

令和 3 年度 修士論文

ゼブラフィッシュにおける CRISPR ゲノム編集技術を用いた
蛍光タンパク質レポーターのノックインと発現効率の至適化

Optimization of CRISPR genome editing mediated knock-in of
fluorescent protein reporters in zebrafish

高知工科大学大学院 基盤工学専攻 工学研究科 生命科学コース

分子発生制御学研究室

盆子原 友希

指導教員

蒲池 雄介 教授

令和 4 年 3 月 3 日

目次

第 1 章	要旨.....	3
第 2 章	序論.....	4
第 3 章	結果.....	6
第 4 章	考察.....	18
第 5 章	材料と方法.....	20
第 6 章	参考文献.....	27
第 7 章	謝辞.....	29

第1章 要旨

CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術は、生命科学の発展を加速させる技術として注目を集めており、基礎研究にとどまらず、幅広い分野での活用が期待されている。特に医療分野では、ガンや希少疾病などの治療へ向けた応用が拡がりつつある。ゼブラフィッシュにおいても、このゲノム編集技術を利用し、未だ解明されていない遺伝子機能を明らかにすることは、ヒトの遺伝子機能の解明や疾患の原因追及につながると期待される。

胚における遺伝子機能の解明には、その発現の観察と、それがコードするタンパク質の解析が重要である。両者を同時に容易にする方法として、タグ配列とともにその下流にタンパク質の共発現を可能とする 2A 配列と蛍光タンパク質遺伝子をもつカセットを目的遺伝子にノックインする方法が考えられる。本研究では、ゼブラフィッシュゲノムへこのようなカセットをノックインすることにより、目的タンパク質へのタグ付けと胚における遺伝子発現の可視化を同時に実現させることを目指した。

これまでゼブラフィッシュにおいて CRISPR-Cas9 を利用し、目的の DNA 配列を正確にノックインした例は報告されているが、そのノックイン効率は一般的に低い[1,2]。また、短いタグ配列は比較的効率よくノックインされるが、蛍光タンパク質遺伝子を含むカセットは 1kb 程度の長さの DNA となることから、ゲノムへのノックインはさらに困難になる。そこで、最初にノックインを効率よく行える方法の確立を目指した。

まず、長い一本鎖 DNA (ssDNA) をドナーとした場合の蛍光タンパク質遺伝子カセットの *sox3* 遺伝子へのノックイン効率を調べた。今回は約 950nt のカセットとその両端にホモロジーアーム (HA) をもつ ssDNA である *sox3*(LHA)-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3-*sox3*(RHA) を、両方の DNA 鎖について作製した。5'側のホモロジーアームは 300nt、3'側のホモロジーアームは 50nt 長とした。この ssDNA ドナーと *sox3* の C 末部を切断する CRISPR-Cas9 RNP 複合体を同時にゼブラフィッシュ胚へ顕微注入した。そして、蛍光顕微鏡で GFP の発現を調べた後、受精後 1 日胚のゲノムを抽出し、PCR によりゲノムへのノックイン効率を調べた。その結果、どちらの鎖の ssDNA を使用するかがノックイン効率に大きく影響し、gRNA が結合するターゲット鎖の方がより効率が良かったことが分かった。しかし、PCR によりノックインが生じたことを確認できたにもかかわらず、GFP タンパク質の蛍光シグナルが観察できなかったことから、*sox3* 遺伝子へのノックインの効率はかなり低いことが示唆された。

次に、ノックイン効率を高めるために二本鎖 DNA (dsDNA) をドナーとした場合の蛍光タンパク質遺伝子カセットのノックイン効率を調べた。この際、プラスミドドナーが *in vivo* で 2 箇所切断され、直鎖状 dsDNA ドナーが作り出されるように、カセットの両端にユニバーサル gRNA (UgRNA) のターゲット配列を挿入した。UgRNA としては、先行研究[3]における GeneWeld 法で用いられたものと、私たちの研究[4]から得られた切断効率に影響を及ぼす crRNA の配列特徴のデータに基づき設計された新たな UgRNA の合わせて 2 つを試した。この UgRNA を HA の外側に隣接して挿入した UgRNA-*sox3*(LHA)-FLAGx3-2A-NLS-EGFP-loxP-*sox3*(RHA)-UgRNA プラスミドを作成した。このプラスミドをドナーとして用い、ユニバーサル UgRNA と *sox3* gRNA および Cas9 mRNA または *sox3* ユニバーサル RNP 複合体を同時にゼブラフィッシュ胚へ顕微注入した。そして、GFP の発現を調べた後、PCR によりゲノムへのノックイン効率を調べた。同時に *sox3* 部位でインデルが生じた頻度をサンガーシーケンスに基づく方法 (TIDE) で調べた。その結果、新たに設計した UgRNA の方がノックイン効率が高かった。しかし、この方法でも PCR によりノックインが生じたことを確認できたにもかかわらず、GFP タンパク質の蛍光シグナルは観察できなかった。この時 *sox3* 部位で生じたインデルの頻度は、*sox3* を切断するためのコンポーネントのみを用いた場合より、ノックインコンポーネントを加えた場合の方が低かった。このことより、ノックインコンポーネントの影響により *sox3* 部位での切断が起こりにくくなることもノックイン効率に影響している可能性がある。

第2章 序論

CRISPR-Cas9 システムは、標的遺伝子部位で二本鎖 DNA 切断 (DSBs) を行い、狙った部位を高精度かつ簡便に改変することができる技術である[5]。よって、強力なゲノム編集技術ツールとして、医療・農業・漁業など様々な研究分野において幅広く応用されている。中でも、医療分野においては、ガン化を促進する遺伝子発現の抑制や、希少疾病に関わる遺伝子のスイッチを制御可能にして発現量をコントロールするなど、ガンや希少疾病に対する応用が注目されている[6,7]。

ゼブラフィッシュは、発生過程を研究するためのモデルシステムとして広く使用されてきたが、ヒトの病気をモデル化するための貴重なシステムとしても利用されている。ゼブラフィッシュの器官の発生と機能はヒトのそれと非常に似ており、また変異体またはトランスジェニック魚の作成が容易であることから疾患モデルの作製も数多く行われてきた[8]。さらに、ゼブラフィッシュはヒトと高い遺伝的類似性を共有しており、ヒトの疾患に関連する遺伝子の約 70%にはゼブラフィッシュの機能的相同体が存在する[9]。よって、ゼブラフィッシュを用いて遺伝子機能を解析し、未だ解明されていない遺伝子の働きを理解することは、ヒトの遺伝子機能の解明や疾患の原因究明につながる。

そのゼブラフィッシュ胚における遺伝子機能の解明には、その発現のレポーター遺伝子を利用した観察や、それがコードするタンパク質の解析が重要である。両者を同時に容易にする方法として、タグ配列とともにその下流にタンパク質の共発現を可能とする 2A 配列と蛍光タンパク質遺伝子をもつカセットを目的遺伝子にノックインする方法が考えられる。2A 配列は、一つの読み枠から 2 つの個別のタンパク質を発現することができるため、この方法を用いることでタグ付き目的タンパク質と蛍光タンパク質を個別に発現させることが可能となる (図 1) [10]。加えて、CRISPR-Cas9 を用いたノックイン技術の利用により、部位特異的な目的配列の挿入が可能となる。

CRISPR-Cas9 は、Cas9 タンパク質に加えて CRISPR RNA (crRNA) とトランス活性型 crRNA (tracrRNA) の 2 つの RNA 分子からなるガイド RNA (gRNA) より構成されており、gRNA の crRNA が標的 DNA 上の標的配列を認識する。Cas9 酵素は 2 つの DNA 切断ドメインをもち、一方が標的 DNA の片方の鎖を、もう一方が反対鎖を切断し、合わせて 2 本鎖切断を引き起こす。DNA の二本鎖切断は Protospacer Adjacent Motif (PAM) 配列上流 3 塩基目と 4 塩基目の間で生じる。その後、切断された DNA の修復のために 2 種類の機構が引き起こされる。1 つは非相同末端結合 (NHEJ) で、DSBs 部位に挿入または欠損の変異を導入する。もう 1 つは相同組換え修復 (HDR) で、これを利用してドナー DNA を切断部位に挿入することにより、遺伝子へのノックインが可能になる。また、HDR を利用したノックインは、一塩基置換のような短鎖の挿入だけではなく、蛍光タンパク質レポーター遺伝子やプロモーターなどの長い配列の挿入にも用いられている。

よって、本研究では、修復経路としてドナー DNA による相同組換え修復を利用し、ゼブラフィッシュゲノム上の *sox3* を標的に、タグとともに 2A 配列と蛍光タンパク質遺伝子を含む約 950bp-1kbp のカセットをノックインした。相同組換え修復のドナー DNA テンプレートとして、一本鎖 DNA (ssDNA) と二本鎖 DNA (dsDNA) を用いる方法があるが、本研究では両者を比較した。

近年、ssDNA を相同組換え修復のドナーに用いることで、ノックイン効率が高まるとともに、ゲノムへのランダムな挿入が低減することが報告されていることより[1,11]、まず ssDNA を相同組換え修復ド

ナーとしたときのノックイン法の確立を目指した。さらに、ターゲティングベクターの *in vitro* または *in vivo* 線形化は、HDR を促すことが報告されていることから[12,13,14,15,16]、次に dsDNA を相同組換え修復のドナーに用いたときのノックイン法の効率化を目指した。

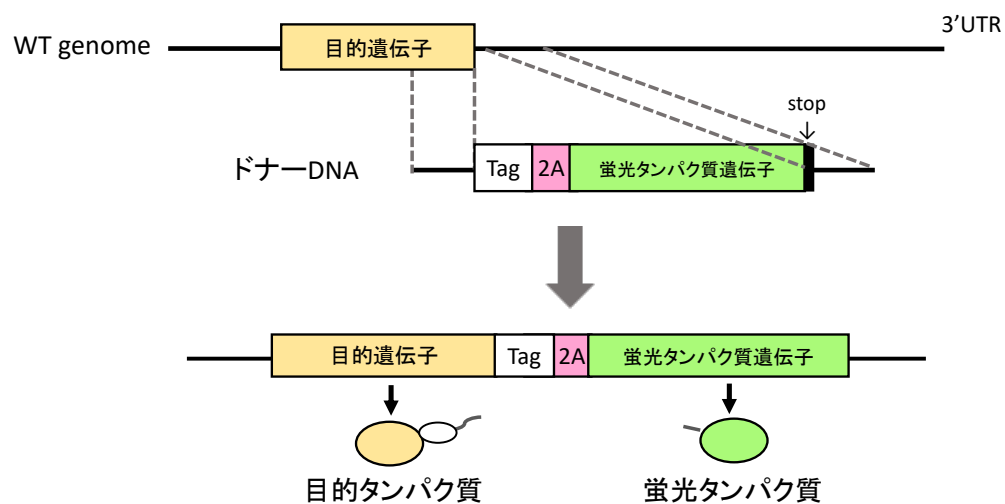


図 1. タグ配列、2A 配列、蛍光タンパク質遺伝子が連結されたカセットのノックイン

ゲノム上の目的遺伝子の C 末端相当部位に、タグ配列と共にその下流側に 2A 配列と蛍光タンパク質遺伝子をノックインすることで、タグ付き目的タンパク質と蛍光タンパク質を個別に発現させることができる。

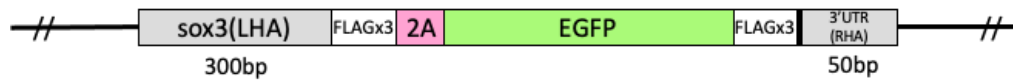
第3章 結果

一本鎖 DNA (ssDNA) を相同組換え修復ドナーとした場合の蛍光タンパク質遺伝子カセットのノックイン効率の評価

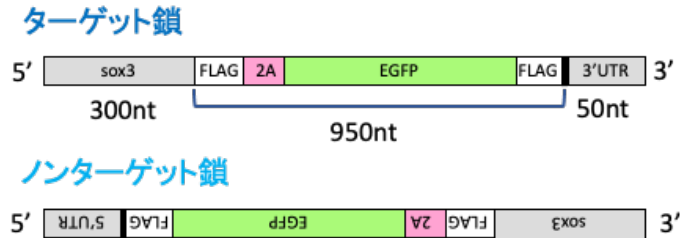
一本鎖 DNA (ssDNA) を相同組換え修復ドナーとしたときのノックイン効率を評価した。まず、ssDNA を調製するためのプラスミドを作製した。pCU19 ベクターを基本とし、目的遺伝子として *sox3*、蛍光タンパク質遺伝子として EGFP を用い、その間に 2A 配列を挿入した。また、Sox3 と EGFP タンパク質の同時検出が可能となるように、ペプチドタグとして FLAGx3 をそれぞれに付加した (図 2A)。このプラスミドから ssDNA を作製する際、ssDNA としては 2 つの鎖ができるが、どちらの鎖がノックイン効率が良いのかを比較するため両方を調製した。このとき、CRISPR で gRNA が結合する配列をターゲット鎖、その反対の鎖をノンターゲット鎖とした (図 2BC)。ssDNA のホモロジーアーム (HA) の長さに関しては、タグ配列のみをノックインした研究[1]で効率の高かったものとし、5'側は 300nt、3'側は 50nt とした。その後、ゼブラフィッシュゲノムの *sox3* C 末端へ約 950nt の配列をノックインするために、ssDNA と RNP 複合体を 1 細胞期のゼブラフィッシュ胚の卵黄嚢へ顕微注入した (図 2D)。

そして、70%-epibory と 24 hpf (hours post-fertilization) で蛍光を観察するとともに、25 hpf で DNA を抽出し、PCR を行うことでノックインが生じているかどうかを調べた。その結果、ノンターゲット鎖ではノックインアレルに由来するバンドを検出することはできなかったが、ターゲット鎖ではノックインバンドが見られた (図 3)。このことから、どちらの鎖の ssDNA を使用するかがノックイン効率に大きく影響し、*sox3* の場合、ターゲット鎖の方がより効率が良いことが分かった。しかし、PCR によりノックインが生じたことを確認できたにもかかわらず、GFP タンパク質の蛍光シグナルは観察できなかった。以上より、*sox3* 遺伝子へのノックインの効率はかなり低く、蛍光を可視化できるほどのタンパク質が発現されていないことが分かった。

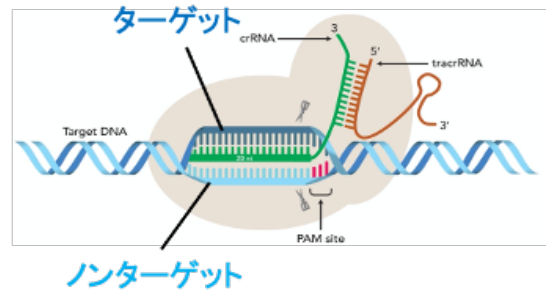
A



B



C



D

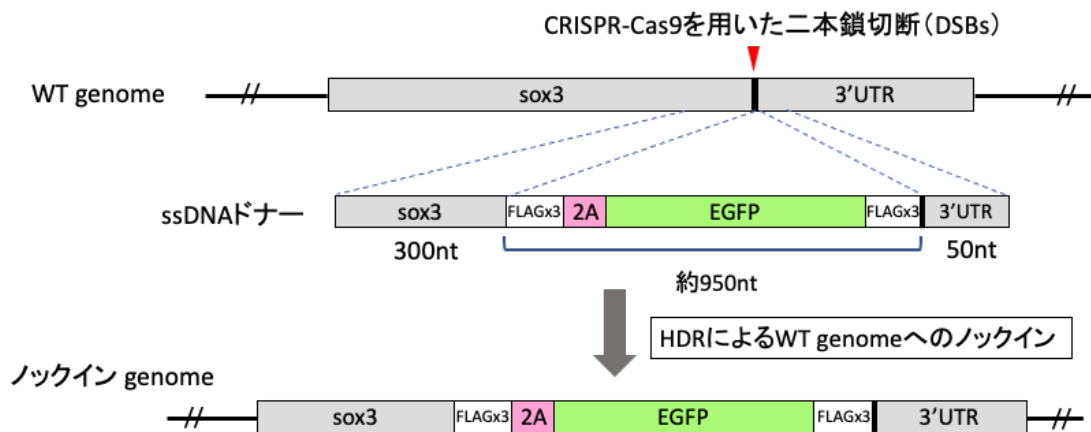


図 2. ssDNA を修復ドナーとしたときのノックイン法の概略

(A) 作製したプラスミド配列：pUC19-*sox3*-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3-3'UTR。HA の長さは 5'側を 300nt、3'側を 50nt とした。

(B) 2 つの ssDNA 配列。ターゲット鎖とノンターゲット鎖配列を示す。

(C) CRISPR-Cas9 におけるターゲットとノンターゲットを示す図。gRNA の crRNA 配列が結合するゲノムをターゲット、その反対のゲノムをノンターゲットと呼ぶ。画像は (<https://sg.idtdna.com/jp/site/alt-r.html>) から引用した。

(D) ssDNA ドナーを用いたゼブラフィッシュ *sox3* ゲノムへのノックイン法。*sox3* を標的とし、CRISPR-Cas9 により二本鎖切断 (DSBs) を誘導し、約 950nt の ssDNA をゼブラフィッシュゲノムへノックインする。配列中の太い黒線は、stop コドンを示している。

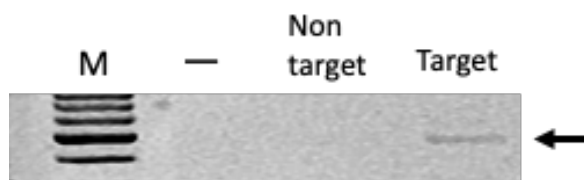


図 3. ssDNA ドナーを用いた場合のノックインアレルの検出

ssDNA と RNP 複合体を含む溶液を 1 細胞期のゼブラフィッシュ胚へ顕微注入後、PCR 反応した後、電気泳動した。－ は WT のゼブラフィッシュ胚から DNA を抽出し PCR を行った。ターゲット、ノンターゲットは、使用した ssDNA を示す。矢印は、ノックインが生じた場合に生じるアレルから増幅される約 500bp のバンドを示す。

in vitro CRISPR-Cas9 切断アッセイによるユニバーサルガイド UgRNA の切断効率の評価

以前の研究で、ターゲットコンストラクトの設計を簡便にし、Cas9 による in vivo でのドナーカセットの遊離を可能にするために、CRISPRScan を使用し最適な塩基組成を持つユニバーサルガイド RNA 配列 (UgRNA) が設計された[17]。そして、この UgRNA を活用し、ゲノム標的部位へ正確なゲノムの挿入を促進する戦略である GeneWeld が開発された[3]。この UgRNA を蛍光タンパク質レポーターカセットの両端に付加したドナープラスミドを in vivo で使用すると、二本鎖切断により遊離したレポーターカセットがゼブラフィッシュの *noto* 遺伝子標的部位に効率的な相同組換え修復を介してノックインされることが示されている[17]。

そこで、*sox3* 遺伝子において、UgRNA を用いた二本鎖 DNA (dsDNA) をドナーとした場合の蛍光タンパク質遺伝子カセットのノックイン効率を調べた。まず、UgRNA の設計を行い、今回 2 つの UgRNA を作製した。1 つ目は、先行研究[3]で用いられた UgRNA 配列で、UgRNA を用い in vivo で直鎖状の dsDNA ドナーにしてノックインする手法を GeneWeld 戦略と呼ぶため、UgRNA-GeneWeld(UgRNA-GW) とした (図 4C)。2 つ目は、私たちの研究[4]から得られたデータを元に新たに設計した UgRNA 配列である (図 4C)。この研究では、51 個の crRNA の切断効率データをもとに kpLogo ツールを用いて、crRNA の標的配列から切断効率に影響を与えている位置特異的な特徴を統計的解析により検出した (ヌクレオチドロゴの大きさによって可視化したデータを図 4AB に示す)。この配列特徴に基づき、UgRNA-GW の配列を CRISPR-Cas9 による切断により好ましいヌクレオチドに変更し、UgRNA-kpHigh(UgRNA-kpH)とした (図 4C)。この際、ゲノムへのオフターゲットも考慮した。

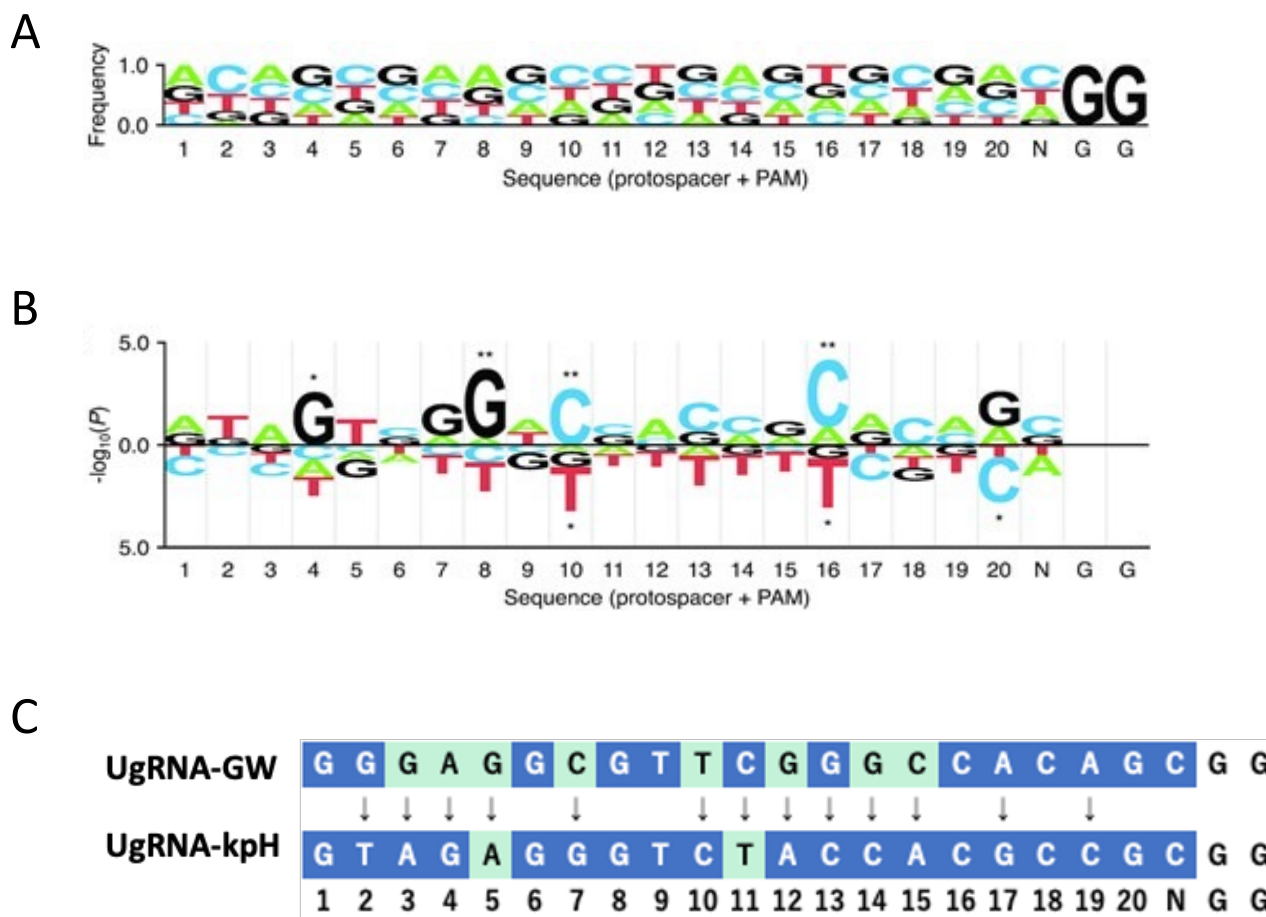


図 4. kpLogo で決定された位置固有のモノヌクレオチド機能とユニバーサル UgRNA の設計

(A) 51 個の crRNA における各位置のヌクレオチドの割合。位置 1 から 20 はプロトスペーサー配列、位置 21～23 は PAM 配列である。

(B) HiFi Cas9 で得られたモノヌクレオチドの特徴の kpLogo プロット。crRNA の配列特徴は、GitHub (<https://github.com/xuebingwu/kpLogo>) からインストールした kpLogo (v1.1) を使い、crRNA の標的配列と ICE で得られた切断効率を重み付けデータとして入力しログを生成した。上側は好ましいヌクレオチド、下側は好ましくないヌクレオチドを示し、各位置の統計的優位性を $-\log_{10}(P)$ とした。位置 1-20 はプロトスペーサー配列、NGG は PAM 配列である。 (** $P < 0.01 / 4 = 0.0025$; * $P < 0.05 / 4 = 0.0125$) (A), (B)は文献[4]より転載した。

(C) 作製した UgRNA。UgRNA-kpH は、(B)を元に UgRNA-GW を好ましいヌクレオチドと好ましくないヌクレオチドに分類し、好ましくないヌクレオチドを好ましいヌクレオチドに変更した。

次に、設計した2つのUgRNAをゼブラフィッシュ胚へ顕微注入する前に、crRNAの切断効率を評価するin vitro CRISPR-Cas9 切断アッセイを行った。NanoLucの間にUgRNAを1カ所含むプラスミドを製作し、crRNAが標的とする配列をPCRで増幅させ、精製したPCR断片を基質として使用した。また、顕微注入前にUgRNAがCas9 RNP複合体との混合溶液中で切断されないことの確認を行うため、酵素活性に必要なMgCl₂の有無が異なる2種類のバッファーを使用した。HiFi Cas9 RNP複合体による切断反応を行った後に、CRISPR-Cas9により切断されたフラグメント断片と非切断フラグメント断片をアガロースゲル電気泳動で分離し、ImageJを用いてバンドの濃淡を測定し、濃淡変化から切断効率を求めた(図5、表1)。その結果、予想通りMgCl₂を加えた方でのみUgRNA切断フラグメントのバンドが見られた。これは顕微注入前のMgCl₂を含まない溶液中ではUgRNAが切断されないことを示す。切断効率については、GWでは61.6%、kPHでは76.2%となり、好ましいヌクレオチドに変更したUgRNAの方で切断効率が向上した。

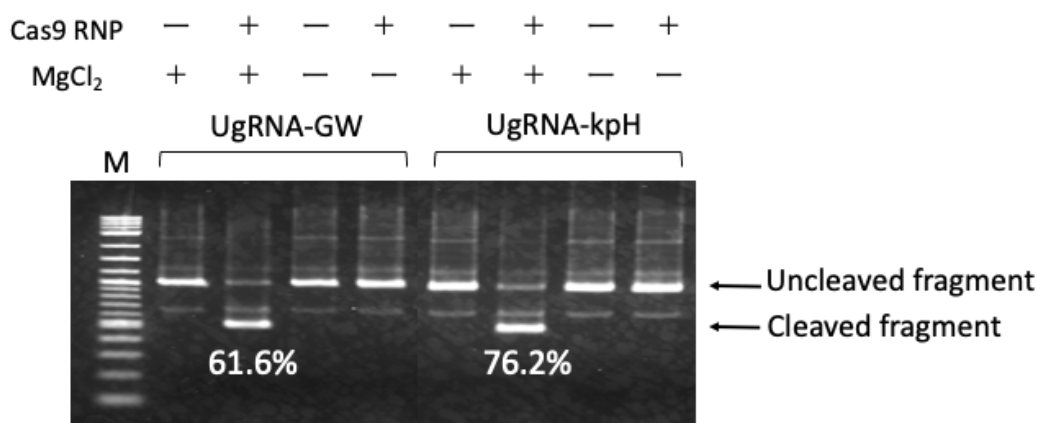


図 5. PCR 断片を基質とした *in vitro* 切断反応後のアガロース電気泳動の結果

反応液としては、PCR 断片とともに HiFi Cas9 RNP 複合体と MgCl_2 を添加したもの (+) としていないもの (-) を使用した。切断反応後、電気泳動を行い dsGreen で染色し、Fusion FX で可視化した。ImageJ を用いてバンドの濃淡を測定した後、切断効率を $\{1 - \text{Uncleaved fragment}(+ \text{RNP complex}) / \text{Uncleaved fragment}(- \text{RNP complex})\} \times 100$ で算出した。

表 1. PCR 断片を基質とした *In vitro* CRISPR-Cas9 切断アッセイで測定した crRNA の切断効率

Sample	Uncleaved fragment	Digested fragment	Cleavage efficiency
UgRNA-GW_ $\text{MgCl}_2(+)$ _RNP(-)	31224	0	0
UgRNA-GW_ $\text{MgCl}_2(+)$ _RNP(+)	11995	30850	61.6
UgRNA-GW_ $\text{MgCl}_2(-)$ _RNP(-)	32641	0	0
UgRNA-GW_ $\text{MgCl}_2(-)$ _RNP(+)	35463	0	0
UgRNA-kpH_ $\text{MgCl}_2(+)$ _RNP(-)	23809	0	0
UgRNA-kpH_ $\text{MgCl}_2(+)$ _RNP(+)	5676	22731	76.2
UgRNA-kpH_ $\text{MgCl}_2(-)$ _RNP(-)	22091	0	0
UgRNA-kpH_ $\text{MgCl}_2(-)$ _RNP(+)	26808	0	0

さらに、基質と Cas9 RNP 複合体の濃度をインジェクションに用いる溶液の条件と同様にし、in vitro CRISPR-Cas9 切断アッセイを行った。NanoLuc の間に UgRNA を 1 カ所含むプラスミドを基質として使用し、先ほどと同様、HiFi Cas9 RNP 複合体による切断反応を行った後に、CRISPR-Cas9 により切断されたフラグメント断片と非切断プラスミドを 2%のアガロース電気泳動で分離し、ImageJ を用いてバンドの濃淡を測定し、濃淡変化から切断効率を求めた（図 6、表 2）。その結果、プラスミドを基質とした場合でも、予想通り $MgCl_2$ を加えた方でのみ UgRNA の切断により直鎖状になったフラグメントのバンドを確認できた。アガロース電気泳動では、切断され直鎖状になった DNA は共有結合性閉環状 DNA より移動度が遅くなると説明されることが多いが、1%のアガロースゲルとは異なり 2%のゲルではバンドの出方が逆になることが示されている[18]。これは顕微注入前の $MgCl_2$ を含まないインジェクションに用いる溶液中では UgRNA が切断されないことを示した。切断効率については、GW では 79.0%、kPH では 72.9%となり、プラスミドが基質の場合でも UgRNA は $MgCl_2$ 依存的に効率的に切断されることが分かった。

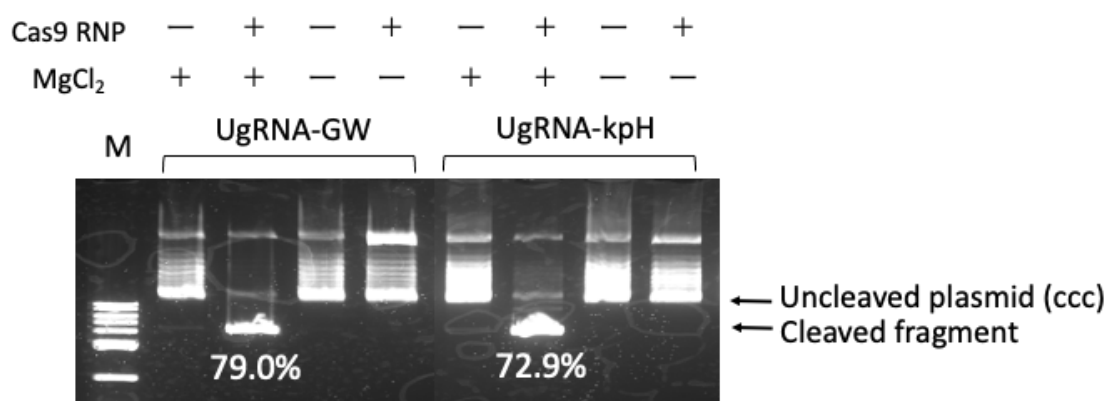


図 6. プラスミドを基質とした *in vitro* 切断反応後のアガロース電気泳動の結果

反応液としては、プラスミドとともに HiFi Cas9 RNP 複合体と MgCl_2 を添加したもの (+) としていないもの (-) を使用した。切断反応後、電気泳動を行い dsGreen で染色し、Fusion FX で可視化した。ImageJ を用いてバンドの濃度を測定した後、切断効率を $\{1 - \text{Uncleaved fragment}(+ \text{RNP complex}) / \text{Uncleaved fragment}(- \text{RNP complex})\} \times 100$ で算出した。

表 2. プラスミドを基質とした *in vitro* CRISPR-Cas9 切断アッセイで測定した crRNA の切断効率

Sample	Uncleaved fragment	Digested fragment	Cleavage efficiency
UgRNA-GW_ MgCl_2 (+)_RNP(-)	24254	0	0.0
UgRNA-GW_ MgCl_2 (+)_RNP(+)	6580	31623	72.9
UgRNA-GW_ MgCl_2 (-)_RNP(-)	22213	0	0.0
UgRNA-GW_ MgCl_2 (-)_RNP(+)	22707	0	0.0
UgRNA-kpH_ MgCl_2 (+)_RNP(-)	16968	0	0.0
UgRNA-kpH_ MgCl_2 (+)_RNP(+)	3570	25229	79.0
UgRNA-kpH_ MgCl_2 (-)_RNP(-)	18966	0	0.0
UgRNA-kpH_ MgCl_2 (-)_RNP(+)	21494	0	0.0

二本鎖 DNA (dsDNA) を相同組換え修復ドナーとした場合の蛍光タンパク質遺伝子カセットのノックイン効率の評価

まず、二本鎖 DNA (dsDNA) を相同組換え修復ドナーとして用いるためのプラスミドを作製した。pBSISK(-)ベクターを基本とし、目的遺伝子として *sox3*、蛍光タンパク質遺伝子として NLS-EGFP を用い、その間に 2A 配列を挿入した。また、Sox3 タンパク質の同時検出が可能となるように、ペプチドタグとして FLAGx3 を付加した。最近の研究では、アフリカツメガエル、シルクワーム、ゼブラフィッシュ、およびマウスの細胞で、ゲノム標的部位との相同配列が短い ($\leq 40\text{bp}$) 場合でも、プラスミドが切断され、直鎖状ドナー dsDNA を遊離させることで、ゲノム切断部位での正確な組み込みを促進できることが明らかになった[19,20,21]。よって、プラスミドドナーが *in vivo* で 2 箇所切断され、直鎖状 dsDNA ドナーが作り出されるように、カセットの両端に UgRNA のターゲット配列を挿入した (図 7)。

dsDNA のホモロジーアーム (HA) の長さに関しては、先行研究でノックイン効率の高かったものとし [3]、5'側、3'側ともに 50bp とした。その後、Cas9 タンパク質を用いるときは *sox3* Cas9 RNP 複合体、ユニバーサル RNP 複合体およびドナープラスミドを、Cas9 mRNA を用いるときは Cas9 mRNA、*sox3* gRNA、UgRNA およびドナープラスミドを 1 細胞期のゼブラフィッシュ胚の細胞質へ顕微注入し、ゼブラフィッシュゲノムの *sox3* C 末端へ約 1kbp の DNA 配列をノックインすることを試みた (図 7)。

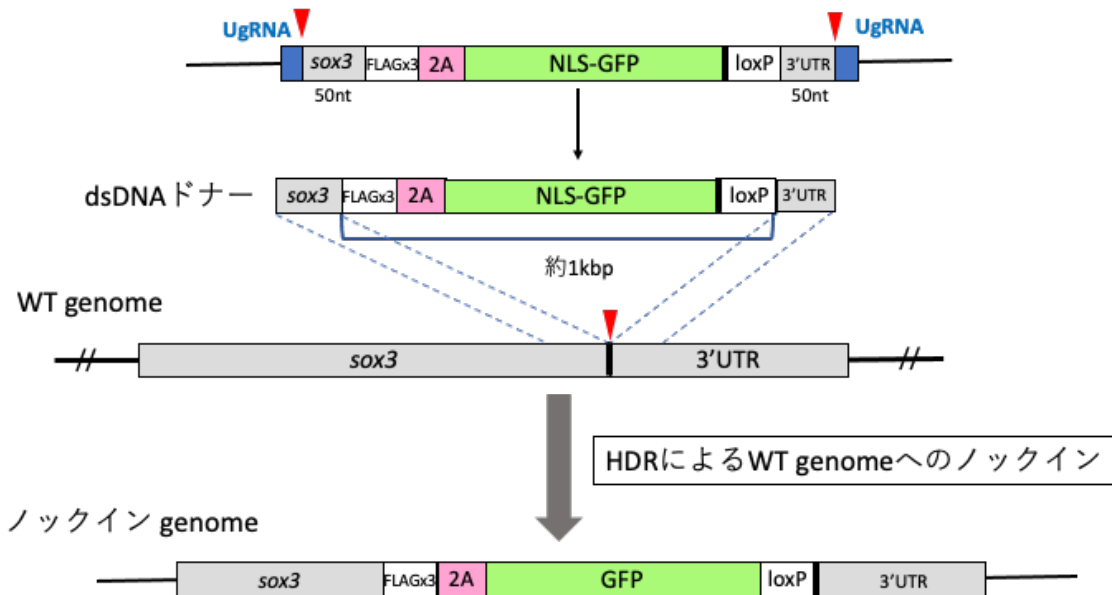


図 7. dsDNA を修復ドナーとしたときのノックイン法の概略

sox3 を標的とし、CRISPR-Cas9 により二本鎖切断 (DSBs) を引き起こし、約 1kbp の dsDNA をゼブラフィッシュゲノムへノックインする方法を示す。配列中の太い黒線は、stop コドンを示している。

そして、70%-epibory と 24 hpf (hours post-fertilization) で蛍光を観察するとともに、25 hpf で DNA を抽出し、PCR を行うことでノックインが生じているかどうかを調べた。また同時に、TIDE による切断効率の評価を行った。

その結果、UgRNA では kpH、Cas9 では mRNA を使用した場合に、ノックインアレルに由来するバンドを検出できた (図 8)。しかし、この方法でも PCR によりノックインが生じたことを確認できたにもかかわらず、GFP タンパク質の蛍光シグナルは観察できなかった。また、新たに設計した UgRNA-kpH の方がノックイン効率は高かったが、*sox3* 部位で生じたインデルの頻度は、ノックインバンドが生じたものでインデル頻度も高い傾向にあったため、UgRNA-kpH を用いることでノックイン効率が上がったかどうかは判断できなかった。同じ crRNA を単独で RNP として用いた以前の実験では 70%程度のインデルが見られたのに対し、今回の実験ではインデル頻度は 3.0%-29.8%と低い値を示したことから、*sox3* 部位での二本鎖切断がこの実験に関しては起こりにくい状態になっていたことが分かった (表 3)。

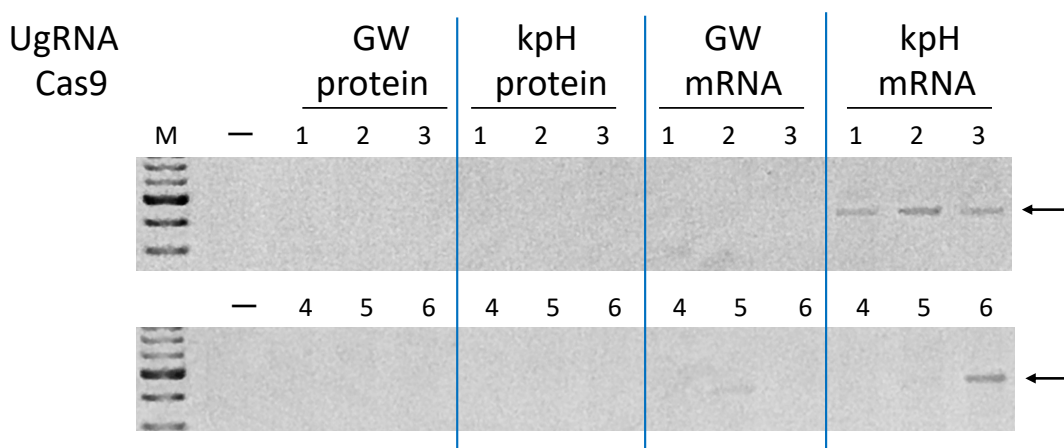


図 8. dsDNA ドナーを用いたノックインの確認

ーは HiFi Cas9 RNP 複合体を添加していない溶液を顕微注入したゼブラフィッシュ胚から DNA を抽出し PCR を行った。PCR 反応後、電気泳動した。矢印は、ノックインが生じた場合に生じるアレルから増幅される約 500bp のバンドを示す。

表 3. ゼブラフィッシュ胚での in vivo 反応後に測定した crRNA の切断効率

Injection solution	Mean	Sample					
		1	2	3	4	5	6
UgRNA-GW_Cas9 protein	7.7	4.6	3.2	3.6	16.6	8.8	9.5
UgRNA-kpH_Cas9 protein	7.2	4.0	8.6	15.8	5.6	5.2	4.0
UgRNA-GW_Cas9 mRNA	3.7	3.1	2.3	5.1	3.0	3.6	5.0
UgRNA-GW kpH_Cas9 mRNA	14.5	29.8	20.1	13.1	5.6	5.6	12.8

ノックインコンポーネントが切断効率に与える影響

インデルの頻度が低いことの要因として、ノックインのコンポーネントである UgRNA とプラスミドドナーが *sox3* 部位での二本鎖切断を阻害している可能性が考えられる。よって、ノックインコンポーネントが *sox3* 切断効率に与える影響の評価を行った。顕微注入した溶液は、*sox3* 切断コンポーネントである Cas9 mRNA と *sox3* gRNA を混合したもの、さらにノックインコンポーネントを加えた Cas9 mRNA と *sox3* gRNA、UgRNA、dsDNA を 1 細胞期のゼブラフィッシュ胚の細胞質へ顕微注入し、ゼブラフィッシュゲノムの *sox3* C 末端へ約 1kbp のゲノムをノックインした。

その結果、ノックインコンポーネントを顕微注入した方のノックインの確認では、ノックインバンドが生じることを確認できたが（図 9）、この時も GFP タンパク質の蛍光シグナルは観察できなかった。*sox3* 部位で生じたインデルの頻度は、*sox3* を切断するためのコンポーネントのみを用いた場合より、さらにノックインコンポーネントを加えた場合の方が低かった（表 4）。このことより、ノックインコンポーネントの影響により、*sox3* 部位での二本鎖切断が起こりにくくなっており、このことがノックイン効率を低下させている可能性が示唆された。

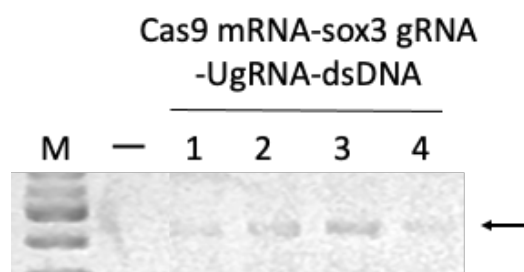


図 9. ノックインコンポーネントによる影響評価のノックインの確認

－は HiFi Cas9 RNP 複合体を添加していない溶液を顕微注入したゼブラフィッシュ胚から DNA を抽出し PCR を行った。PCR 反応後、電気泳動した。矢印は、ノックインが生じた場合に生じるアレルから増幅される約 500bp のバンドを示す。

表 4. ノックインコンポーネントによる影響評価における crRNA の切断効率

Injection solution	Mean	Sample			
		1	2	3	4
Cas9 mRNA-sox3 gRNA	21.4	19.5	23.4	24.8	17.9
Cas9 mRNA-sox3 gRNA-UgRNA-dsDNA	5.2	3	2.6	9.8	5.2

第4章 考察

まず、ssDNA ドナーを用いた場合、*sox3* ではターゲット鎖の方がノックイン効率が良いことが分かった。しかし、生物種や遺伝子、ノックインカセットや HA の長さなど、ノックインの効率には様々な要因が関係しているため、他の遺伝子へのノックインでは必ずしもターゲット鎖の方が効率が良いわけではないことがわかっている[1]。よって、どちらの鎖がドナーとして適しているのかに関しては、その都度検討する必要がある。また、PCR によりノックインアレルに由来するバンドが生じることを確認できたが、GFP 蛍光タンパク質の蛍光シグナルを観察できなかったことから、ノックインの効率または蛍光タンパク質の発現量はかなり低いのではないかと考えられた。

次に、dsDNA ドナーを用いた場合も、PCR によりノックインバンドが生じることを確認できたが、GFP 蛍光タンパク質の蛍光シグナルを観察できなかった。また、TIDE によるインデル頻度の解析により、全体的に *sox3* ターゲット部位における切断効率が低いことが分かったが、標的部位が二本鎖切断される効率が高い場合にはノックインされることが観察された。したがって、本研究では低かった切断効率を向上させることができればノックイン効率も向上し、蛍光タンパク質シグナルも可視化できる可能性があると考ええる。さらに、UgRNA 配列を挿入し、*in vivo* で直鎖上の dsDNA ドナーとして遊離させることでノックイン効率が高まるとされている一方、UgRNA を切断するための gRNA やドナープラスミドがゲノムの標的部位での二本鎖切断を妨げる可能性があることも明らかになった。これらノックインコンポーネントが、*sox3* 部位での切断効率に与える影響として、*in vivo* では至適化された UgRNA に Cas9 タンパク質への結合が優先的に起こり、*sox3* gRNA の方が RNP 複合体を産生しにくくなり、それがゲノムの二本鎖切断に影響を及ぼしているのではないかと考えられる。しかし、ドナープラスミドによる直接の影響も考えられるため、ノックインコンポーネントの何が *sox3* 部位での切断効率に影響するかについては、今後さらに検討する必要がある。

本研究では、ssDNA、dsDNA どちらの修復ドナーを使用した場合も、PCR によるゼブラフィッシュゲノムへのノックインは生じたが、GFP タンパク質の蛍光シグナルは観察できなかった。通常、CRISPR-Cas9 によって誘導される DNA 二本鎖切断の相同組換えを介した修復は、主に NHEJ によって修復されるため、HDR を介した修復の頻度は本質的に低くなる。また、2A 配列の下流側のタンパク質発現量は、上流側よりも低下するため、ノックイン効率が低いことに加え、タンパク質発現量も少ないことから可視化することが困難になっているのではないかと考えられる。それを改善する方法として、蛍光タンパク質発現の観点から今後の課題を述べる。

蛍光タンパク質シグナルを可視化できるようにする方法としては、まず、蛍光タンパク質の蛍光強度が低い場合、蛍光強度が高いものに変更することが考えられる。現在、EGFP を蛍光タンパク質として用いているが、より蛍光強度が高いとされている mNeonGreen に変更することや、赤色蛍光タンパク質の方がより発現を観察しやすいことから、蛍光強度の高い mScarlet-I を用いる方法が考えられる。次に、内在の蛍光タンパク質が少ない場合、蛍光タンパク質の発現量を増加させる方法も検討に値する。実際に、Gal4-UAS システムを利用することにより、ノックインされた Gal4 を介して発現誘導された蛍光タンパク質の可視化に成功している[3]。この方法では、Gal4-UAS システムを用いることで、内在のタンパク質発現量が少ない場合でも、Gal4 タンパク質を認識する配列の下流に蛍光タンパク質遺伝子を

配置することで、発現量を増加させることができ、蛍光タンパク質の観察が可能になることが期待できる。

蛍光タンパク質遺伝子カセットを効率よくノックインするには、上記の事柄を今後検討していく必要があると考える。

第5章 材料と方法

ssDNA 修復ドナーの作製

目的遺伝子として *sox3*、レポーター遺伝子として EGFP、その間に 2A を含む ssDNA を作製した。最終的な ssDNA *sox3*(300)-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3-3'UTR(50)とその反対鎖 3'UTR(50)-FLAGx3-EGFP-2A-FLAGx3-*sox3*(300)を作製するにあたり、以下の3段階のステップで行った。

1st step : pUC19-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3-3' UTR(50)の作製

以前の研究[22]で作製したプラスミド pCS2-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3 と pUC19-*sox3*(300)-FLAGx3-3'UTR(50)[1]を制限酵素 XhoI/XbaI で切断した後、アガロースゲル電気泳動により分離し、ゲルから目的のバンドを切り出し精製した。その後、ベクターを含む pUC19-*sox3*(300)-3'UTR(50)とインサート FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3 を用いてライゲーションを行い、プラスミド pUC19-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3-3'UTR(50)を得た。pUC19-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3-3'UTR(50)を保持した大腸菌を小規模・中規模で培養しプラスミド DNA を精製し、4°Cで保存した。

2nd step : pLSODN-3-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3-3'UTR(50)の作製

1st step 作製したプラスミド pUC19-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3-3'UTR(50)を制限酵素 EcoRI/PstI で切断した後、Klenow で平滑末端にしたもの、およびプラスミド pLSODN-3 を制限酵素 EcoRVで切断したものをアガロースゲル電気泳動により分離し、ゲルから目的のバンドを切り出し精製した。その後、ベクターpLSODN-3 とインサート *sox3*(300)-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3-3'UTR(50)を用いてライゲーションを行い、プラスミド pLSODN-3-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3-3'UTR(50)と反対鎖用の pLSODN-3-3'UTR(50)-FLAGx3-EGFP-2A-FLAGx3-*sox3*(300)を得た。pLSODN-3- *sox3*(300)-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3-3'UTR(50)あるいは pLSODN-3-3'UTR(50)-FLAGx3-EGFP-2A-FLAGx3-*sox3*(300)を保持した大腸菌を小規模・中規模で培養しプラスミド DNA を精製し、4°Cで保存した。

3rd step : *sox3*(300)-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3-3'UTR(50) / 3'UTR(50)-FLAGx3-EGFP-2A-FLAGx3-*sox3*(300) ssDNA の作製

2nd step で作製したプラスミド pLSODN-3-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3-3'UTR(50)、および pLSODN-3-3'UTR(50)- FLAGx3-EGFP-2A-FLAGx3-*sox3*(300)をニッキング酵素 Nt.BspQI/Nb.BbvCI で切断した後、エタノール沈殿により DNA を回収し、TE に溶解した。これと Denaturing Gel-Loading-Buffer (BioDynamics Laboratory Inc) が 1 : 3 の比になるように混合し、70°Cで5分間インキュベートし変性後、氷上で1分間おいた。そして変性した DNA をアガロースゲル電気泳動により分離し、ゲルから目的のバンドを切り出し、精製により得られた *sox3*(300)-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3-3'UTR(50) ssDNA、および 3'UTR(50)-FLAGx3-EGFP-2A-FLAGx3-*sox3*(300) ssDNA を-20°Cで保存した。

作成にあたって、形質転換とプラスミドを増幅させるために E.coil JM109 を用い、小規模プラスミド精製は Fast Gene Plasmid Mini Kit (NIPPON Genetics CO.Ltd) を使用し、標準プロトコルで行った。

中規模のプラスミド精製は、NucleoSnap Plasmid Midi (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co.KG) を使用し、標準プロトコルで行った。

in vitro における CRISPR-Cas9 切断アッセイ

- ・ UgRNA を 1 カ所含むプラスミドの作製

NanoLuc の間に UgRNA を 1 箇所含むプラスミド pNano-ano-Luk-TK(GW)、および pNano-ano-Luk-TK(kpH)を作製するにあたり、以下の 3 段階のステップで行った。GW/kpH は、UgRNA-GW あるいは UgRNA-kpH のいずれかの配列を持つことを示す。

1st step : pNano-ano-Luk-TK の作製

pNL1.1.TK[Nluk-TK]をテンプレートとし、制限酵素サイトを含むように作成したプライマー (表 5) で PCR により二つの DNA 断片を増幅した。この PCR を含め以下の実験の PCR でもクローニングを行う場合は、KOD-Neo-Plus (Toyobo) を用いて目的の DNA 断片を増幅した。それぞれの PCR 産物を制限酵素 HindIII/XhoI、あるいは XhoI/XbaI で切断した後、pNL1.1.TK[Nluk-TK]の HindIII と XbaI の間に挿入し、pNano-ano-Luk-TK を得た。その後、pNano-ano-Luk-TK を保持した大腸菌を小規模・中規模で培養し、プラスミド DNA を精製した。

2nd step : BglII-UgRNA(GW/kpH)-XhoI 断片の合成

UgRNA(GW/kpH)は制限酵素部位で連結できるよう、オリゴヌクレオチドのセンス鎖(S)とアンチセンス鎖(A)をアニールさせ(表 6)、BglII-UgRNA(GW/kpH)-XhoI 断片を得た。

3rd Step : pNano-ano-Luk-TK(GW)、pNano-ano-Luk-TK(kpH)の作製

1st step で作製した pNano-ano-Luk-TK を制限酵素 BglII/XhoI で切断した後、アガロースゲル電気泳動により分離し、ゲルから目的のバンドを切り出し精製した。その後、ベクター pNano-ano-Luk-TK と BglII-UgRNA(GW/kpH)-XhoI を用いてライゲーションを行い、プラスミド pNano-ano-Luk-TK(kpH)を得た。pNano-ano-Luk-TK(GW)については、上記の方法でライゲーションができなかったため、以下の方法を用いた。

pNano-ano-Luk-TK をテンプレートとし、制限酵素サイトを含むように作成したプライマー (表 7) で PCR により断片を増幅した。PCR 産物を制限酵素 BglII/XbaI で切断した後、pNano-ano-Luk-TK の BglII と XbaI の間に挿入し、pNano-ano-Luk-TK(GW)を得た。その後、pNano-ano-Luk-TK(GW)を保持した大腸菌を小規模・中規模で培養し、プラスミド DNA を精製した。さらに、pNano-ano-Luk-TK(GW/kpH)ともにサンガーDNA シーケンスを行い (eurofins)、CLC Main Workbench7 を用いて塩基配列を確認した。

作成にあたって、形質転換とプラスミドを増幅させるために E.coil JM109 を使い、小規模プラスミド精製は Fast Gene Plasmid Mini Kit (NIPPON Genetics CO.Ltd) を使用し、標準プロトコルで行った。中規模のプラスミド精製は、NucleoSnap Plasmid Midi (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co.KG) を使用し、標準プロトコルで行った。

・フラグメント断片を基質とした場合の in vitro CRISPR-Cas9 切断アッセイ

in vitro CRISPR-Cas9 切断アッセイの反応は、IDT のプロトコル (Alt-R CRISPR-Cas9 System : In vitro cleavage of target DNA with ribonucleoprotein complex) にしたがった。1xCas9 Nuclease Reaction Buffer (20 mM HEPES pH 6.5, 100 mM NaCl, 5.0 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA)、100 nM CRISPR-Cas9 RNP 複合体、および 5 nM PCR 産物を含む 10 μL 中の反応混合液中で標的 DNA の切断反応を行った。MgCl₂ を含まない反応液も同時に調製した。反応混合物を 37°C で 20 分間インキュベートした後、20 mg/mL の Proteinase K を 1.0 μL 添加し、56°C で 10 分間インキュベートして酵素を失活させ、切断反応を止めた。DNA をアガロース電気泳動した後、dsGreen (Lumiprobe) で染色し、Fusion FX (Vilber Lourmat) で可視化した。そして、バンド強度を ImageJ (v1.53) を用いて定量し、切断効率を算出した。

・プラスミドを基質とした場合の in vitro CRISPR-Cas9 切断アッセイ

手順はフラグメント断片を基質とした場合と同様であり、反応混合液のみ変更した。1.0 μM CRISPR-Cas9 RNP 複合体、2.5 nM プラスミド DNA、および 5.0 mM MgCl₂ を含む 9.0 μL 中の反応混合液中で標的 DNA の切断反応を行った。反応後、DNA をアガロース電気泳動した後、dsGreen (Lumiprobe) で染色し、Fusion FX (Vilber Lourmat) で可視化した。そして、バンド強度を ImageJ (v1.53) を用いて定量し、切断効率を算出した。

dsDNA 修復ドナーの作製

pBluescript II を基本とし、以前作成した目的遺伝子として *sox3*、レポーター遺伝子として EGFP、その間に 2A を含む dsDNA を作製した。最終的な dsDNA pBSIIISK(-)-UgRNA(GW/kpH)-*sox3*(50)-FLAGx3-2A-NLS-EGFP-loxP-3'UTR(50)-UgRNA(GW/kpH) を作製するにあたり、以下の 5 段階のステップで行った。

1st step : NLS-EGFP-loxP 断片の合成

NLS-EGFP をテンプレートとし、プライマー (表 8) を用いて PCR により断片を合成した。PCR 産物はアガロース電気泳動により増幅を確認した後 DNA 精製し、-20°C で保存した。

2nd step : pCS2-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-NLS-EGFP-loxP-3'UTR(300) の作製

以前の研究[22]で作製したプラスミド pCS2-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-EGFP-FLAGx3 と 1st step で合成した断片 EGFP-loxP を制限酵素 *SpeI/XbaI* で切断した後、アガロースゲル電気泳動により分離し、ゲルから目的のバンドを切り出し精製した。その後、ベクターを含む pCS2-*sox3*(300)-FLAGx3-2A とインサート NLS-EGFP-loxP でライゲーションを行い、プラスミド pCS2-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-EGFP-loxP を得た。pCS2-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-EGFP-loxP を保持した大腸菌を中規模で培養しプラスミド DNA を精製し、4°C で保存した。

3rd step : pUC-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-NLS-EGFP-loxP-3'UTR(300) の作製

プラスミド pUC19-*sox3*-FLAGx3-TEV-Bio-HiBiT-3'UTR[1] と 2nd step で作製したプラスミド pCS2-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-NLS-EGFP-loxP を制限酵素 *XhoI/XbaI* で切断した後、アガロースゲル電気泳動に

より分離し、ゲルから目的のバンドを切り出し精製した。その後、ベクターpUC19-*sox3*(300)-3'UTR(300)とインサート FLAGx3-2A-NLS-EGFP-loxP でライゲーションを行い、プラスミド pUC-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-NLS-EGFP-loxP-3'UTR(300)を得た。pUC-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-NLS-EGFP-loxP-3'UTR(300)を保持した大腸菌を中規模で培養しプラスミド DNA を精製し、4°Cで保存した。さらに、DNA シーケンス (eurofins) にかけて CLC Main Workbench7 を用いて塩基配列を確認した。

4th step : UgRNA(GW/kpH)-*sox3*(50)-FLAGx3-2A-NLS-EGFP-loxP-3'UTR(50)-UgRNA(GW/kpH)断片の合成
pUC-*sox3*(300)-FLAGx3-2A-NLS-EGFP-loxP-3'UTR(300)をテンプレートとし、プライマー (表 9) を用いて PCR により DNA 断片を合成した。PCR 産物はアガロース電気泳動により増幅を確認した後 DNA 精製し、-20°Cで保存した。

5th step : pBSIISK(-)-UgRNA(GW/kpH)-*sox3*(50)-FLAGx3-2A-EGFP-loxP-3'UTR(50)-UgRNA(GW/kpH)の作製

プラスミド pBluescriptII SK(-)と 4th step で合成した断片を制限酵素 KpnI/SacI で切断した後、アガロースゲル電気泳動により分離し、ゲルから目的のバンドを切り出し精製した。その後、ベクター pBluescriptII SK(-)とインサート UgRNA(GW/kpH)-*sox3*(50)-FLAGx3-2A-NLS-EGFP-loxP-3'UTR(50)-UgRNA(GW/kpH)を用いてライゲーションを行い、プラスミド pBSIISK(-)-UgRNA(GW/kpH)-*sox3*(50)-FLAGx3-2A-NLS-EGFP-loxP-3'UTR(50)-UgRNA(GW/kpH)を得た。pBSIISK(-)-UgRNA(GW/kpH)-*sox3*(50)-FLAGx3-2A-NLS-EGFP-loxP-3'UTR(50)-UgRNA(GW/kpH)を保持した大腸菌を小規模・中規模で培養しプラスミド DNA を精製し、4°Cで保存した。さらに、サンガーDNA シーケンス (eurofins) にかけて CLC Main Workbench7 を用いて塩基配列を確認した。

顕微注入と DNA 調整

・ ssDNA ドナーの場合

RNP 複合体 (3 fmol) 、および ssDNA (70-140 pg) を含む 1.5 nL の溶液を、ゼブラフィッシュ TL 系の自然交配によって得られた 1 細胞期胚の卵黄嚢に顕微注入を行った。顕微注入した胚は、0.03% Red sea salt 溶液中、28°Cで 24 hpf まで飼育し、DNA extraction buffer (low EDTA) (10 mM Tris-HCl[pH 8.0], 2.0 mM EDTA, 0.2% Triton X-100, 200 µg/mL Proteinase K) を 1 胚/5.0 µL となるように加え、ゲノム DNA を調製した。55°Cで 2 時間、時折ボルテックスしながらインキュベートし、90°Cで 15 分間加熱し Proteinase K を失活させた後、未精製のゲノム DNA 溶液を PCR に使用した。

・ dsDNA ドナーの場合

Cas9 タンパク質を用いた場合、RNP 複合体 (3 fmol) 、およびプラスミド DNA (10 pg) を含む 2.5 nL の溶液、Cas9 mRNA を用いた場合、HiFi Cas9 mRNA (200 pg) 、*sox3* gRNA (100 pg) 、UgRNA (100 pg) 、およびプラスミド DNA (10 pg) を含む 3 nL の溶液を、それぞれゼブラフィッシュ TL 系の自然交配によって得られた 1 細胞期胚の細胞質に顕微注入を行った。顕微注入した胚は、0.03% Red sea salt 溶液中、28°Cで 24 hpf まで飼育し、DNA extraction buffer (low EDTA) (10 mM Tris-HCl[pH 8.0], 2.0 mM EDTA, 0.2% Triton X-100, 200 µg/mL Proteinase K) を 1 胚/5.0 µL となるように加え、ゲノム

DNA を調整した。55°Cで2時間、時折ボルテックスしながらインキュベートし、90°Cで15分間加熱し Proteinase K を失活させた後、未精製のゲノム DNA 溶液を PCR に使用した。

ゲノムノックインと TIDE によるインデル頻度の評価

sox3 ゲノムへのノックイン評価では、PCR は Taq DNA Polymerase (New England Biolabs) を用い、ノックインカセット内および *sox3* 3'-UTR 配列内のプライマーを使用し (表 10)、約 500bp を増幅させた。PCR 産物をアガロース電気泳動にかけ、ノックインバンドを検出した。

インデル頻度の定量は、標的とする DNA 領域の PCR 産物をサンガーシーケンスにより解析し、得られたトレースデータから TIDE (<https://tide.nki.nl/>) を用いて行った。具体的には、PCR は Taq DNA Polymerase (New England Biolabs) を用い、*sox3* コード配列と 3'-UTR 配列内のプライマーを使用し (表 11)、crRNA の標的部位を含む約 600bp を増幅させた。PCR 産物をアガロース電気泳動にかけ増幅を確認した後、磁性ビーズ(NucleoMag® NGS Clean-up and Size Selec)を用いて精製した。精製した PCR 産物をプライマー (表 11, *sox3-over300-F1*) と混ぜ、サンガーシーケンス (eurofins) した。得られたトレースデータを使用して TIDE で解析した。

表 5. pNano-ano-Luc-TK 作製に使用したプライマー

Primer	Sequence(5' to 3')
TK-promoter_F	CCACTTCGCATATTAAGGTGACG
Nano-ano-Luc_R	GGGCTCGAGGATATCAGATCTGAGCTCTTATACAGTG ATCTTTTGCCGTC
Nano-ano-Luc_F	GGGCTCGAGGCTAGCTCCAGTTTGTTCAGAATCTCG
SV40-pA_R	CAATGTATCTTATCATGTCTGCTCG

表 6. UgRNA 作製に使用したオリゴヌクレオチド

Oligo	Sequence(5' to 3')
UgRNA-GW-S	GATCTGGGAGGCGTTCGGGCCACAGCGGC
UgRNA-GW-A	TCGAGCCGCTGTGGCCCGAACGCCTCCCA
UgRNA-kpH-S	GATCTGTAGAGGGTCTACCACGCCGCGGC
UgRNA-kpH-A	TCGAGCCGCGGCGTGGTAGACCTCTACA

表 7. pNano-ano-Luk-TK(GW)作製に使用したプライマー

Primer	Sequence(5' to 3')
BglIII-UgRNA(GW)-XhoI-F	GGGAGATCTGGGAGGCGTTCGGGCCA CAGCGGCTCGAGGCTAGCTCCAGTTTG
SV40-pA-R	CAATGTATCTTATCATGTCTGCTCG

表 8. NLS-EGFP-loxP 断片合成に使用したプライマー

Primer	Sequence(5' to 3')
NLS-EGFP-F.SpeI	GGGACTAGTATGGTGTCTAGTGATGATGAGG
NLS-EGFP-R.Stop-NheI-loxP-XbaI	GGGTCTAGAATAACTTCGTATAATGTATGCTATACG AAGTTATGCTAGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG

表 9. UgRNA(GW/kpH)-sox3-FLAGx3-2A-EGFP-loxP-3'UTR-UgRNA(GW/kpH)断片の合成に使用したプライマー

Primer	Sequence(5' to 3')
KpnI-UgRNA(GW)-Sall-sox3-F	GGGGGTACCGGGAGGCGTTCGGGCCACAGCG GCGTCGACATCAAAGCGCAGGGACAGGCG
UTR-NotI-UgRNA(GW)-SacI-R	GGGGAGCTCGGGAGGCGTTCGGGCCACAGCG GCGCGGCCGCTCAAATGTTCAAGTATCCGAAG
KpnI-UgRNA(Uni)-Sall-sox3-F	GGGGGTACCGTAGAGGGTCTACCACGCCGCGG CGTCGACATCAAAGCGCAGGGACAGGCG
UTR-NotI-UgRNA(Uni)-SacI-R	GGGGAGCTCGTAGAGGGTCTACCACGCCGCGG CGCGGCCGCTCAAATGTTCAAGTATCCGAAG

表 10. *sox3* ゲノムへのノックイン評価に使用したプライマー

Primer	Sequence(5' to 3')
EGFP-3'-F2	GATCACTCTCGGCATGGACGAG
sox3-3'UTR-over300-R	TGAACGTACTCTCCCTCCGT

表 11. crRNA の標的部位増幅・サンガーシーケンス解析に使用したプライマー

Primer	Sequence(5' to 3')
sox3-over300-F1	GCGGGACTTCAGTACCCAATGA
sox3-3UTR-over300-R	TGAACGTACTCTCCCTCCGT

第6章 参考文献

1. Ranawakage, D.C., Okada, K., Sugio, K., Kawaguchi, Y., Kuninobu-Bonkohara, Y., Takada, T., Kamachi, Y., 2021. Efficient CRISPR-Cas9-Mediated Knock-In of Composite Tags in Zebrafish Using Long ssDNA as a Donor. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8.
2. Chang, N., Sun, C., Gao, L., Zhu, D., Xu, X., Zhu, X., Xiong, J.-W., Xi, J.J., 2013. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos. *Cell Res* 23, 465–472.
<https://doi.org/10.1038/cr.2013.45>
3. Wierson, W.A., Welker, J.M., Almeida, M.P., Mann, C.M., Webster, D.A., Torrie, M.E., Weiss, T.J., Kambakam, S., Vollbrecht, M.K., Lan, M., McKeighan, K.C., Levey, J., Ming, Z., Wehmeier, A., Mikelson, C.S., Haltom, J.A., Kwan, K.M., Chien, C.-B., Balciunas, D., Ekker, S.C., Clark, K.J., Webber, B.R., Moriarity, B.S., Solin, S.L., Carlson, D.F., Dobbs, D.L., McGrail, M., Essner, J., 2020. Efficient targeted integration directed by short homology in zebrafish and mammalian cells. *eLife* 9, e53968.
<https://doi.org/10.7554/eLife.53968>
4. Okada, K., Aoki, K., Tabei, T., Sugio, K., Imai, K., Bonkohara, Y., Kamachi, Y., 2022. Key sequence features of CRISPR RNA for dual-guide CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes assembled with wild-type or HiFi Cas9. *Nucleic Acids Research* gkac100. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac100>
5. Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., Zhang, F., 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8, 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
6. ゲノム編集を応用した転写調節技術により、がんの増殖を阻害 [WWW Document], n.d. . 国立がん研究センター. URL http://www.ncc.go.jp/jp/information/pr_release/2018/0627_2/index.html (accessed 3.1.22).
7. ゲノム編集技術で拓く希少疾患治療薬への道 | Entrepreneurs 01 [WWW Document], n.d. . 東京大学. URL <https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/features/entrepreneurs01.html> (accessed 3.1.22).
8. Santoriello, C., Zon, L.I., 2012. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest* 122, 2337–2343. <https://doi.org/10.1172/JCI60434>
9. Langheinrich, U., 2003. Zebrafish: A new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays* 25, 904–912. <https://doi.org/10.1002/bies.10326>
10. de Felipe, P., Luke, G.A., Brown, J.D., Ryan, M.D., 2010. Inhibition of 2A-mediated ‘cleavage’ of certain artificial polyproteins bearing N-terminal signal sequences. *Biotechnol J* 5, 213–223. <https://doi.org/10.1002/biot.200900134>
11. Bai, H., Liu, L., An, K., Lu, X., Harrison, M., Zhao, Y., Yan, R., Lu, Z., Li, S., Lin, S., Liang, F., Qin, W., 2020. CRISPR/Cas9-mediated precise genome modification by a long ssDNA template in zebrafish. *BMC Genomics* 21, 67. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6493-4>
12. Hasty, P., Rivera-Pérez, J., Chang, C., Bradley, A., 1991. Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.9.4509-4517.1991>

13. Hoshijima, K., Jurynek, M.J., Grunwald, D.J., 2016. Precise Editing of the Zebrafish Genome Made Simple and Efficient. *Developmental Cell* 36, 654–667. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.02.015>
14. Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W., Rothstein, R.J., 1981. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *PNAS* 78, 6354–6358. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6354>
15. Shin, J., Chen, J., Solnica-Krezel, L., 2014. Efficient homologous recombination-mediated genome engineering in zebrafish using TALE nucleases. *Development* 141, 3807–3818. <https://doi.org/10.1242/dev.108019>
16. Zu, Y., Tong, X., Wang, Z., Liu, D., Pan, R., Li, Z., Hu, Y., Luo, Z., Huang, P., Wu, Q., Zhu, Z., Zhang, B., Lin, S., 2013. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat Methods* 10, 329–331. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2374>
17. Wiersen, W.A., Simone, B.W., WareJoncas, Z., Mann, C., Welker, J.M., Kar, B., Emch, M.J., Friedberg, I., Gendron, W.A.C., Barry, M.A., Clark, K.J., Dobbs, D.L., McGrail, M.A., Ekker, S.C., Essner, J.J., 2019. Expanding the CRISPR Toolbox with ErCas12a in Zebrafish and Human Cells. *The CRISPR Journal* 2, 417–433. <https://doi.org/10.1089/crispr.2019.0026>
18. Johnson, P.H., Grossman, L.I., 1977. Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochemistry* 16, 4217–4225. <https://doi.org/10.1021/bi00638a014>
19. Aida, T., Nakade, S., Sakuma, T., Izu, Y., Oishi, A., Mochida, K., Ishikubo, H., Usami, T., Aizawa, H., Yamamoto, T., Tanaka, K., 2016. Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. *BMC Genomics* 17, 979. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3331-9>
20. Hisano, Y., Sakuma, T., Nakade, S., Ohga, R., Ota, S., Okamoto, H., Yamamoto, T., Kawahara, A., 2015. Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Sci Rep* 5, 8841. <https://doi.org/10.1038/srep08841>
21. Nakade, S., Tsubota, T., Sakane, Y., Kume, S., Sakamoto, N., Obara, M., Daimon, T., Sezutsu, H., Yamamoto, T., Sakuma, T., Suzuki, K.T., 2014. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun* 5, 5560. <https://doi.org/10.1038/ncomms6560>
22. Kuninobu Y. 「Effects of codon composition on skip efficiency of 2A peptide」. 学士論文, 2019/2/26

第7章 謝辞

本研究を終えるにあたり、高知工科大学分子発生研究室 蒲池雄介教授の御指導のもとで行いました。蒲池先生には、日々多大なる御指導と御助言を頂きました。また、大学入学当初から私が興味を持っていた遺伝子工学の研究に携わることができました。このような機会をくださった蒲池先生に深く感謝申し上げます。

そして蒲池研究室の皆様には、ゼブラフィッシュの採卵や実験補助だけではなく、様々な面で支えて頂きました。この場を借りて心より御礼申し上げます。

最後に、いつも身近で支え、応援してくれた両親をはじめとする家族に心から感謝いたします。ありがとうございました。