence (5' -3')	# of mutated alleles in <i>chd</i> F1 fish
off-target candidate #1	GAGGCGAGAGTAGCCGGCGAGGGGA <u>AA</u> GAG	0/48
off-target candidate #2	AAGCGA <u>T</u> GAGGAGCTGGCGAGGGGA <u>CAG</u> CC	0/48
off-target candidate #3	GAGAAC <u>GGAGAC</u> GCTGGCGAGGGGA <u>CGG</u> CT	0/48

Figure 18. *chd*遺伝子の標的化に際するoff-target効果の検証

黒枠で囲まれたDNA配列はPAM配列を示している。下線が引かれたDNA配列は *chd* sgRNAによる認識が予想される配列を示している。PAM配列上と *chd* sgRNAの認識予想配列上に赤色で記載された塩基は *chd* 遺伝子上の標的配列と異なる塩基を示している。

	Sequence (5' -3')	# of mutated alleles in <i>oep</i> F ₁ fish
off-target candidate #1	GTTGGCGGTC <u>TCCGCAGCAACGCCG</u> CAGTG	0/48
off-target candidate #2	ATGTCCC <u>CTCATTACCGCCACGCCG</u> GGGGT	0/48

Figure 19. *oep*遺伝子の標的化に際するoff-target効果の検証

黒枠で囲まれたDNA配列はPAM配列を示している。下線が引かれたDNA配列は *oep* sgRNAによる認識が予想される配列を示している。PAM配列上と *oep* sgRNAの認識予想配列上に赤色で記載された塩基は *oep* 遺伝子上の標的配列と異なる塩基を示している。

野生型胚

chd^{c.232C>T/c.232C>T} 胚

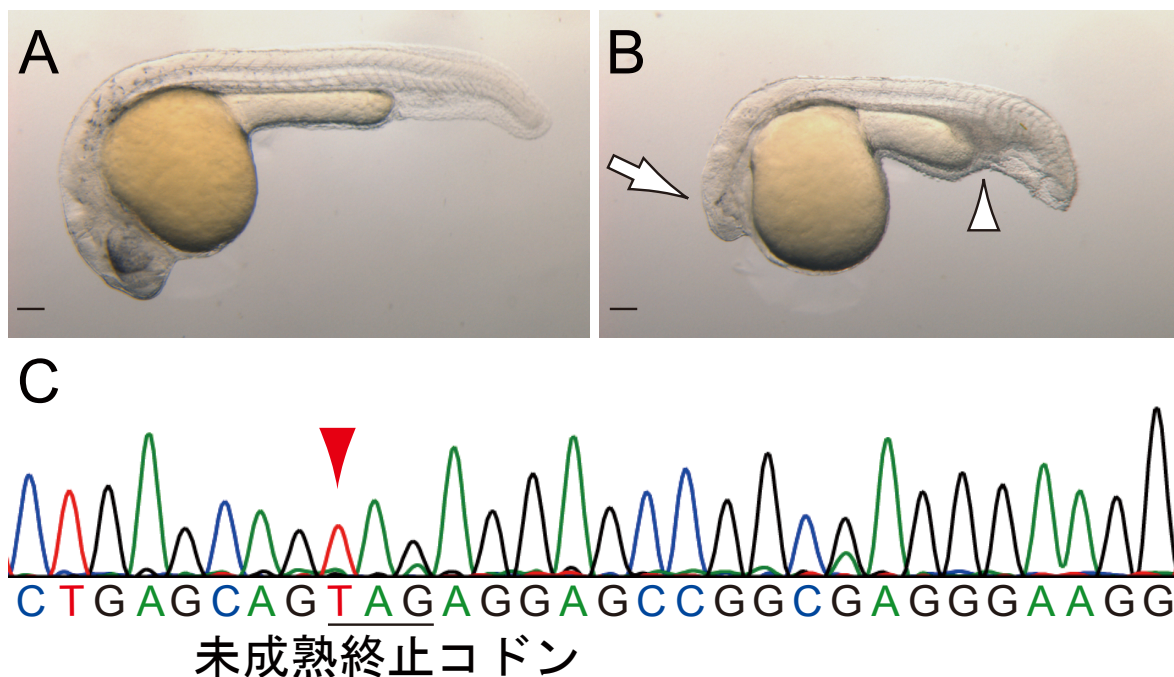


Figure 20. *chd*遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有するホモ接合体は頭部縮小と血島拡大の表現型を示す

受精後24時間における(A)野生型胚および(B) *chd*^{c.232C>T/c.232C>T} 胚の表現型。白色の矢印と矢頭はそれぞれ縮小した頭部と拡大した血島を示している。これらは *chd* 遺伝子の欠失変異体に特徴的な表現型である。スケールバーは100 μ mを示している。(C) *chd* 遺伝子の欠失変異体に特徴的な表現型を示した *chd* F₂ embryo に対するダイレクトシーケンシングの結果。赤色の矢頭は標的ヌクレオチドの位置を示している。*chd* 遺伝子の欠失変異体に特徴的な表現型を示した *chd* F₂ embryo は TAG の未成熟終止コドン を有していることが明らかになった。

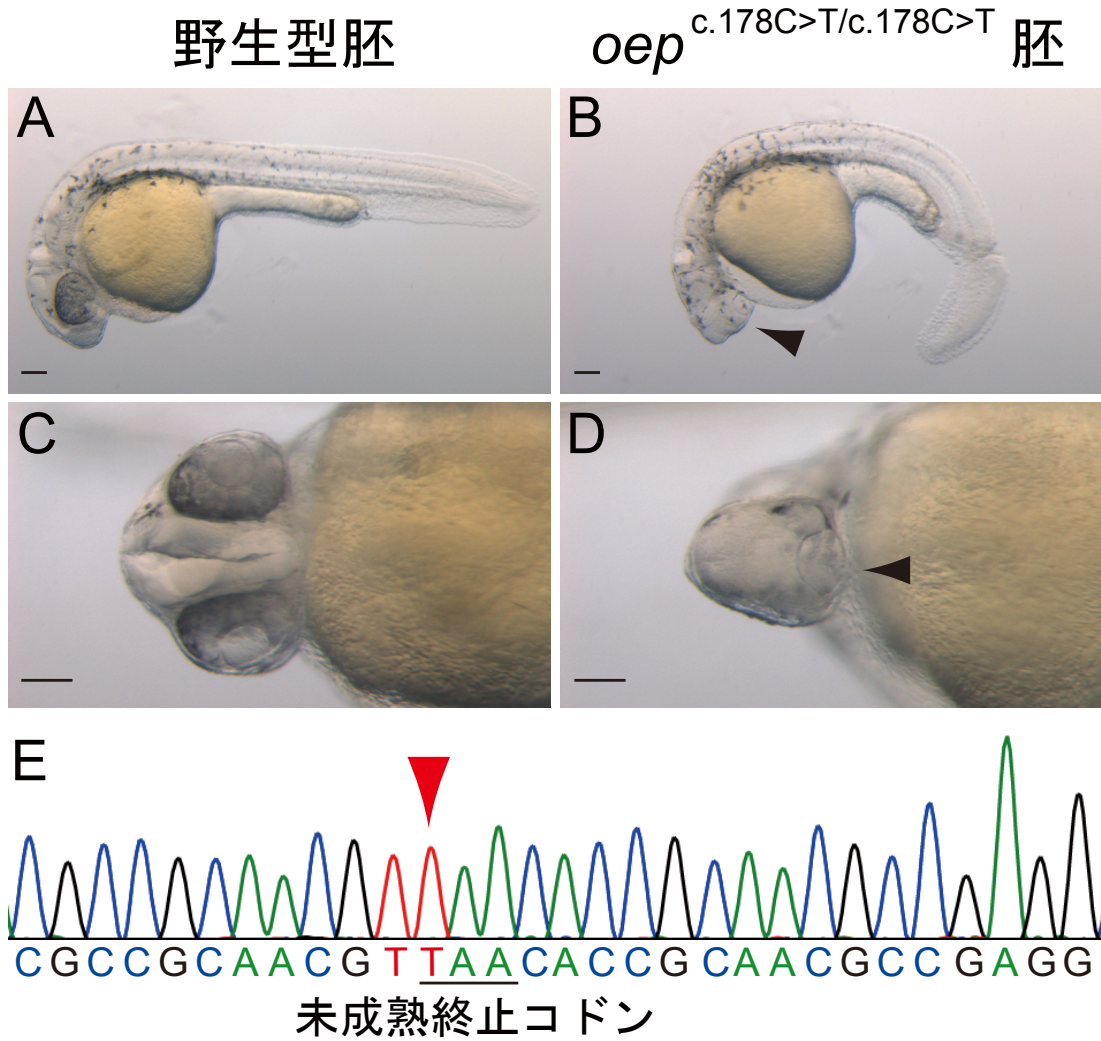


Figure 21. *oep*遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有するホモ接合体は単眼の表現型を示す

受精後27時間における(A, C)野生型胚および(B, D)*oep*^{c.178C>T/c.178C>T}胚の表現型。黒色の矢頭は*oep*遺伝子の欠失変異体に特徴的な単眼の表現型を示している。スケールバーは100 μmを示している。(E)*oep*遺伝子の欠失変異体に特徴的な表現型を示した*oep* F₂ embryoに対するダイレクトシーケンシングの結果。赤色の矢頭は標的ヌクレオチドの位置を示している。*oep*遺伝子の欠失変異体に特徴的な表現型を示した*oep* F₂ embryoはTAAの未成熟終止コドンを持っていることが明らかになった。

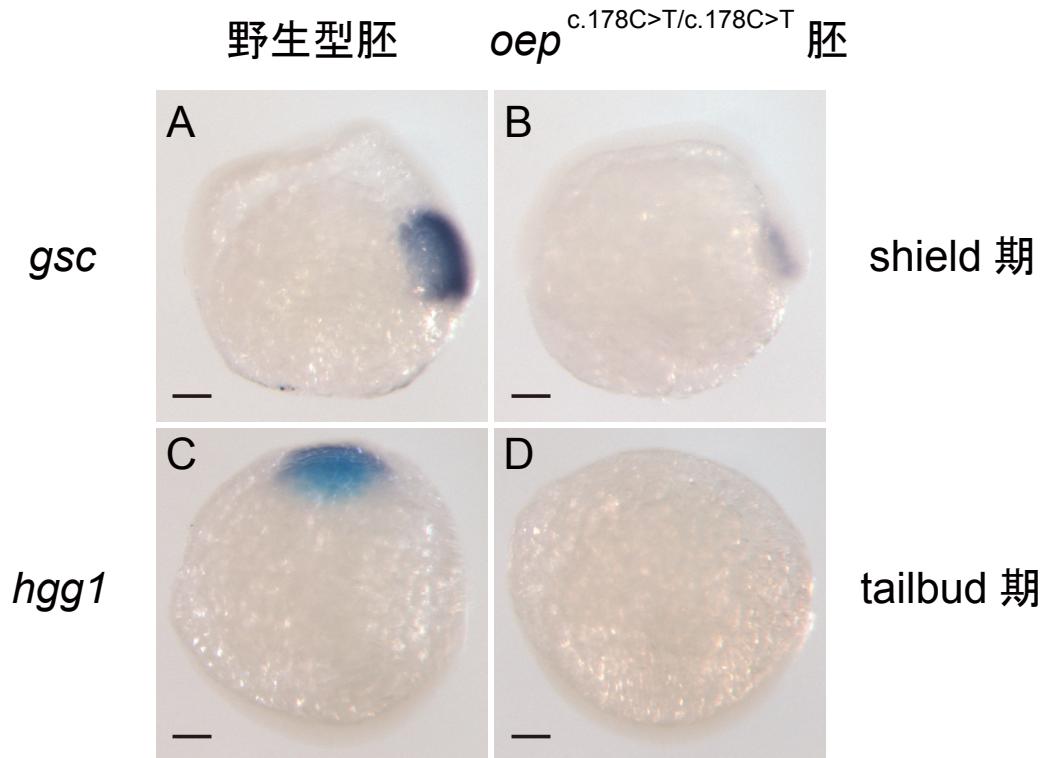


Figure 22. *oep*遺伝子に標的ヌクレオチドの置換変異を有するホモ接合体は中胚葉マーカーの発現低下を示す

Whole-mount *in situ* hybridization (WISH)によるmRNAの検出。(A)野生型胚および(B) *oep*^{c.178C>T/c.178C>T}胚のshield期における*gsc*遺伝子の発現パターン。胚をlateral viewで撮影した。(C)野生型胚および(D) *oep*^{c.178C>T/c.178C>T}胚のtailbud期における*hgg1*遺伝子の発現パターン。胚をdorsal viewで撮影した。WISH染色胚のジェノタイピングはAllele-specific PCRにより行った。スケールバーは100 μmを示している。

Table 1. 本研究で用いたオリゴヌクレオチドのリスト

Oligonucleotides name	Sequence (5' -3')
<i>chd_sense</i>	TAGGAGAGGAGCCGGCGAGGGA
<i>chd_antisense</i>	AAACTCCCTCGCCGGCTCCTCT
<i>chd_HMA_F</i>	AAACAAACAAGACTCACCTGAG
<i>chd_HMA_R</i>	GTCGGATCTGGACAGTCC
<i>chd_cloning_F</i>	CTTGGATCCGTTCACTTCCACTGTGGCAACC
<i>chd_cloning_R</i>	CTTAAGCTTAGGTCGGATCTGGACAGTCC
<i>chd_direct_F</i>	GTTCACTTCCACTGTGGCAACC
<i>chd_direct_R</i>	AGGTCGGATCTGGACAGTCC
<i>chd_wF</i>	TGTGTTTTGTCTCTGAGCATC
<i>chd_mF</i>	TGTGTTTTGTCTCTGAGCATT
<i>chd_wR</i>	AAACGCCAGACTGTGTTTCC
<i>chd_bF</i>	CACCGGTGAGTCTCCAATAGG
<i>chd_bR</i>	ACTCTGTTGGCTATCATCGACC
<i>chd_off1_F</i>	CTCATTCTGTTCCAGCTCCG
<i>chd_off1_R</i>	TACACCTACAGAGCTCCAGC
<i>chd_off2_F</i>	AATCAGGTAAGCACAGTGCC
<i>chd_off2_R</i>	CAATGAGCTCCAGTTCTCCG
<i>chd_off3_F</i>	GGTCACTGCAGAAGTTGTCC
<i>chd_off3_R</i>	TGTGACCTCGTATCCTCTCG
<i>oep_sense</i>	TAGGGTCAACACCGCAACGCCG
<i>oep_antisense</i>	AAACCGGCGTTGCGGTGTTGAC
<i>oep_HMA_F</i>	GGAAAGCCAAAGCAATACGC
<i>oep_HMA_R</i>	AATGACAATCTCACCTCCGG
<i>oep_cloning_F</i>	GTTGGATCCTCCGTGCGTGACTGTATTTC
<i>oep_cloning_R</i>	CTTAAGCTTTCAGTTTTTCATGTCAGTGTG
<i>oep_direct_F</i>	CCGTGCGTGACTGTATTTC
<i>oep_direct_R</i>	GCAGTTTTTCATGTCAGTGTGC
<i>oep_wF</i>	TCCGTGCGTGACTGTATTTC
<i>oep_wR</i>	TCGGCGTTGCGGTGTTG
<i>oep_mR</i>	CTCGGCGTTGCGGTGTTA
<i>oep_bF</i>	ACAGTGCTGCGGATAACTCG
<i>oep_bR</i>	CCACATCTGCAGTACGAACATCC
<i>oep_off1_F</i>	GGTGCAACTGTGAGGAACG
<i>oep_off1_R</i>	TGCATATTCGAGCCTTCACG
<i>oep_off2_F</i>	TCTGAGGTCTGAAGGGCAG
<i>oep_off2_R</i>	TGGTTGTGTAATGCAAGTGC
M13 forward	GTA AACGACGGCCAG
M13 reverse	GGAAACAGCTATGACCATG