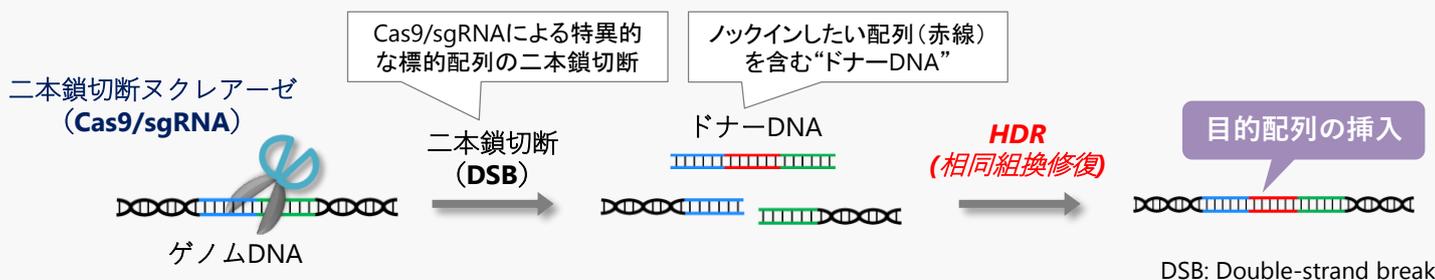


毎号、テーマを絞って製品トレンドをお伝えします

はじめに：ゲノム編集技術、とりわけCRISPR/Cas9システムは、その圧倒的な簡便さで、医療・農業・食料・エネルギー分野等で幅広く利用されています。ゲノム上の狙った配列を正確に切断することで、目的遺伝子の“ノックアウト(破壊)”や“ノックイン(外来遺伝子の挿入)”を可能にします。

今回の「ク롿テック通信」は、特に長鎖のノックイン(外来遺伝子の挿入)を行う際のポイント、関連論文情報、ユーザー実施例をご紹介します。

Knock-in(ノックイン)：目的配列のゲノムへの挿入



◆ノックイン例

- ・ 外来遺伝子をノックインによりゲノムに挿入し、除草剤耐性を獲得 (トウモロコシなど)
- ・ CRISPR/Cas9による蛍光遺伝子の挿入

ノックイン時のドナーDNAの使い分け

ノックイン用のドナーDNAとして、二本鎖DNA (dsDNA) や一本鎖DNA (ssDNA) を使うことができます。但し、dsDNA (プラスミドやPCR断片など) はssDNAに比べ、標的部以外へのランダムな挿入活性が高いといわれています。また、ドナーDNAの電トロポレーション法による導入時の細胞毒性は、ssDNAに比べdsDNAの方が高いというデータが示されています。右図は、オリゴタイプと長鎖タイプのssDNAの特長です。

ssDNAのタイプ	ドナーサイズ	特長
一本鎖オリゴDNA (ssODN)	~100 bases	一塩基置換や短い配列 (50 nt 以下) の挿入に有効
長鎖一本鎖DNA (Long ssDNA)	~1,000 bases	500 ntを超える長い配列 (蛍光遺伝子や薬剤耐性遺伝子など) の挿入に有効

長鎖ssDNAに関する参考文献

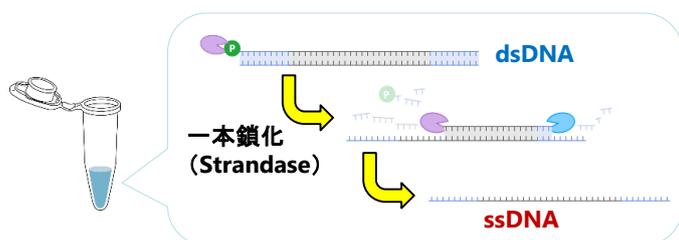
Design and specificity of long ssDNA donors for CRISPR-based knock-in. Li, H *et al.*, *bioRxiv* 2017; doi: <https://doi.org/10.1101/178905>.
Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. Roth, TL *et al.*, *Nature* 2018; **559**: 405-409.

おすすめ！ノックインドナー用長鎖一本鎖(ssDNA)調製キット

Guide-it™ Long ssDNA Production System (製品コード 632644)

◆特長

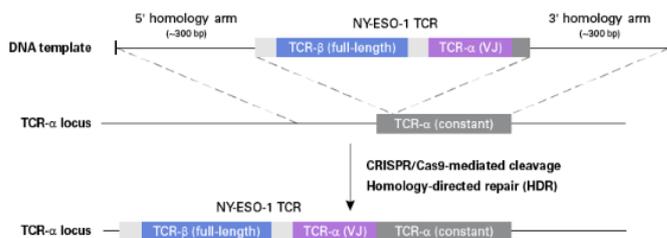
- ・ 独自技術で二本鎖DNAを一本鎖化
- ・ クローニング操作やゲル抜き精製は不要
- ・ 10 µgのdsDNAから2~4 µgのssDNAを調製



チューブ内で1本鎖化

◆本キットを使った論文がNature誌に掲載されました！

Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. Roth, TL *et al.*, *Nature* 2018; **559**: 405-409.



ノックアウトによるがん特異的抗原認識TCRへのT細胞の改変 NY-ESO-1抗原を特異的に認識するTCR配列をTCRα領域にノックイン法により置き換えた遺伝子改変T細胞を構築

裏面：ユーザー様実施例

ユーザー様実施例

『Guide-it™ Long ssDNA Production Systemを用いたノックインマウスの作製
(マイクロインジェクション法によるマウス受精卵のゲノム編集)』

国立精神・神経医療研究センター 疾病研究第6部
井上(上野)由紀子様 森本 由起 様



国立精神・神経医療研究センター 疾病研究第6部 井上(上野)由紀子様から、[Guide-it Long ssDNA Production System \(製品コード 632644\)](#)を用いた実施例をご提供いただきました。是非ご一読ください。

＜研究内容＞

社会性行動や発達障害に関わる遺伝子座に着目して自身の研究を進めるとともに、研究所内外の共同研究者に対して、ゲノム編集マウス作製支援を行っている。特に、神経発生・精神神経疾患・筋疾患において重要な役割を果たす遺伝子の発現を可視化／操作できるノックインマウスを多数作製している。

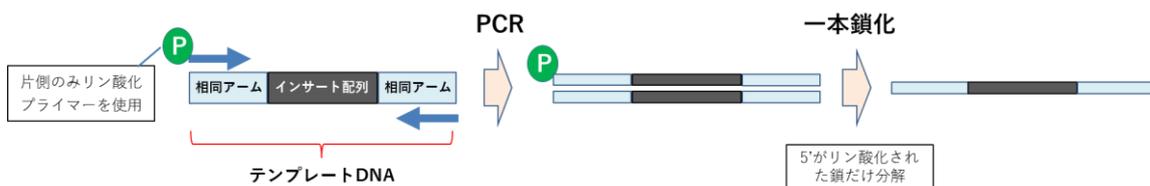
＜実施例＞

■ 本製品を使用するに至った経緯

タカラバイオの「Guide-it Long ssDNA production System」を使う以前は、他の方法でノックイン用の長鎖一本鎖DNA (long ssDNA) を調製していた。2017年に参加した日本ゲノム編集学会第2回大会で本製品を知り、RNAへの転写やゲル抽出などの煩雑な操作が不要な点や、ssDNA調製に必要な試薬がキット化されている点などから、当時行っていた調製法よりも簡便そうだと思い購入するに至った。

■ 実験内容

本キットでlong ssDNAを調製するには、PCR増幅用のテンプレートDNA (インサート配列と左右の相同アームからなる二本鎖DNA断片) が必要である。ターゲット毎に人工合成遺伝子をオーダーし、それらを鋳型として、long ssDNAを調製した(下図)。調製したlong ssDNAをノックイン用のドナーDNAとして、Cas9タンパク質およびガイドRNAと共にB6C3F1マウス由来の受精卵にマイクロインジェクション法で導入し、産仔数をカウントした。産まれたマウスにインサート配列が正しく挿入されていることをシーケンス解析により確認し、その数をカウントした。



■ 実験結果

ターゲット遺伝子 (Gene A～D) に対して正確にノックインされたマウスの数を下表にまとめた。

遺伝子	ノックインカセット (bp)	相同アーム (bp)	テンプレートDNA準備方法	卵管移植した受精卵数	産仔数	正確なノックイン	効率
Gene B	1,116 bp	293 bp, 304 bp	人工合成遺伝子	155	7	3	42%
Gene C	1,362 bp	307 bp, 238 bp	人工合成遺伝子	136	28	2	7%
Gene D	1,277 bp	257 bp, 273 bp	人工合成遺伝子	49	5	1	20%

また、上述の人工合成遺伝子や手持ちのプラスミド DNAを元にして、左右の相同アームを[In-Fusion HD Cloning Kit \(製品コード 639648\)](#)を用いてクローニングし、long ssDNAのテンプレートを作製した。下表のように、これらをテンプレートとしてssDNAを調製した場合も、効率良くノックインマウスを得ることができた。

遺伝子	ノックインカセット (bp)	相同アーム (bp)	テンプレートDNA準備方法	卵管移植した受精卵数	産仔数	正確なノックイン	効率
Gene A	1,125 bp	297 bp, 313 bp	In-Fusion Cloning	60	13	3	23%
Gene B	1,362 bp	293 bp, 304 bp	In-Fusion Cloning	62	10	2	20%
Gene C	1,116 bp	307 bp, 238 bp	In-Fusion Cloning	68	5	2	40%

■ 本製品の感想など

インサート配列と左右の相同アームからなる二本鎖DNAテンプレートを人工合成遺伝子として準備すれば、Guide-it Long ssDNA Production Systemを用いることにより、面倒なクローニング操作を全く行わずに*in vivo*でノックインマウスを作製することができる。目的のマウスが得られるまでの作業時間も短縮され、1回の受精卵インジェクションにより必要な数のマウスを確実に取得できるようになった。ノックインする遺伝子カセットの配列によってはPCR条件の至適化が必要であるが、1.5 kb程度のlong ssDNAをシンプルな操作で調製することができ、受託サービスでssDNAの人工合成物を注文するよりもコストを大幅に抑えることができるので、今後も引き続き使用予定である。