

2022年1月17日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
国立研究開発法人理化学研究所

ゲノム編集の結果を正しく理解する ～複雑なゲノム編集変異を網羅的に解析する手法を開発～

ゲノム編集技術を用いることで狙った遺伝子を意図した通りに改変することが可能になりましたが、その際、意図しない形で遺伝子が改変されることもあります。本研究では、ゲノム編集で狙った遺伝子に意図した改変が起きたのか、それとも、意図しない改変が起きたのかを自動的に識別・分類する手法を開発しました。

実験用マウスの受精卵でのゲノム編集では、たった一塩基のみの意図した通りの改変や、目的の遺伝子領域の切除、少し離れた二箇所の染色体部位への他の生物種に由来する遺伝子配列の挿入が可能です。しかし、これらの「意図した遺伝子改変」を生じさせようとする、標的としていない数塩基が欠失・挿入されてしまったり、想定を超える染色体領域が欠失・逆位となる「意図しない遺伝子改変」が起きたりすることもあります。困ったことに、意図した遺伝子改変が片側(母方もしくは父方)の染色体上で生じている時に、もう片側(父方もしくは母方)の染色体では意図しない遺伝子改変が起きることもあります。

意図した遺伝子改変マウス系統を実験に使用するためには、ゲノム編集を施された受精卵から発生した数十匹のマウスから「意図した改変遺伝子」を持つマウスを遺伝子検査で特定する必要があります。本研究で開発した遺伝子検査法では、約100匹のマウスのそれぞれでどのような遺伝子改変が生じたのか、網羅的かつ正確に、簡便に特定できます。この遺伝子検査手法はゲノム編集実験にかかる期間の短縮やその正確性の向上に寄与すると期待されます。

研究代表者

筑波大学医学医療系

水野 聖哉 准教授

理化学研究所バイオリソース研究センター 実験動物開発室

綾部 信哉 専任研究員

研究の背景

ゲノム編集技術の発展により、内在遺伝子のゲノム DNA 配列を迅速かつ自在に書き換えることが可能になりました。ここ数年のゲノム編集技術の黎明期には、標的遺伝子領域以外にも変異が生じるオフターゲット効果がゲノム編集の危険因子であると警鐘が鳴らされていました。マウスモデルでは、複数の異なる標的配列を同一標的遺伝子内にそれぞれ設定し、そこから誕生した各遺伝子改変マウス系統が同一の表現型を示すかを観察することで、オフターゲット効果が表現型に与える影響を検証できます。その結果、遺伝子改変マウスモデルにおけるオフターゲット効果の危険性は限定的であり、むしろ、標的遺伝子領域(オンターゲットサイト)における予想外の「意図しない変異」の危険性が現在では問題視されています。当初、マウス受精卵ゲノム編集で生じる「意図しない変異」は数十塩基対以下の indel(insertion and deletion)変異だけだと見込まれていました。しかし最近、1,000 塩基対を超える大幅な欠失変異が頻繁に生じることが明らかになりました。また、二細胞期胚以降で生じたゲノム編集により誕生するモザイク個体(注 1)も頻出し、このモザイク個体では「意図する変異」と「意図しない変異」をそれぞれ保持する細胞が交じりあった状態となります。オフターゲット効果と違い、「意図しない変異」の危険性は複数の系統を用意しても除去できず、唯一の解決手段は正確な遺伝型解析ですが、現在まで「意図する変異」と「意図しない変異」の両者を正確かつ迅速に検出する手法はありませんでした。

研究内容と成果

マウスの受精卵ゲノム編集で生まれた、アレル数が不明なモザイクマウスが保持するオンターゲットサイト変異を網羅的に特定するためには、数多くの DNA 配列を並列的に決定できる次世代シーケンス技術が適しています。加えて、既存の short-read 次世代シーケンサーでは Flox アレル(注 2)や「意図しない変異」の配列を決定することが困難であるため、ナノポアロングリードシーケンサー(注 3)を利用しました。具体的には、数多くのマウスの遺伝型解析を同時に遂行するため、それぞれ異なるバーコード配列を付加した複数のマウスに由来するロング PCR 産物をナノポアロングリードシーケンサーで解析する系の確立を目指しました。ナノポアロングリードシーケンサーは高価な解析装置を必要としないメリットがありますが、シーケンスエラー率が高いのが弱点です。そこで、ナノポアロングリードシーケンサーで得られた生データに含まれる多数のマウスが持つそれぞれの変異アレルを一網打尽にするため、(1)シーケンスエラーの自動補正機能、(2)多サンプル解析機能、および(3)「意図しない変異」と「意図した変異」を自動で識別・分類する機能を持つオンターゲットサイト解析ソフトウェア「Determine Allele mutations and Judge Intended genotype by Nanopore sequencer (DAJIN)」を開発しました。DAJIN はオープンソース・ソフトウェアとして公開されており(<https://github.com/akikuno/DAJIN>)、誰でも自由に使用できます。

受精卵ゲノム編集で作製した点変異マウス・遺伝子領域欠失マウス・Flox マウスの遺伝型を実際に DAJIN で解析した結果、点変異・欠失・逆位・Flox ノックインなどを含む「意図した変異」と「意図しない変異」の両方を 1 塩基の分解能で自動的に識別し、分類できました。加えて DAJIN では、1 回のナノポアロングリードシーケンスで約 100 匹のマウスを同時に解析できました。

今後の展開

DAJIN を用いた多検体の遺伝型解析は、既存の方法に比べ、汎用性・拡張性・利便性に優れており、ゲノム編集で生じた変異を決定するためのスタンダードな手法となると期待できます。今後 DAJIN の解析能力をより上昇させることで、マウスの受精卵ゲノム編集で生まれたアレル数が不明なモザイクマウス

よりもさらにヘテロな集団が生じる培養細胞でのゲノム編集や、in vivo ゲノム編集の解析にも応用できると考えられます。

参考図



図 DAJIN の概要

ナノポアロングリードシーケンサーによって得られる DNA 配列と DAJIN によって、意図した変異を持つマウスかそうでないかを迅速かつ正確に同定できる遺伝子解析技術を開発した。

シーケンサーの図は DOI: 10.7875/togopic.2017.35 (© 2016 DBCLS TogoTV) を改変し使用。

用語解説

注1) モザイク個体

マウスの受精卵ゲノム編集では一細胞期の段階の受精卵にゲノム編集因子を導入するが、卵割が生じた二細胞期以降に各割球で独立したゲノム編集が生じることがある。その場合、異なる遺伝型を持つ細胞が交じり合ったモザイクマウスが誕生する。

注2) Flox アレル

標的とする遺伝子やエクソンの上下流に LoxP 配列が挿入された遺伝子改変アレル。この Flox アレルを持つマウスと、特定の組織で Cre 酵素を発現するマウスを交配することで、その組織でのみ標的遺伝子の機能が欠失した条件付きノックアウトマウスが誕生する。

注3) ナノポアロングリードシーケンサー

微細な穴が空いたタンパク質(ナノポア)に配列を解析したい DNA や RNA を通過させ、その際に生じる電流を測定することで、DNA や RNA の配列を測定するシーケンサー。

研究資金

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)、科研費、JST 共創の場形成支援プログラム、他の研究プロジェクトの一環として実施されました。

掲載論文

【題名】 DAJIN enables multiplex genotyping to simultaneously validate intended and unintended target genome editing outcomes.

(DAJIN は意図するゲノム編集変異と意図しないゲノム編集変異を網羅的に識別・分類する。)

【著者名】 Kuno A, Ikeda Y, Ayabe S, Kato K, Sakamoto K, Suzuki RS, Morimoto K, Wakimoto A, Mikami N, Ishida M, Iki N, Hamada Y, Takemura M, Daitoku Y, Tanimoto Y, Dinh TTH, Murata K, Hamada M, Muratani M, Yoshiki A, Sugiyama F, Takahashi S, Mizuno S

【掲載誌】 PLOS Biology

【掲載日】 2022年1月18日

【DOI】 10.1371/journal.pbio.3001507

問い合わせ先

【研究に関すること】

水野 聖哉 (みずの せいや)

筑波大学医学医療系 准教授

URL: <https://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/lab-animal/>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

理化学研究所 広報室 報道担当

E-mail: ex-press@riken.jp