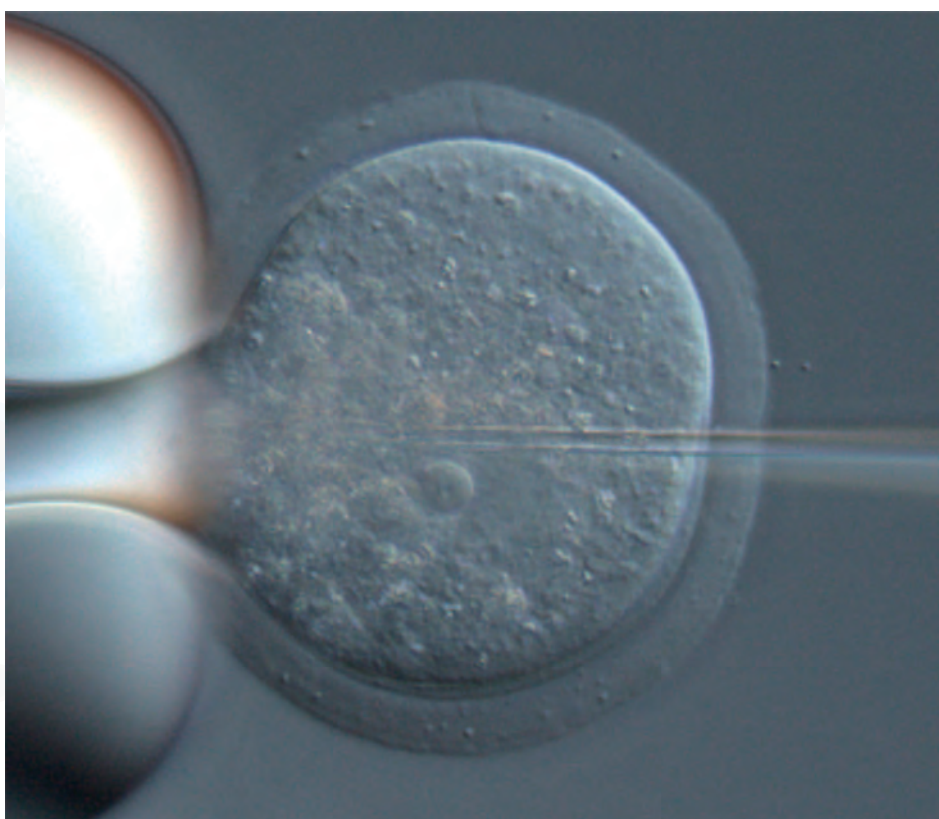


vol. 1

クローニング不要！ gBlocks®-based CRISPR/Cas9による ノックアウトマウスの作製

放射線医学総合研究所 研究基盤センター 生物研究推進課
塚本 智史（主任技術員）



はじめに

TALEN や CRISPR/Cas9 に代表されるゲノム編集ツールの登場と普及によって、以前よりも格段にノックアウトマウスの作製が短時間かつ低コストで可能となっている。CRISPR/Cas9 は、single guide RNA (sgRNA) と呼ばれる小分子 RNA が標的 DNA を認識して、sgRNA に誘導された Cas9 スクレアーゼがゲノム DNA を切断する。したがって、CRISPR/Cas9 を用いてゲノム編集を行うためには、標的遺伝子ごとに設計した sgRNA と Cas9 の 2 つの因子が必要になる。

通常は、専用に開発された pX330 ベクター^[1]などに sgRNA の認識配列となるオリゴ DNA をクローニングすることで、これら 2 つの因子を発現するベクターを構築する。しかし、筆者は人工の二本鎖 DNA である gBlocks® を用いることで、プラスミドを構築する手間なく sgRNA を精製し、Cas9 スクレアーゼと共に受精卵へ顕微注入することでノックアウトマウスを作出している（次ページ図 1 参照）。本レポートでは、gBlocks® を利用した CRISPR/Cas9 によるノックアウトマウスの作製法について解説する。

準備するもの

- T7 プロモーターから転写可能な sgRNA の全長をコードする二本鎖 DNA (gBlocks®, IDT-MBL KK)
- T7 プロモーターから転写可能な Cas9 をコードする DNA (プラスミドや PCR 産物など)
Addgene や Sigma-Aldrich Co. LLC. から入手・購入可能。最近では、Cas9 の mRNA やペプチドも市販されている。
- mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA Transcription Kit (Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific Inc.)
Cas9 mRNA 転写用
- MEGashortscript T7 Kit (Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific Inc.)
sgRNA 転写用
- MEGAclean Kit (Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific Inc.)
in vitro で転写した mRNA の精製に使用する。筆者は、フェノール・クロロホルムによる除タンパク質とエタノール沈殿でも精製しているが、MEGAclean Kit を使用した方が mRNA の回収量が多いようである。
- Surveyor® Mutation Detection Kits (IDT-MBL KK)
標的配列内の変異導入の有無を解析するためのキット (必要に応じて準備する。sgRNA の認識配列内に制限酵素配列がない場合など)。
- Ultrafree-MC centrifugal filter (Merck Millipore, Merck KGaA)
顕微注入の直前に本カラムを使って精製した mRNA から不純物を除去している。
- Guide-it sgRNA Screening Kit (タカラバイオ株式会社)
gBlocks® を鋳型にして精製した sgRNA の標的部位に対する切断活性を確認するためのキット。
- マウス
雌マウスは 8~12 週齢、雄マウスは 9 週齢以上、移植用仮親マウス (ICR/MCH、精管結紮雄と同居させて移植当日の朝に膣診が確認できたもの)、里親マウス (ICR/MCH)。
筆者は、C57BL/6 マウスの体外受精卵 (1 細胞、受精 5 時間目頃) を用いることが多いが、状況に応じて凍結しておいた 1 細胞も用いている。
- 受精卵へ RNA を顕微注入するためのマニピュレーターシステム
筆者は Leica Microsystems K.K. の顕微鏡 (DMI3000B) とマニピュレーターシステムを使用している。
インジェクション針は Sutter Instrument Company のピペットプラー (IVF-P98) を用いてその都度作製している。

プロトコル

ここでは図1に示した流れに沿って、実際に筆者が行っている方法を項目ごとに解説する。

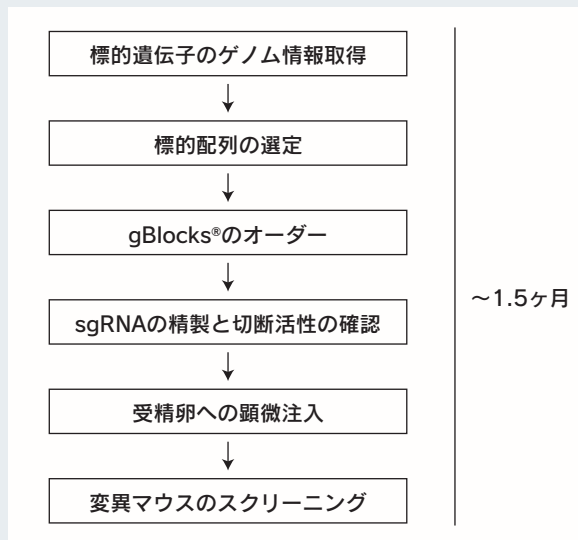


図1. 変異マウス作出の流れ

gBlocks®を利用したCRISPR/Cas9による変異マウス作出の流れを示す。標的遺伝子のゲノム情報取得からgBlocks®のオーダーと納品、gBlocks®を鋳型にしたsgRNAの精製と切断活性の確認までに2週間、受精卵への顕微注入からマウスの誕生までに3週間の期間（最短で一ヶ月半ほど）で目的とする変異マウスの作出が可能となる。

1 sgRNAの標的配列の選定からgBlocks®のオーダー

対象となる遺伝子のゲノム情報をUCSC Genome Browse (<http://genome.ucsc.edu/>) などから入手して、sgRNAの認識配列を選定する。筆者は、Jack Lin's CRISPR/Cas9 gRNA finder (<http://spot.colorado.edu/~slin/cas9.html>) や Guide RNA Target Design Tool (<https://www.blueheronbio.com/external/tools/gRNASrc.jsp>) を用いて候補を2つほど選んでいる。通常、開始コドンの下流側の近傍でsgRNAの認識配列内に制限酵素サイトが含まれるものを優先的に選んでいる（制限酵素サイトがあると変異導入の有無が容易に解析できるため）。次に、T7プロモーターから転写できるようにsgRNAの全長（Buffer sequence +

T7プロモーター配列 + 選定したsgRNA認識配列 + sgRNA scaffold : 130 bp) ^[1,2] をIDT-MBL KKの人工遺伝子合成受託サービス (http://ruo.mbl.co.jp/custom/custom_gene.html) 内のgBlocks® Gene Fragmentを選択して注文する。図2にマウスのRhot1 (ras homolog gene family, member T1) 遺伝子を例にして、sgRNAの認識配列とgBlocks®のDNA配列を示した。gBlocks®は乾燥粉末品(200 ng)として納品される。筆者はこれを10 µlのDNase-RNase-freeの水で融解して8 µlを転写用の鋳型として使用している（残りはDNAの濃度測定や電気泳動に使っている）。gBlocks®1本あたりのDNA含量は少ないが、一度の転写で十分量（数回の顕微注入分）のsgRNAが精製できるため問題とならない。

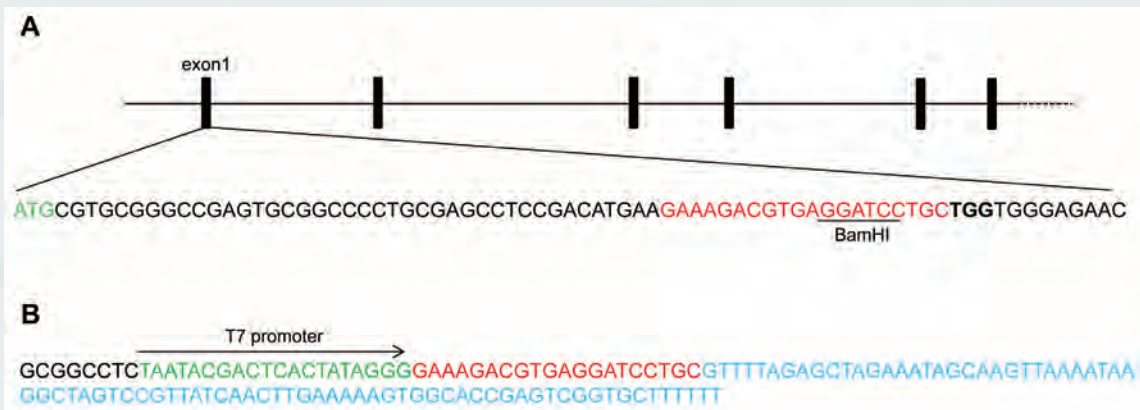


図2. Rhot1遺伝子を標的にしたsgRNAのデザイン

A. Rhot1遺伝子エクソン1の開始コドンを緑色、sgRNA認識配列を赤字、認識配列内の制限酵素サイト（BamHI）を下線、PAM配列を太文字で示す。

B. sgRNAを精製するために必要なgBlocks®の全長（130 bp）のDNA配列。5'末端側からBuffer Sequence（黒色）、T7プロモーター（緑色）、sgRNA認識配列（赤字）、sgRNA scaffold配列（青色）を示す。

※ Buffer Sequence : 125 bp以上必要となるgBlocks®を合成するための配列。

2 gBlocks® を鋳型にした sgRNA の転写と *in vitro* での切断活性の確認

本法はプラスミドの構築を省略できるものの、事前に培養細胞などに導入して切断活性を確認することが出来ないのがデメリットでもある。その結果、受精卵に導入して移植後に生まれてくるマウスに変異が挿入されることを期待するしかなく不安も多い。そこで、筆者はタカラバイオ株式会社から最近発売された Guide-it sgRNA Screening Kit を使うことで、事前に *in vitro* で合成した sgRNA の標的配列に対する切断活性を確認している。このキットには切断活性を確認するために必要な試薬が揃っており、標的配列を含む領域を PCR で増幅して、その精製産物と転写した sgRNA さらに付属の Cas9 スクレアーゼ（ペプチド）を試験管の中で 1 時間ほど反応させて、アガロースゲルで電気泳動することで、切断の有無を容易に確認することができる。筆者のこれまでの経験では、このキットで切断活性が確認できれば、受精卵へ導入した際にも高率に変異が起こる。なお、顕微注入に用いる Cas9 mRNA は、T7 プロモーターから転写できる Cas9 をコードするプラスミド（Addgene や Sigma-Aldrich Co. LLC. などから入手・購入可能）や転写に必要な領域を PCR で増幅して、その精製産物を鋳型として使用している。

3 RNA-injection による受精卵への導入とスクリーニング

標的遺伝子ごとに精製した sgRNA と Cas9 の mRNA のそれぞれを 10-20 ng/μl と 50 ng/μl になるように TE 溶液で希釈・混合して、Ultrafree-MC centrifugal filter を通して顕微注入に使用する。筆者は、体外受精 5 時間目頃の 1 細胞の細胞質へ顕微注入しているが、状況に応じて体外受精後に凍結しておいた受精卵も使っている。一回の顕微注入で使用する受精卵は 60 個前後を目安にして、翌日に正常に卵割した 2 細胞を 2~3 匹の偽妊娠マウスの輸卵管へ移植している。顕微注入や mRNA の質に問題がなければ、顕微注入した受精卵の 8~9 割が卵割する。なお、筆者は移植せずに余った受精卵がある場合は、数日培養して胚盤胞を用いて変異導入の有無を検討している。

4 変異マウスの検出

尻尾（2~3 mm）を採取して Proteinase K を含んだ溶解液中で、一晚 55℃ で反応させて溶解する。その後に溶解液を 95℃ で 3 分処理してから高速遠心（14,000 rpm、3 分）し、上清 1 μl を直接 PCR 反応に用いている。筆者は二つの方法で変異導入の有無を確認している。一つ目は、標的配列を含んだ 500 bp 前後を増幅できるプライマーで PCR を行い、この PCR 産物の一部を標的配列内

にある制限酵素で消化して、切断の有無を変異導入の指標にしている。また必要に応じて Surveyor® Mutation Detection Kits (IDT-MBL KK) を用いて変異導入の有無も検討している。二つ目は、精製した PCR 産物を用いて、さらに内部に設計したプライマーを用いてダイレクトシーケンスしている。アレル間の変異の違いなどをより詳細に解析する必要がある場合には、PCR 産物を TA クローニングするなどして数クローン程度をシーケンスする。

著者所感) 筆者の経験では、本法で作出した変異マウスは両アレルに変異を持つホモ型の変異であることが多い。この原因はよく分からないが、受精卵へ顕微注入する sgRNA や Cas9 の mRNA 濃度や受精後の導入時間などが影響するのかもしれない。

gBlocks® のご紹介

gBlocks® Gene Fragment はプラスミドに入っていない二本鎖 DNA を合成するサービスです。

本テクニカルレポートの CRISPR/Cas9 への利用のほかに、qPCR コントロール、コンストラクション、抗体のリコンビナント、酵素の基質、*in vitro* トランスクリプションなど、多種多様の用途に用いられています。

またその正確性から、クローニングを行っていない gBlocks® や、その gBlocks® を用いて転写したタンパク質によるスクリーニングも行われています。

詳細は MBL ライフサイエンスサイトにてご覧ください。
http://ruo.mbl.co.jp/custom/custom_gbblocks.html

MBL gBlocks

検索

Surveyor® のご紹介

Surveyor® Mutation Detection Kits は、遺伝子や DNA の変異や多型を検出するキットです。

詳細は MBL ライフサイエンスサイトにてご覧ください。
<http://ruo.mbl.co.jp/custom/surveyor.html>

MBL Surveyor

検索

実験例

マウスの Rhot1 遺伝子を標的にして、本法で Rhot1 変異マウスを作成した例を示す。デザインした gBlocks® を鋳型に精製した sgRNA の切断活性を確認後に、Cas9 の mRNA と混合して受精卵 (C57BL/6N マウス由来の体外受精卵: 1 細胞) へ顕微注射した。顕微注射した 1 細胞 (81 個) のうち 2 細胞へ発生した 76 個の中から 60 個を仮親へ移植し、20 匹の仔マウスが誕生した (図 3 A)。仔マウスの尻尾から DNA を採取して変異導入の有無を検討したところ、すべてのマウスに変異が検出された (図 3 B、C)。なお、

誕生した仔マウスは外見上の異常は見当たらないものの、出生後数分以内に死亡した。この結果は、最近報告された Rhot1 遺伝子を全身でノックアウトした場合に観察される表現型と一致するものであった^[3]。これらのことから、死亡した仔マウスは Rhot1 遺伝子の両方のアレルに変異が導入されたことが推察される。

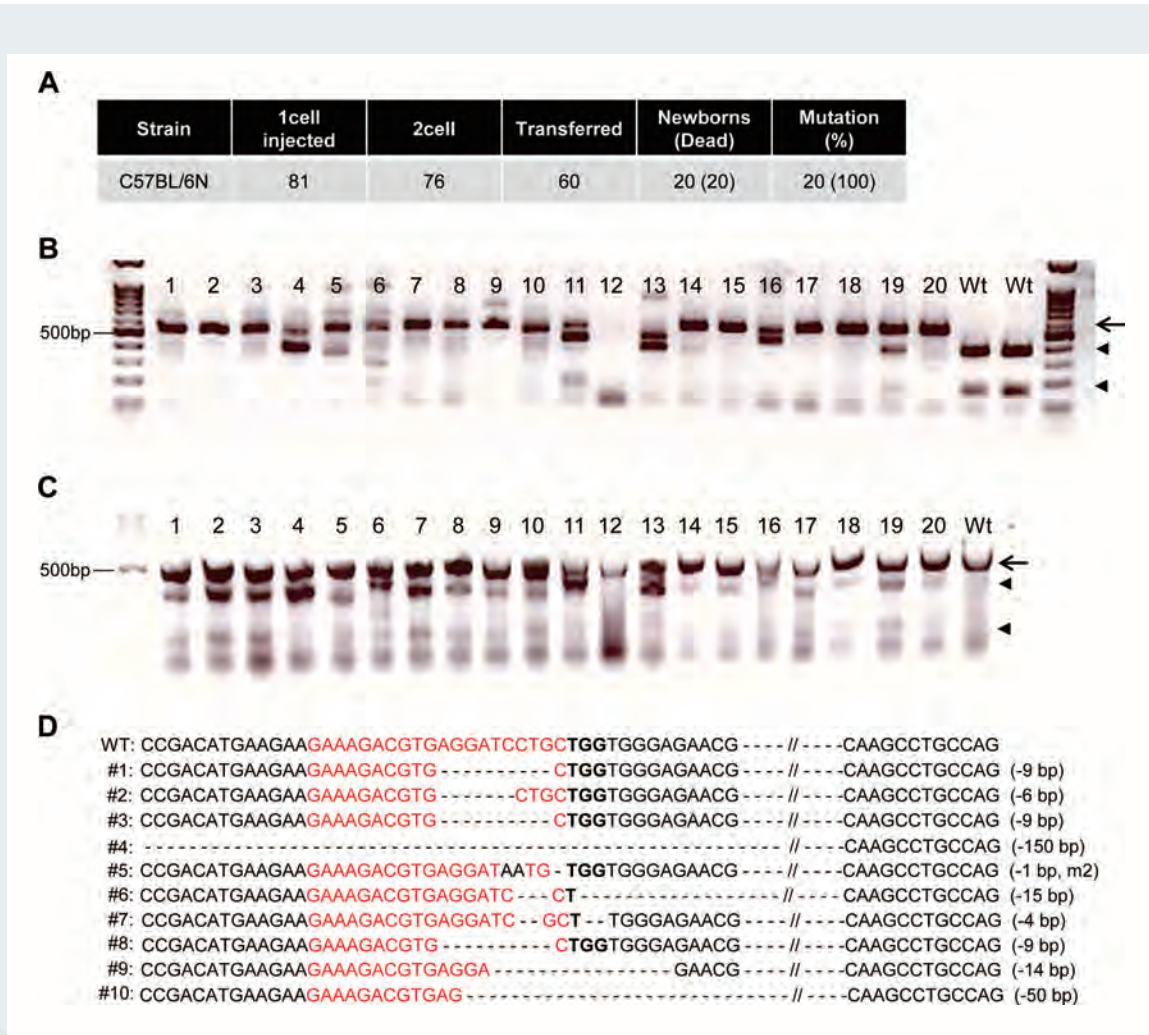


図 3. Rhot1変異マウスの作出とスクリーニング

顕微注射後に発生した 76 個の 2 細胞のうち、移植した 60 個から 20 匹のマウスが誕生した (図 3 A)。マウスの尻尾から抽出したゲノム DNA を用いて、標的配列を含む領域を PCR で増幅して制限酵素 BamHI で処理してアガロースゲルに泳動した写真を示す (図 3 B)。野生型 (Wt: 変異導入がない) マウスでは、増幅した PCR 産物 (560 bp: 図 3 B 矢印) が切断され 400 bp と 160 bp 付近の 2 本のバンド (図 3 B 矢頭) として検出された。一方で変異導入されたマウス (No.1 ~ 20) では PCR 産物の切断は確認されなかった (図 3 B)。同様に Surveyor Mutation Detection Kits を用いた解析から、変異導入されたマウス (No.1 ~ 20) でのみ Surveyor スクレアーズで切断されたバンド (図 3 C 矢頭) が検出された (図 3 C)。変異導入が予測されたマウス 10 匹 (No.1 ~ 10) のシーケンス解析の結果を図 3 D に示す。波形データを解析した結果、10 匹のうち 4 匹 (No.1、8、9、10) は両方のアレルに同じ変異が導入されたホモ型の変異で、残りはアレルごとに異なったパターンの変異が導入されたヘテロ型の変異マウスであると考えられる (図 3 B・C 写真提供: 放射線医学総合研究所 研究基盤センター 生物研究推進課 伊林恵美氏)。

著者注記) 出生した 20 匹のマウスのうち No.12 はシーケンス解析によって両アレルの変異を確認している

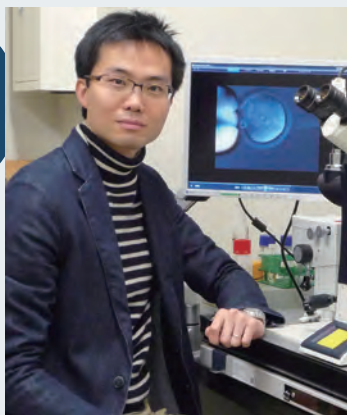
まとめ

gBlocks® を用いる本法は、標的遺伝子ごとに sgRNA を発現するためのプラスミドを構築する必要がないため、大腸菌を使った組換え実験や配列確認といった作業を省略できるメリットがある。gBlocks® の価格も安価で、MBL の Web サイトからの注文後 1 ~ 2 週間で手元に届く。また、筆者が本法で作製した変異マウスを用いた解析からは、オフターゲット効果による DNA の変異は見つかっていない。これらのことから、簡便さと正確さを備えた gBlocks® の利用は、CRISPR/Cas9 システムによるノックアウトマウス作製の際には特に有効なツールである。

参考文献

- [1] Cong, L. *et al.*, Science. **339**, 819-23, 2013.
- [2] Chang, N. *et al.*, Cell Res. **23**, 465-72, 2013.
- [3] Nguyen, T.T. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. **111**, E3631-40, 2014.

著者紹介



塚本 智史 (つかもと さとし)

放射線医学総合研究所 研究基盤センター 生物研究推進課 主任技術員

- 【経歴】2001年 神戸学院大学薬学部卒業 (薬剤師)
- 2007年 京都大学大学院農学研究科修了 (農学博士)
- 2007年 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科特任助教
- 2008年 放射線医学総合研究所基盤技術センター技術員
- 2013年 同研究所研究基盤センター主任技術員
- 2014年 東京農業大学非常勤講師

【抱負】「分解」の視点から受精卵の発生メカニズムを明らかにしたい。

【趣味】タマゴの研究、サッカー (ゴールキーパー専門)、散策

価格表

サービス名	対応配列長	価格 (税別)	納期	
gBlocks® Gene Fragment (※2本鎖DNA状態で納品)	gBlocks® 125-500	125~500 bp	¥14,000	1~2週間
	gBlocks® 501-750	501~750 bp	¥20,000	
	gBlocks® 751-1000	751~1,000 bp	¥24,000	2~3週間
	gBlocks® 1001-1250	1,001~1,250 bp	¥32,000	
	gBlocks® 1251-1500	1,251~1,500 bp	¥39,000	
	gBlocks® 1501-1750	1,501~1,750 bp	¥46,000	
	gBlocks® 1751-2000	1,751~2,000 bp	¥54,000	

サービス名	精製グレード	価格 (税別)
Surveyor® Mutation Detection Kit	Surveyor_ Mutation Detection Kit _ S25	¥16,800
	Surveyor_ Mutation Detection Kit _ S100	¥56,000
	Surveyor_ Mutation Detection Kit _ S1000	¥480,000