

質の高いゲノム編集マウス作製を支援するKOnezumi、DAJINの開発

久野 朗広

筑波大学 解剖学発生学研究室

はじめに

CRISPR-Cas9システムは、遺伝子改変の歴史において画期的な変革をもたらした。実験動物学領域においても例外ではなく、高度に発達した胚操作技術と組み合わせられた結果、従来では考えられないほど迅速かつ簡便にゲノム編集動物を作製することが可能となった。

新たなゲノム編集技術の開発ならびにゲノム編集効率の向上といった分野において、日本からも多くの独自の研究成果が報告されている。しかし、この記事の主な焦点は、ゲノム編集技術を適用する「前後」の過程にある。ゲノム編集を行う「前」には、目的の編集結果を得るための質の高いゲノム編集デザインの計画が必要となる。また、ゲノム編集の「後」には、作製された動物が想定された通りの遺伝子変異を持っているかどうかの確認として、遺伝型解析が行われる。

これらゲノム編集の「前後」の過程は、多くの課題と困難がある。ゲノム編集技術自体が持つ固有の問題点に対応するため、研究者は常に新しいアプローチを模索している。このような背景の中で、本稿では私たちが開発しているツール、「KOnezumi」(Kuno et al., 2019) および「DAJIN」(Kuno et al., 2022) を紹介したい。

KOnezumiは、ノックアウトマウス作製に特化したゲノム編集デザ

インを自動化するWebツールであり、質の高いゲノム編集実験の設計をサポートする。また、DAJINは、ロングリードシーケンサーを使用して、高精度な遺伝型解析を行うためのツールである。目的のゲノム編集動物を得るためのツールとしてKOnezumiおよびDAJINを活用することで、ゲノム編集動物を用いた研究の質を担保することができるかと期待している。

KOnezumi : 簡便かつ信頼性の高いノックアウトデザインを提供するWebツール

遺伝子ノックアウトマウスは、生体内での特定遺伝子の機能調査に用いられる基盤的なツールである。現在ではCRISPR-Cas9システムがその簡便さと汎用性の広さにより、ノックアウトマウスの生成における一般的な手法として位置づけられている。CRISPR-Cas9を筆頭とするゲノム編集技術の進展によって、これまでノックアウトマウスの作製経験がなかった研究者・技術者がこの分野に参入するハードルが下がったと言える。しかし、特定の遺伝子をノックアウトするための適切なゲノム編集戦略を考えることは、依然として遺伝子工学に詳しい専門家の知識や経験が必要とされており、これがノックアウトマウス作製の大きな障壁となっていた。

ノックアウトマウス作製におけ

るデザインに関して、具体的な課題として以下の3つが挙げられる。

1. 目的の遺伝子ノックアウトを得るために切断もしくは切除すべきエクソンの選定、2. 切断対象のゲノム領域のための最適なガイドRNAの設計、3. 作製されたノックアウトマウスの遺伝型を確認するためのジェノタイピングプライマーの設計、である。これらを正確にデザインすることは、ノックアウトの信頼性の保証、ならびに産出したノックアウトマウスの遺伝型解析に欠かせない。これまでに、これらの課題に対して多くのソフトウェアやウェブツールが開発されているが、3つの事項すべてを勘案するためには、それぞれのツールを個別に使用する必要があった。さらに、一部のツールは高度なプログラムスキルを要求するため、そもそも利用が難しいものもあった。そのため、ノックアウトを誘導する信頼性の高いデザインの実現は困難であった。

ノックアウトデザインの全自動化製ツール「KOnezumi」の開発

筑波大学動物資源センターは、これらの課題を解決するためのWebサービスKOnezumiを公開している (<https://www.md.tsukuba.ac.jp/LabAnimalResCNT/KOanimals/konezumi.html>) (図1)。KOnezumiのとくに注目すべき特徴は、その利用の簡便さとノック

アウトの信頼性の高さにある。

まず、KOnezumiの使用方法は非常に簡単である。利用者は上記のサイトにアクセスをし、興味のある遺伝子名（複数遺伝子可）を入力するだけで、残りの作業はすべてKOnezumiが自動で行う。ゲノムブラウザからの配列取得、ガイドRNAの設計、ジェノタイピングプライマーの設計といった煩雑な手順を、利用者が個別に実行する必要はない。これがKOnezumiのもっとも大きな特徴である。

もう一つの特徴は、信頼性の高いノックアウト戦略を提供する点にある。遺伝子ノックアウトの方法には多くのバリエーションが存在するが、KOnezumiはとくにノックアウトの確実性を重視して、標的エクソンの両端を切断する戦略を採用している。そして、「どのエクソンを標的とするか」という重要な判断基準についても、国際マウス表現型解析コンソーシアム (IMPC) の公開情報をベースに最適な選択を行っている。これにより、任意のエクソンを選択するよりも信頼性の高いノックアウトが期待できる。

KOnezumiのレポート

レポートの結果は5つのカテゴリーに分かれており、それぞれ遺伝子情報やノックアウト戦略の概要、gRNAの候補一覧、ジェノタイピングプライマーの候補一覧、切断されるエクソンの配列、そして切断後のmRNA配列が詳細に記載されている。

とくに実務上有用なのは、ジェノタイピングプライマーの候補一覧と切断後のmRNA配列である。これらの情報は、エクソンの

両端を切除するノックアウト方法において極めて重要である。ジェノタイピングプライマーに関しては、電気泳動のバンドサイズに基づき、ホモとヘテロを区別するための3種類のプライマー情報が提供されている。また、エクソン除去後のmRNA配列が提示され、ナンセンスコドン介在的mRNA分解 (nonsense mediated mRNA decay : NMD) によって分解される可能性があるのかを確認することができる。

KOnezumiは、ノックアウトマウスを高い信頼性で作製するための実用的な選択肢となる。2023年10月現在、公開開始の2018年から累計で3万回のご利用を頂いている。現在は約1万2000遺伝子に対応しているが、今後、ノックアウトデザインの構築が可能なすべての遺伝子をカバーする予定である。もし利用者の興味のある遺伝子が現状対応していない場合でも、ほかに興味のある遺伝子についてKOnezumiのレポートを参照することで、ノックアウトデザインの構築における勘所がつかめるのではないかと考えている。

DAJIN : ナノポアロングリードシーケンサーを用いた高精度な

遺伝型解析技術

CRISPR-Cas9による「意図しない変異」の導入

筑波大学生命科学動物資源センターでは年間約150の遺伝子改変マウス系統を作製しており、その多くをCRISPR-Cas9によるマウス受精卵に対するゲノム編集によって行っている。しかし近年、標的ゲノム領域におけるCas9のDNA二本鎖切断の修復過程によって「意図しない変異」が誘導される場合が相次いで報告されている (Kosicki et al., 2018など)。実際に、著者らは当施設で作製されたゲノム編集マウスのゲノム解析に取り組む中で、ゲノム編集によって生じる「意図しない変異」が想像を超える頻度で検出されることに気がついた。標的ゲノム領域においてデザイン通りの編集が施されたマウスは、実際には10匹中1~3匹程度であり、その他は何らかの「意図しない変異」を持っていた。この「意図しない変異」は小さい挿入・欠失もあれば、1 kbを超える大型の変異も生じていた。そして従来の遺伝型解析技術である電気泳動法、サンガーシーケンサー、次世代シーケンサーでは、このような大小さまざまな「意図しない変異」を見落とし、遺伝型を誤判定する

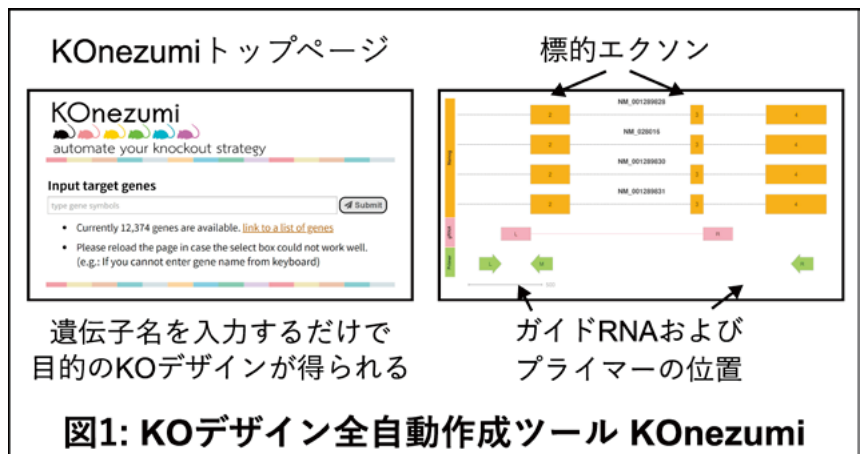


図1: KOデザイン全自動作成ツール KOnezumi

リスクが避けられなかった。

「意図しない変異」を捉えるためのロングリードシークエンサーの活用

上述のとおり、ゲノム編集によって生じた「意図しない変異」はランダムに起こり、かつ、その影響の範囲は一塩基置換から構造多型までまったく予想ができない。そこで著者らはこれらの変異を網羅的に捉えるために、ロングリードシークエンサーを活用することを考えた。ロングリードシークエンサーには代表的なものとしてナノポアシークエンサーおよびPacBioがあるが、導入コストが低いナノポアシークエンサーを用いることとした。ナノポアシークエンサーは、DNAを一分子ずつ小さな穴（ナノポア）に通し、各塩基が通過するときの電流変化を検知してDNAの塩基配列を解読するシークエンサーである。著者らは複数個体にバーコードするために、まずPCRアンプリコンを作製し、これに対してナノポアシークエンサーを用いることで、およそ10 kbまでの標的ゲノム領域において1塩基解像度で遺伝型を決定することができるようになる。

深層学習を組み合わせた遺伝型解析技術「DAJIN」の開発

ナノポアシークエンサーによって広範囲なゲノム領域の配列を解読できるようになった一方で、ナノポアシークエンサーは塩基決定において誤りが多いという欠点があった。そこで著者らはナノポアシークエンサーのシミュレーションリードを教師とした深層学習を用いて、ナノポアシークエンサー

のエラー率を勘案しつつ、正確にアレルを分類できる機械学習モデルを組んだ。これによって1塩基変異から構造多型までのアレルの網羅的な検出が可能となった。ナノポアシークエンサーのリードを、アレルごとに分類するこの機械学習モデルを、アレルを一網「打尽」に検出することからDAJINと名付けた(図2)。

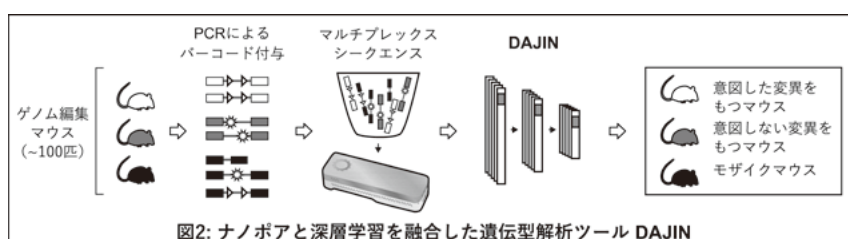
多サンプル処理が可能とする実用例

DAJINはDNA抽出およびPCRができればあとはナノポアシークエンサーにかけるだけであり、結果は1日程度で完了する。また、PCRによるDNAバーコード付与によって一回のシークエンスにおいて100匹程度の遺伝型解析が可能であり、およそ1匹あたり1,000円程度のコストとなる。そのため、短時間かつコストパフォーマンスに優れたハイスループットスクリーニングが可能であると考えている。実際に著者らはDAJINを用いて近交系マウス8系統のHr遺伝子ノックアウトマウスの遺伝型解析に取り組み、2回のシークエンスで116匹分の遺伝型解析を3日程度で完了することができた(Tamari et al., 2023)。ナノポアシークエンサーとDAJINの組み合わせによって、従来では現実的に不可能なほどの時間と労力が必要であったワークフローが現実のものとなっている。

今後の展望

著者らの研究においては、論文出版がゴールではなく、実際に利用されることが重要となる。その点で、KOnezumiのように誰もが利用できるWebツールは目的を満たしている。一方で、KOnezumiの対象となる遺伝子数はおよそマウス全遺伝子数のおよそ半分程度であり、その増加が望まれていることや、エンハンサー領域のアノテーションを勘案する、といったゲノム編集デザインにおける最新の知見を取り込めていない。さらに、マウス以外の生物種に対してもKOnezumiのアプローチを拡張してほしいという要望もある。これらの更新を行うことが今後の課題である。

一方DAJINにおいては、KOnezumiと異なり、現状では利用が簡単ではないという点が最大の欠点である。深層学習を用いていることから、使用できるPCは基本的にグラフィックボードを搭載したものに限られ、OSもLinuxが前提である。そのため、PCに慣れた利用者しか導入することができない、という点で改善の必要がある。著者らはDAJINをより簡単に、より汎用的なPCにインストールできるように、深層学習ではないアルゴリズムでアレルを分類する、DAJIN2の開発に取り組んでいる(<https://github.com/akikuno/DAJIN2>)。DAJIN2は手持ちのラップトップに簡単にインストールす



ることができ、最新のナノポアフローセルR10.4にも対応している。今後、ナノポアシーケンサーを含めたロングリードシーケンサーの普及が加速することを勘案し、DAJIN2も一層その利用価値を高めていきたい所存である。

おわりに

本稿では著者らが開発に携わる「KOnezumi」および「DAJIN」を紹介した。一方で、本邦においてゲノム編集技術に関する研究は非常に活発に行われており、バイオインフォマティクスを活用した報告も多くなされている。有名どころではガイドRNAの配列特異性をレポートするCRISPR-Direct (Naito et al., 2015) や、最近ではゲノム編集後に起こりうる意図しない表現型を予測するDANGER

Analysis (Nakamae & Bono, 2023) といった独創的なツールが報告されている。このようなゲノム編集実験をサポートするツールを組み合わせることで、貴重な動物資源を有効に活用しつつ、より精密で質の高い研究を行う一助となれば幸いである。

引用文献

Kosicki, M., Tomberg, K., & Bradley, A. (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nature Biotechnology*, 36(8), 765-771.

Kuno, A., Ikeda, Y., Ayabe, S., Kato, K., Sakamoto, K., Suzuki, S. R., Morimoto, K., Wakimoto, A., Mikami, N., Ishida, M., Iki, N., Hamada, Y., Takemura, M., Daitoku, Y., Tanimoto, Y., Dinh, T. T. H., Murata, K., Hamada, M., Muratani, M., ... Mizuno, S. (2022). DAJIN enables multiplex genotyping to simultaneously validate intended and unintended target genome editing outcomes. *PLoS Biology*, 20(1), e3001507.

Kuno, A., Mizuno, S., & Takahashi, S. (2019). KOnezumi: a web application for automating gene disruption strategies to generate knockout mice. *Bioinformatics*, 35(18), 3479-3481.

Naito, Y., Hino, K., Bono, H., & Ui-Tei, K. (2015). CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*, 31(7), 1120-1123.

Nakamae, K., & Bono, H. (2023). DANGER analysis: risk-averse on/off-target assessment for CRISPR editing without a reference genome. *Bioinformatics Advances*, 3(1), vbad114.

Tamari, T., Ikeda, Y., Morimoto, K., Kobayashi, K., Mizuno-Iijima, S., Ayabe, S., Kuno, A., Mizuno, S., & Yoshiki, A. (2023). A universal method for generating knockout mice in multiple genetic backgrounds using zygote electroporation. *Biology Open*, 12(9). <https://doi.org/10.1242/bio.059970>

(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)

実験動物の血液検査受託サービス

お客様の分析ラボとして
信頼性の高いデータを提供いたします

生化学検査

マウスでも検査可能な微量検体 (80 μ L ~)
迅速な結果報告 (最短検体到着より 2 営業日)

ステロイドホルモン検査

LC-M/MS を用いた高感度分析
最大 27 種のステロイドホルモンを一斉分析

マルチプレックス検査

Luminex を用いて最大 49 種のタンパク質を一斉分析
微量検体 (50 μ L) で分析可能

新薬 新発見
New drug New discovery

迅速で充実した研究開発

\HPはこちらから\



オリエンタル酵母工業株式会社

バイオ事業本部リサーチソリューション部
TEL : 03-3968-1192