

Title	オオミジンコにおけるゲノム編集技術の開発
Author(s)	中西, 貴士
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/55982">https://doi.org/10.18910/55982</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

博士学位論文

オオミジンコにおける  
ゲノム編集技術の開発

中西 貴士

2016年1月

大阪大学大学院工学研究科



# 目次

第 1 章 緒論.....	1
1-1. はじめに .....	1
1-2. ミジンコの実験動物としての特徴.....	2
1-3. ミジンコにおけるエコジェノミクスの発展.....	3
1-4. ミジンコにおけるトキシコジェノミクスの発展.....	4
1-5. ミジンコで利用可能な遺伝子操作技術.....	5
1-6. ゲノム編集技術.....	6
1-7. 研究目的 .....	10
第 2 章 CRISPR-Cas を用いた標的遺伝子破壊技術の開発 .....	11
2-1. 緒言 .....	11
2-2. 実験方法 .....	12
2-2-1. 実験動物と飼育条件 .....	12
2-2-2. <i>Dma-ey</i> 遺伝子の部分的な cDNA 配列の決定 .....	12
2-2-3. ZiFiT を用いた gRNA 標的配列の選定.....	13
2-2-4. RNA 発現ベクターの構築.....	13
2-2-5. <i>in vitro</i> での RNA 合成 .....	14
2-2-6. マイクロインジェクション .....	15
2-2-7. 標的遺伝子座の PCR 増幅.....	15
2-3. 実験結果 .....	17
2-3-1. <i>Dma-ey</i> 遺伝子の機能解析.....	17
2-3-2. CRISPR-Cas による <i>Dma-ey</i> 遺伝子破壊.....	19
2-3-3. ノックアウト個体における off-target 変異 .....	22
2-4. 考察 .....	23
第 3 章 TALEN を利用した相同組換えによる外来遺伝子導入技術の開発 .....	25
3-1. 緒言 .....	25
3-2. 実験方法 .....	26
3-2-1. 実験動物と飼育条件 .....	26
3-2-2. <i>Dma-lig4</i> 遺伝子の部分的な cDNA 配列の決定.....	27
3-2-3. RNA 発現ベクターの構築.....	27
3-2-4. <i>in vitro</i> での RNA 合成 .....	28
3-2-5. ドナーDNA の構築 .....	28

3-2-6. マイクロインジェクション .....	29
3-2-7. ジェノタイピング .....	29
3-3. 実験結果 .....	31
3-3-1. TALEN による HR ノックイン実験系 .....	31
3-3-2. TALEN タンパク質の設計と濃度条件 .....	34
3-3-3. ドナーDNA の設計と濃度条件 .....	34
3-3-4. TALEN mRNA と targeting plasmid の共注入 .....	35
3-3-5. TALEN mRNA と ssODN の共注入 .....	38
3-3-6. CRISPR-Cas による <i>lig4</i> 遺伝子欠損変異体の樹立 .....	38
3-3-7. TALEN による HR ノックイン技術の <i>Dma-lig4</i> 変異体への応用 .....	45
3-4. 考察 .....	47
第 4 章 TALEN を利用した非相同末端結合による外来遺伝子導入技術の開発 .....	49
4-1. 緒言 .....	49
4-2. 実験方法 .....	50
4-2-1. 実験動物と飼育条件 .....	50
4-2-2. プラスミドの構築 .....	50
4-2-3. <i>in vitro</i> での RNA 合成 .....	51
4-2-4. マイクロインジェクション .....	51
4-2-5. GFP 発現トランスジェニック個体 (TG1, TG3) のジェノタイピング .....	52
4-2-6. GFP 発現トランスジェニック個体 (TG2) のジェノタイピング .....	54
4-3. 実験結果 .....	56
4-3-1. ランダム挿入法によるドナープラスミドのゲノムへの導入 .....	56
4-3-2. TALEN による NHEJ ノックインを利用したドナープラスミドのゲノムへの導入 .....	58
4-3-3. GFP 発現トランスジェニック個体のジェノタイピング .....	61
4-4. 考察 .....	65
第 5 章 総括 .....	67
5-1. 総括 .....	67
5-2. おわりに .....	69
引用文献 .....	71
発表論文 .....	79
謝辞 .....	80





## 第 1 章 緒論

### 1-1. はじめに

オオミジンコは淡水系に棲むプランクトン性の甲殻類である。環境の変化に敏感に反応するという特徴をもつため、生態学や環境毒性学などの分野で広く研究されてきた。

例えば、良好な環境下において、ミジンコは雌が雌を産む単為生殖により個体数を増やすが、環境が悪化すると選択的に雄を産んで有性生殖を行なう。このように、ミジンコは環境刺激に応じて生殖戦略を変化させることができる。同様の現象は他の生物でも観察されるが、それを可能にする遺伝子基盤はほとんど理解が進んでいない。

また、ミジンコは環境中に排出された人工化学物質に対する感受性が高いことも知られている。環境中の化学物質は単一でなく複数のものが混ざり合っているため、その生物への毒性を調べることは困難である。

以上のように、天然・非天然を問わず、環境から受ける刺激に対してミジンコがどのような挙動を示すか、という研究がこれまでに蓄積されてきた。近年では、これらの刺激に対してどのような遺伝子群が応答しているかを明らかにするために、DNA マイクロアレイやトランスクリプトームなどのゲノム解析技術が活用されている。

しかしながら、ジェノミクスにより得られた膨大な遺伝子情報の中から、注目している表現型に関連のある遺伝子（責任遺伝子）を同定することは困難である。遺伝子情報と表現型との相関を直接的に調べる方法として、遺伝子操作技術は強力なツールとなる。

ジェノミクス研究の発展とともに、ミジンコでも RNA 干渉法などの遺伝子操作技術が開発されてきており、遺伝子機能解析が進みつつある。しかし、ゲノム配列自体を改変し、恒常的に遺伝子の機能を失った変異体や、外来遺伝子をゲノムに挿入されたトランスジェニック個体を作成することは困難であった。

上記の問題に対処するため、本研究では近年めざましく発展しているゲノム編集技術に着目した。ゲノム編集技術は、標的 DNA 配列に特異的なヌクレアーゼを利用することで、遺伝子破壊ならびに遺伝子導入を可能にする。

本研究では、ゲノム編集ツールの CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat- CRISPR-associated protein) および TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) に着目し、これらを利用した標的遺伝子破壊技術、外来遺伝子導入技術をオオミジンコで確立することを目的とした。これらの技術は、集積されてきたミジンコの遺伝子情報と、環境刺激に応じて可塑的に変化する表現型との関連を調べるうえで重要な役割を果たすと考えられる。



## 1-2. ミジンコの実験動物としての特徴

オオミジンコ (*Daphnia magna*) は淡水性の微小甲殻類の一種である。世界中の湖沼に広く分布し、成長が早い (約 1 週間で成体)、多産である (成体は 3 日に 1 回、20~30 匹の仔虫を産む)、通常単為生殖で殖える (図 1-1) などの特徴から、実験動物として扱いが容易であったために、古くから様々な分野で利用されてきた。

例えば Metchinikoff は細胞性免疫の一環としてマクロファージが寄生細菌を攻撃することを、ミジンコを用いた実験で突き止め、1908 年にノーベル医学・生理学賞を受賞している [1]。また、同様にミジンコを使用して、Weismann らは動物において体細胞は遺伝に関わらず、生殖細胞のみが遺伝情報の担い手として働くことを提唱した [2]。このように、100 年以上前からミジンコは実験動物として免疫学、発生学などで利用されてきたものの、遺伝学的手法が使えなかったために、その後はキイロショウジョウバエやマウスなどの生物が実験動物として広く活用されるようになった。

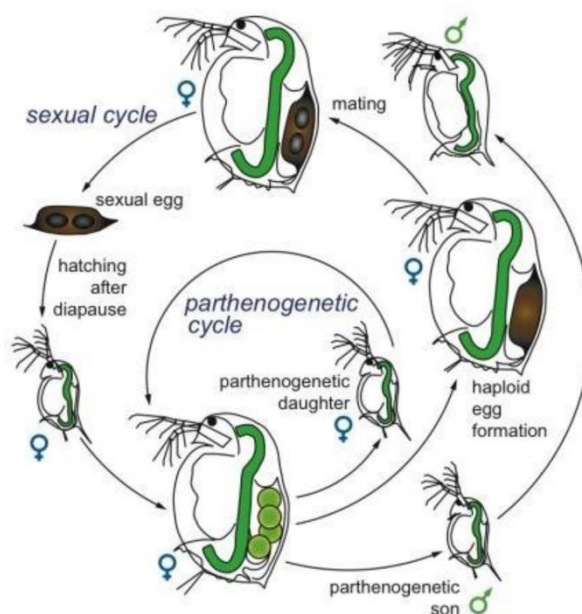


図 1-1. ミジンコの生活環

良好な環境下で、ミジンコは単為生殖により雌が雌を産み続ける形で増殖する (parthenogenetic cycle)。しかし、周囲の環境が悪化する (日照不足、餌不足など) と、選択的に雄を産んで有性生殖を行なう (sexual cycle)。生じた有性生殖卵 (休眠卵) は黒く固いさやに覆われており、周囲の環境が好転すると孵化して雌個体が現れる。図は Ebert (2005) より改変した [3]。

しかしながら、湖沼の生態系においてミジンコは藻類（生産者）を捕食し、魚類（第二次消費者）に捕食される「第一次消費者」という食物連鎖上重要な位置に存在するため、生態学や環境学の分野では引き続き研究が進められてきた。その結果、ミジンコは環境刺激に応答して表現型を可塑的に変化させることが明らかになってきた。例えば、捕食者の存在を感知して体の形態を変化させる [4]、周囲の環境の悪化（日照時間の低下など）を感知して生殖戦略を単為生殖から有性生殖に切り替える [5] などが報告されている。さらに、ミジンコは環境中に漏出した人工化学物質にも高い感受性を示すことがわかってきた [6]。このように、天然・非天然を問わず、環境刺激が個体に与える影響はミジンコではよく調べられているものの、ショウジョウバエやマウスなどのモデル生物ではほとんど調べられていない。

近年では、環境刺激を受けてどのような遺伝子群が応答しているかを明らかにするため、ミジンコでジェノミクス研究が発展してきた。まず、EST (Expressed Sequence Tags) が解析され、ミジンコで発現している cDNA 配列のデータベースが整備された [7]。続いて、オオミジンコ (*D. magna*) と近縁種のミジンコ (*D. pulex*) のゲノム配列が解読され、ゲノムデータベースも整備された [8, 9]。これにより、ミジンコが示す環境刺激依存的な応答を遺伝子レベルで研究する基盤が確立されつつある。

### 1-3. ミジンコにおけるエコジェノミクスの発展

上述したように、ミジンコは環境からの刺激に応じて表現型を変化させることが知られている。以下によく研究されている例を二つ示す。

一つ目の例は、捕食者の存在に応じて体の形態を変化させるものである。ミジンコが棲む湖沼などの生態系には様々な生物が生息しており、動物プランクトンであるミジンコは魚類や水生昆虫からの捕食リスクにさらされている。捕食を避けるために、ミジンコは捕食者が出す水溶性の化学物質（カイロモン）を常に探知している。例えば、フサカ (*Chaoborus* spp.) の幼虫が同じ水域に存在する場合、ミジンコ (*D. pulex*) はフサカから発されるカイロモンを検知し、捕食をまぬがれるために体の一部を棘状に変化させる [4]。常に棘状の表現型を示していると、軍拡競争により捕食者も棘を出すミジンコを食べられるように適応する可能性があるため、このように捕食者が存在するときのみ棘状の表現型を示すことは生存に有利であると考えられる。このような表現型を示す責任遺伝子を調べるためにジェノミクスを用いたアプローチがとられており、いくつかの候補遺伝子が提案されている [10]。しかしながら、ミジンコで利用可能な遺伝子操作技術に制限があるため、それら候補遺伝子の機能については理解が進んでいない。

二つ目の例は、図 1-1 でも示されている生殖戦略の切り替えである。ミジンコは良好な環境条件下では、雌が雌を産む単為生殖により急速に個体数を増やす戦略をとっている。一方で、日照時間の低下や餌不足などを感知すると、ミジンコは選択的に雄を産ん

で有性生殖を行なう。有性生殖卵（休眠卵）は固いさやに覆われており、乾燥などの悪条件にさらされても生存を続けることができる。環境条件が好転すると、有性生殖卵から孵化してきた雌が単為生殖により再度個体数を増やす。この機構の中で重要な点の一つは、単為生殖で生まれる雌と雄は全く同じセットの遺伝子をもつにも関わらず、性的特徴が異なることである。近年、ジェノミクス的手法を利用してこの機構の遺伝子基盤が調べられつつあるが、責任遺伝子のひとつとして *doublesex1 (dsx1)* という転写因子しか判明しておらず、環境刺激が雄を誘導する全体のメカニズムは明らかになっていない [11]。

このような環境刺激に応じて表現型を変化させる性質は、ミジンコだけでなくアブラムシや甲虫類でも確認されているものの、責任遺伝子やそのメカニズムはほとんどわかっていない [12]。表現型と遺伝子情報の関連を調べるためには遺伝子破壊などの技術が必要だが、これらの生物では遺伝子操作技術が開発されていないため研究が困難である。このような性質の遺伝子基盤を明らかにすることは、生態学並びに発生生物学の分野で重要な知見となる。

#### 1-4. ミジンコにおけるトキシコジェノミクスの発展

環境化学物質の毒性を調べる研究から、ミジンコは幅広い種類の化学物質に低濃度で反応するという特徴が指摘されてきた [6]。そのため、経済協力開発機構（OECD: Organization for Economic Co-operation and Development）が提案する環境化学物質の毒性試験において、ミジンコがモデル生物として利用されている。しかしながら、現行の毒性試験では、環境中に複合的に存在する人工化学物質の毒性を予測するのは極めて難しい。そこで、ジェノミクスのアプローチを利用して生態系に棲む生物における遺伝子発現状態を解析し、そのプロファイルから環境中の残留化学物質の毒性を評価する方法が進展しつつある [13, 14]。実際に、化学物質の曝露下におけるミジンコの遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイにより解析した例が報告されている [15-16]。このようなアプローチは、化学物質の毒性作用機序の解明や、バイオマーカーの探索に有効であると期待される。

一方で、低濃度の化学物質にも応答できるという特徴から、ミジンコ個体自体を環境毒性のインジケータとして利用する試みもある。例えば、遺伝子組換え技術を利用して、農薬に使用される昆虫ホルモン活性物質の存在下で蛍光を発するレポーターミジンコが提案された [17]。このように、遺伝子組換え技術を用いた化学物質検出系はゼブラフィッシュなど魚類でも研究されている [18]。効率的にトランスジェニックミジンコを作出する遺伝子操作技術が確立できれば、様々な毒性化学物質を検出するレポーターミジンコが開発できると期待される。

## 1-5. ミジンコで利用可能な遺伝子操作技術

1-3, 1-4 項で紹介した通り、ミジンコは環境刺激 (天然・非天然を問わず) に敏感に反応する特徴をもつ。このような特徴の遺伝子基盤を理解することは、生態学や発生生物学において重要な知見になると考えられる。また、この特徴を応用して人工化学物質を検出するレポーターミジンコを作出すれば、環境水の簡便な検査に利用できるかもしれない。これらを達成するためには恒常的に遺伝子を改変する技術が必要となるが、ミジンコで利用可能な遺伝子操作技術は限られていた (表 1-1)。

### ■ 機能欠損 (loss of function)

機能欠損を誘導するための技術として、加藤らにより RNA 干渉法がミジンコで確立された [19]。RNA 干渉法では、標的遺伝子に特異的な配列をもつ短い二本鎖 RNA (dsRNA: double strand RNA) または一本鎖 RNA (siRNA: small interfering RNA) を細胞または動物胚に導入することで、標的遺伝子特異的に発現量を減少させて機能抑制を図る。ミジンコでも RNA 干渉法は効率よく働き、標的遺伝子の機能を調べる際に利用されてきた [19, 20]。しかしながら、RNA 干渉法は標的遺伝子の機能を完全には抑制できない、効果が一過的なため胚発生時期にしか機能抑制表現型が観察できないという欠点があった。つまり、標的遺伝子を DNA レベルで配列を改変して破壊 (ノックアウト) し、恒常的な機能欠損変異体を樹立する方法は未開発であった (表 1-1)。

### ■ 機能獲得 (gain of function)

機能獲得を誘導する技術として、まず加藤らはエレクトロポレーション法をミジンコで確立した (表 1-1)。この技術を用いて、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を含む plasmid DNA を幼体のミジンコ個体に導入し、発現を誘導した [21]。これはミジンコで外来遺伝子を発現させた世界初の例であったが、この技術は幼体のミジンコ個体にしか適用できない、plasmid DNA がどの細胞に入るかは選択できないなどの問題があった。ミジンコ胚で外来遺伝子を発現させる場合、2011 年の RNA 干渉法とともに開発された胚への顕微注入技術が利用できるが、その効果は一過的であった。そこで次に開発された技術が plasmid DNA のゲノムへのランダム挿入法である [22]。ランダム挿入法では、plasmid DNA を胚に顕微注入すると、ある確率で plasmid DNA がゲノム上のランダムな位置に挿入される現象を利用して、外来遺伝子をゲノムに組み込む。実際に、加藤らはヒストン融合 GFP 遺伝子をミジンコゲノムに組み込み、胚発生過程を GFP 蛍光で可視化することに成功した [22]。しかしながら、ランダム挿入法には (1) トランスジェニック樹立効率が低く顕微注入に多大な労力と時間を要する、(2) ゲノム挿入時に目的の

遺伝子が壊れる可能性がある、(3) 挿入される遺伝子座を選択できないなどの問題があった。つまり、トランスジェニックミジンコを作出することは未だ困難で、特に外来遺伝子を高効率で狙った遺伝子座に組み込むことはできなかった (表 1-1)。

表 1-1. ミジンコで利用可能な遺伝子操作技術

効果	機能欠損	機能獲得
一過的	RNA 干渉法 [19]	mRNA or plasmid DNA のインジェクション エレクトロポレーション [21]
恒常的	未開発	ランダム挿入法 [22] <span style="float: right;">困難</span>

## 1-6. ゲノム編集技術

そこで本研究では、近年爆発的に普及しているゲノム編集ツールに着目した。ゲノム編集とは、標的・特異的ヌクレアーゼを用いることで、ターゲット遺伝子座に特異的なゲノム配列改変を可能にする技術である [23, 24]。ゲノム編集ツールは、大きく以下の3つに分けられる。

### ■ ZFN (Zinc Finger Nuclease)

ZFN は最初に報告された標的・特異的ヌクレアーゼで、ジンクフィンガータンパク質由来の DNA 結合ドメインと *FokI* ヌクレアーゼドメインを人工的に融合させたものである [25]。標的 DNA 配列への特異性はジンクフィンガー-DNA 結合ドメインが担う。DNA 結合ドメインは複数のジンクフィンガーから構成され、ひとつのジンクフィンガーが 3 bp を認識する。一方で、ヌクレアーゼ活性は *FokI* 部分が担う。*FokI* ドメインはヌクレアーゼ活性を示すのに二量体化する必要があるため、標的 DNA 配列を挟む形で ZFN モノマーを左右にひとつずつ設計する。左右の ZFN 認識配列の間 (スペーサー) は 5-7 bp あける必要がある。設計したふたつの ZFN モノマーを細胞または動物胚で発現させることで、標的 DNA 配列特異的にゲノムを切断できる。ZFN によるゲノム編集は哺乳類や魚類、昆虫など様々な生物で成功例が報告されているものの [23, 26]、いくつかの欠点も存在する。第一に、ターゲットの選定が困難である。ひとつのジンクフィンガー-DNA 結合ドメインは 3 塩基のトリプレットを認識するが、発見されたジンクフィンガーは全ての可能な組み合わせのトリプレット ( $4^3 = 64$  通り) を網羅していないため、標的にできない DNA 配列が存在する。第二に、作製に時間がかかる。任意の標的 DNA 配列そ

れぞれについて ZFN のアミノ酸配列を改変する必要があり、クローニングに時間と労力を要する。第三に、細胞毒性が高い。そのため、以下に紹介する TALEN や CRISPR-Cas ほど広範な研究に利用されては来なかった。

## ■ TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)

TALEN は *Xanthomonas spp.* がもつ TALE (Transcription Activator-Like Effector) タンパク質由来の DNA 結合ドメインと、FokIヌクレアーゼドメインを融合した人工ヌクレアーゼである (図 1-2, [27])。TALE の DNA 結合ドメインは高度に保存された 34 アミノ酸のリピートから成っており、1 リピートが 1 塩基を特異的に認識する。34 アミノ酸のうち、12 番目と 13 番目のアミノ酸は可変性が高いため RVD (Repeat Variable Diresidue) とよばれており、RVD の種類によって結合する塩基が変化する (RVD>塩基として、NN>G, NG>T, NI>A, HD>C, [28-29])。つまり、RVD を含むリピートを任意の順に組み合わせることで、標的配列に特異的に結合させることが可能になる。ZFN とは利用している DNA 結合ドメインが異なるだけで、標的 DNA 配列の切断機構はほぼ同じである。TALEN が他の標的的特異的ヌクレアーゼと比べて有利な点は、基本的にどんな標的 DNA 配列でもターゲットにできる点である。一方で、以下に紹介する CRISPR-Cas と比べると、ZFN と同様に標的に応じて TALE のアミノ酸配列を改変する必要があり、クローニングに時間と労力を要する。

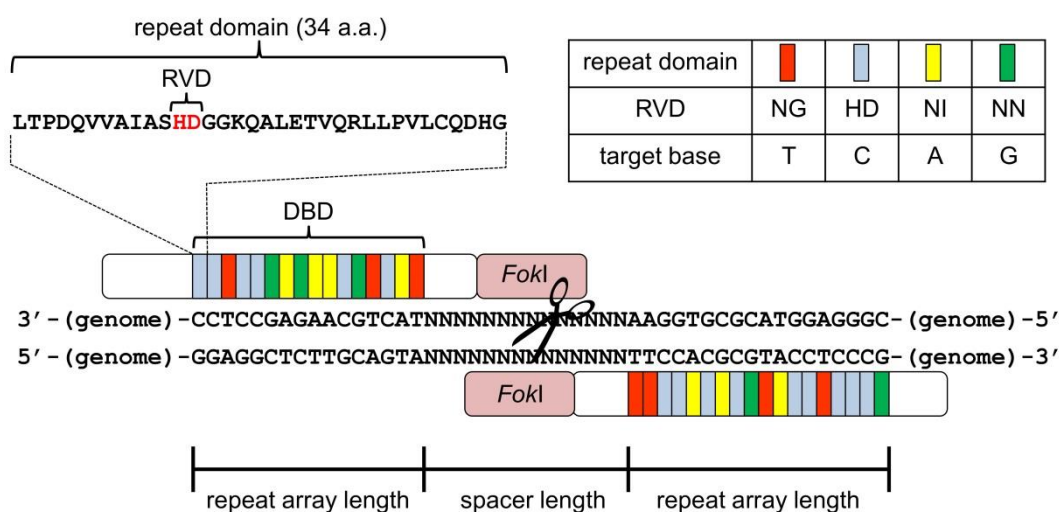


図 1-2. TALEN の模式図

DNA 結合ドメイン (DBD) は複数のリピートドメインで構成され、1 リピートは 34 アミノ酸から成る。34 アミノ酸のうち、12, 13 番目のアミノ酸は RVD とよばれ、RVD の種類によりリピートが認識する塩基が変化する (図右上表)。TALEN

は、DNA 結合ドメインの C 末端側に *FokI* ヌクレアーゼドメインをもつ。*FokI* ヌクレアーゼは二量体化しなければ切断活性を示さないので、標的 DNA 配列の左右を挟む形で 2 つの TALEN タンパク質を設計する必要がある。左右の TALEN 認識配列の間をスペーサーといい、この中央付近に二本鎖切断が導入される。図は Naitou, *et al.*, (2015) [30] より改変。

#### ■ CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-CRISPR-associated protein)

CRISPR-Cas はバクテリアにおいて、感染性ファージやプラスミドに対する獲得免疫機構として機能している [31]。このシステムでは、CRISPR RNA (crRNA) と transactivating crRNA (tracrRNA) がヘテロ二量体を形成し、crRNA に相補的な標的 DNA に Cas9 ヌクレアーゼを誘導することで、ターゲットの二本鎖切断を達成する。また、人工的に crRNA と tracrRNA をつないだ single guide RNA (sgRNA または単に gRNA) も Cas9 タンパク質を標的 DNA に誘導する機能を果たすことが報告された (図 1-3, [32])。つまり、ZFN または TALEN では DNA 結合ドメインが標的 DNA 配列への特異性を決定しているのに対し、CRISPR-Cas では gRNA の核酸配列が標的への特異性を決定している。そのため、標的 DNA 配列それぞれについてタンパク質を改変する必要がなく、簡便かつ迅速に実験系を設計することが可能である。現在世界的に利用されている *Streptococcus pyogenes* 由来の CRISPR-Cas システムで標的可能な DNA 配列は、gRNA に相補的な 20 bp の 3'末端側に protospacer adjacent motif (PAM: 5'-NGG-3') とよばれる配列を必要とする (図 1-3)。さらに、T7 プロモーターを用いて gRNA を *in vitro* 合成する場合、標的 DNA は 5'末端が GG で開始されなければならない。つまり、この場合標的可能な DNA 配列は 5'-GG-N<sub>19</sub>-GG-3'となる。この制限のために、TALEN と比較すると標的可能な DNA 配列はわずかに限られる。

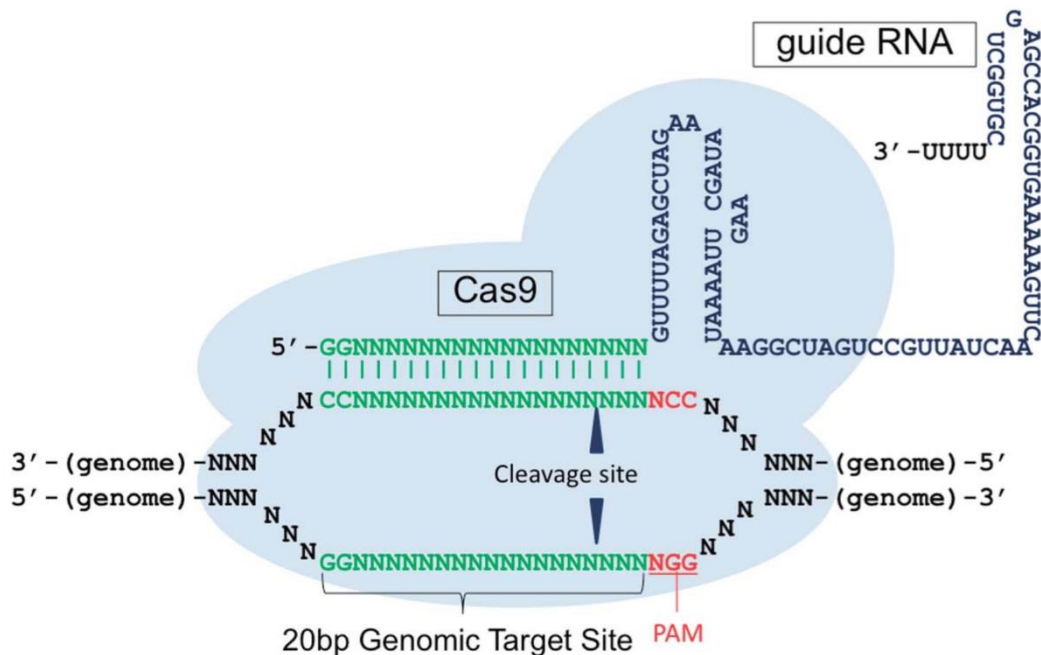


図 1-3. CRISPR-Cas システムによる標的 DNA 二本鎖切断の概要

guide RNA (gRNA) が相補的な塩基配列 (緑) を利用して、20 bp の標的ゲノム配列に結合する。標的配列は PAM とよばれる 5'-NGG-3'配列を 3'末端側に必要とする。gRNA の残りの塩基配列 (青) は Cas9 スクレーアーゼ (薄青球) と相互作用する。予想される二本鎖切断部位は三角形で示す。

以上のゲノム編集ツールはすべて、標的ゲノム配列を特異的に切断することに主眼を置いている。切断されたゲノム DNA は、エラー許容性の非相同末端結合 (NHEJ: non-homologous end joining) 修復機構または相同組換え (HR: homologous recombination) 修復機構により結合される (図 1-4)。NHEJ 機構により切断部位が修復される時、切断部位にランダムな in-del (insertion and/or deletion) 変異が導入されることがある。これを意図的に引き起こしてフレームシフトを誘導することで、標的遺伝子破壊 (ノックアウト) を行なうことができる。一方で、ゲノム切断時に外来遺伝子配列をふくむドナー DNA を供給しておく、HR 機構が働いてドナー DNA を取り込みながら切断部位が修復される。この現象を利用することで、外来遺伝子導入 (ノックイン) を行なうことができる [33]。



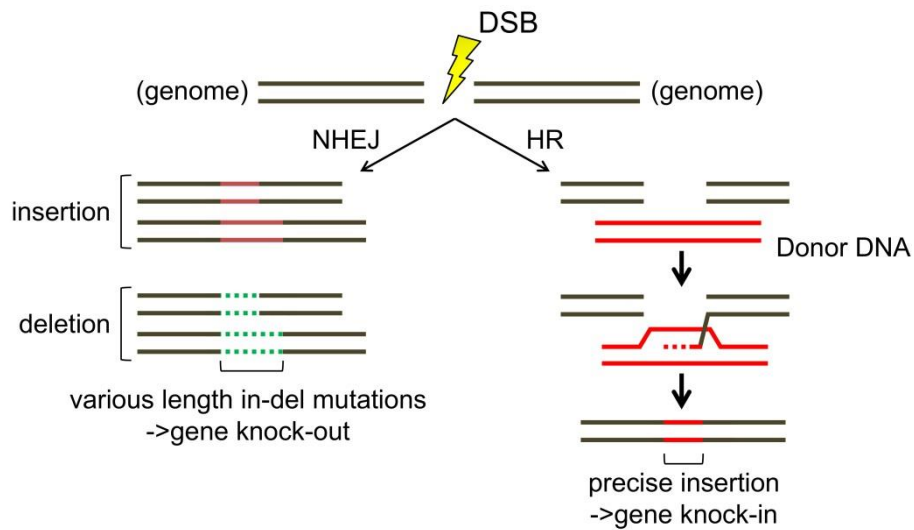


図 1-4. 標的・特異的ヌクレアーゼによるノックアウト、ノックイン  
ゲノムに二本鎖切断 (DSB) が導入された場合、細胞は切断箇所を修復する必要がある。非相同末端結合 (NHEJ) 機構により修復されるとき、塩基の挿入/欠失がランダムに導入される。これによりフレームシフトが起こると、標的遺伝子をノックアウトすることができる。一方で、DSB 導入時に外来遺伝子を含むドナーDNA を供給しておくことで、相同組換え (HR) 修復機構により外来遺伝子を取り込んで切断箇所が修復される。これにより、標的遺伝子座にノックインを行なうことができる。

## 1-7. 研究目的

現在ミジンコで利用可能な遺伝子操作技術には制限がある。機能欠損を誘導する場合、恒常的に標的遺伝子機能を破壊する、つまりノックアウト変異体を作成することはできない。また、機能獲得型のトランスジェニック系統を樹立する場合、既存のランダム挿入法は効率が低いので顕微注入実験に多大な労力と時間を要し、実用的ではない。本研究では、ゲノム編集ツールである TALEN や CRISPR-Cas を利用して、ミジンコで高効率なノックアウト、ノックイン技術を確立することを目的とした。

## 第 2 章 CRISPR-Cas を用いた標的遺伝子破壊技術の開発

### 2-1. 緒言

CRISPR-Cas は、ノックアウトやノックインに利用されるゲノム編集ツールのひとつである。簡便かつ迅速に実験系を設計できるため、様々な生物種、培養細胞で CRISPR-Cas を利用したノックアウトが報告されている [33]。

オオミジンコはプランクトン性の甲殻類で、淡水系に広く分布している。環境の変化や人工化学物質に敏感に反応するという特徴のため、生態学や毒性学において古くからモデル生物として利用されてきた [3]。近年ではジェノミクスの発展により、ミジンコのゲノム配列や EST (Expressed Sequence Tags) が解析されており、膨大な量の遺伝子情報が蓄積されつつある [7-9]。これらの遺伝子情報と表現型との相関を調べるために、逆遺伝学的なアプローチのひとつである RNA 干渉法がミジンコで確立された [19]。しかしながら、RNA 干渉法には完全に標的の遺伝子機能を欠損できない、効果が一過性であるという欠点があった。そこで本章では、上記の欠点を克服するため、CRISPR-Cas を利用したノックアウト技術を確立することを目的とした。

CRISPR-Cas を用いたノックアウトがミジンコで利用可能か簡便に調べるために、複眼の形態形成に必須の *eyeless* (*ey*) 遺伝子ホモログを標的とした。本研究では、オオミジンコの *ey* 遺伝子ホモログを *Daphnia magna eyeless: Dma-ey* と名付けた。*ey* 遺伝子は哺乳類における *pax6* 遺伝子のオルソログで、これらの遺伝子は非脊椎動物、脊椎動物を問わず広く保存されている。この遺伝子は眼の形態形成に関わる遺伝子群の発現を制御する転写因子をコードしており、DNA 結合ドメインとして *paired box*、*homeobox* とよばれるふたつのドメインをもつ。ショウジョウバエやマウスなどのモデル生物において *ey* または *pax6* の変異体は眼の一部または全体が欠損することが知られている [34-37]。異常な形態をした眼 (複眼) をもつミジンコは、正常な個体と比べて見た目に明らかな差異があるため、*Dma-ey* 遺伝子はノックアウトのマーカーとして適していると考えられた。

本章では、*Dma-ey* 遺伝子 cDNA を一部クローニングして配列を確認したあと、その領域を標的として RNA 干渉を行なうことで、ミジンコで *Dma-ey* が複眼の形態形成に関与することを確認した。次に、*in vitro* で合成した Cas9 mRNA と *Dma-ey* targeting gRNA を胚にマイクロインジェクションすることで、*Dma-ey* 遺伝子のノックアウトを試みた。RNA 濃度条件を検討した結果、最大で約 8% の効率で *Dma-ey* ノックアウトシステムを作出することに成功した。作出されたノックアウト個体のゲノム配列を調べたところ、すべて両アレルの gRNA ターゲット部位に *in-del* 変異が導入されていた。さらに、gRNA ターゲットの類似配列 (off-target) には *in-del* 変異は導入されていなかったため、CRISPR-Cas によるノックアウトは高い標的的特異性をもつと考えられた。以上の実験か

ら、ミジンコで初めて標的遺伝子破壊技術を確立することができた。CRISPR-Cas によるノックアウト技術は、今後ミジンコの遺伝子機能を解析するうえで非常に有用なツールになると期待される。

## 2-2. 実験方法

### 2-2-1. 実験動物と飼育条件

オオミジンコは、国立環境研究所より分与された NIES 系統を使用した。NIES 系統は、米国環境保護庁 (US EPA) より国立環境研究所に分与され、20 年以上継代されている株である。

飼育水には Aachener Daphnien Medium (ADaM) を使用した [38]。5 L の ADaM に 80 匹の幼体 (24 時間齢以下) を加え、1 週齢になるまでは餌として  $4.8 \times 10^8$  cells/day のクロレラ (日海センター) を与えた。2 週齢以降は毎日産仔される幼体を取り除きつつ  $9.6 \times 10^8$  cells/day のクロレラを与えた。飼育温度は 22 – 24°C、明暗条件は明 16 時間、暗 8 時間とした。

### 2-2-2. *Dma-ey* 遺伝子の部分的な cDNA 配列の決定

2 週齢以上のミジンコを 1 匹スクリーキャップチューブ (TOMY) に入れ、1 mL の Sepasol RNA I Super G (ナカライテスク) と  $\phi 1.0$  のジルコニアビーズを加えた。Micro Smash MS-100 (TOMY) を用いて、3,000 rpm、30 秒間の振動破碎を 3 回繰り返して行なった。以下の操作はプロバイダーのマニュアルに従い、total RNA の抽出・精製を行なった。回収された RNA 量は Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) により測定した。

次に、Super Script III (Invitrogen) を用いて、プロバイダーのマニュアルに従い回収された total RNA を鋳型に cDNA を合成した。合成された cDNA を鋳型に、*Dma-ey* 遺伝子を標的としたプライマーを用いて、以下のように Reverse Transcription (RT)-PCR を行なった。

(反応溶液)

5x PrimeSTAR buffer	5 $\mu$ L
2.5 mM dNTPs mix	2 $\mu$ L
5 $\mu$ M forward primer	2 $\mu$ L
5 $\mu$ M reverse primer	2 $\mu$ L
1.25 U/ $\mu$ L PrimeSTAR GXL polymerase	0.5 $\mu$ L
cDNA sample	1 $\mu$ L

miliQ water	to 25 $\mu$ L
-------------	---------------

(サーマルサイクラー設定)

	98 °C	5 min
x30 cycles	98 °C	10 sec
	55 °C	30 sec
	68 °C	1 min
	68 °C	7 min
	15 °C	hold

得られた PCR 産物のサイズはアガロースゲル電気泳動により確認した。

次に、*Dma-ey* 遺伝子由来の PCR 産物を MinElute PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて精製した。精製された PCR 産物は pBlunt II-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングした。クローンした PCR 産物の配列は、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) を利用した Sanger Sequencing により同定した。使用したプライマーの配列は表 2-B にまとめた。また、すべての PCR 反応には PrimeSTAR (TaKaRa Bio) を用いた。

### 2-2-3. ZiFiT を用いた gRNA 標的配列の選定

2-2-2 で同定した *Dma-ey* 遺伝子の cDNA 配列をもとに、gRNA 標的配列を ZiFiT (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/ChoiceMenu.aspx> の CRISPR/Cas Nuclease を選択) で選定した [39-40]。具体的には、オープンボックスに cDNA 配列を入力し、[length of target site] は 20 に、プルダウンでは [T7 promoter] を選択した。[identify target sites] により得られた候補配列から、適切な位置のターゲットを合計で 2 つ選択した。標的配列は表 2-A にまとめた。

### 2-2-4. RNA 発現ベクターの構築

*Streptococcus pyogenes* 由来 Cas9 タンパク質を発現するベクター pCS-Dmavas-Cas9 を構築するために、Cas9 ORF を MLM3613 プラスミド (Addgene plasmid 42251, [41]) から PCR により増幅した。*Dmavas* 遺伝子 (Accession: AB193324.1) の 5' および 3' UTR は、NIES 株の cDNA から RT-PCR により増幅した。In-Fusion cloning kit (TaKaRa Bio) を用いて、pCS+ベクター上の SP6 プロモーター下流に、上記の PCR 産物を 5' UTR-Cas9 ORF-3' UTR の並びでクローニングした (= pCS-Dmavas-Cas9)。クローンしたプラスミドは XL10-Gold *E. coli* コンピテントセルに形質転換し、pCS-Dmavas-Cas9 を抽出・精製

した。

次に、*Dma-ey* 遺伝子を標的とする gRNA の発現ベクター pDR274-*Dma-ey* を構築するために、DR274 プラスミド (Addgene plasmid 42250, [41]) を *Bsa*I 制限酵素で切断した。切断された DNA フラグメントは、Antarctic Phosphatase (New England Biolab) を用いて脱リン酸化した後、MinElute PCR purification kit (QIAGEN) によりカラム精製した。サーマルサイクラーを用いて、以下の設定で 5'-位にリン酸基を付与して合成された *Dma-ey* targeting oligo DNA をアニーリングした。

(サーマルサイクラー設定)

	98 °C	4 min
	98 °C	1 min
*Slope	<b>30 °C</b>	<b>60 min</b>
	4 °C	15 min
	4 °C	hold

\*Slope: 60 分かけて 98 °C から 30 °C に温度を変化させた。

上述の *Bsa*I-digested DR274 フラグメントを *Dma-ey* targeting dsDNA と混合し、TaKaRa ligation mix (TaKaRa Bio) を用いて、サーマルサイクラー上で 16 °C、30 分インキュベートシライゲーション反応を行なった (= pDR274-*Dma-ey*)。ライゲーション溶液を XL10-Gold *E. coli* コンピテントセルに形質転換し、pDR274-*Dma-ey* を抽出・精製した。*Dma-ey* targeting oligo DNA の配列および使用したプライマーの配列は表 2-A, B にまとめた。また、すべての PCR 反応には PrimeSTAR (TaKaRa Bio) を用いた。

#### 2-2-5. *in vitro* での RNA 合成

*Dma-ey* ノックダウン実験に使用した small interfering RNA (siRNA) は、Block-iT RNAi Designer (<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/>) により設計した。さらに、それぞれの siRNA の 3'末端には dTdT というジヌクレオチドを付与した。使用した siRNA の配列は表 2-A にまとめた。

次に、Cas9 mRNA を合成するために、鋳型となる DNA 断片を、T7 プロモーターを付与したプライマーを用いて pCS-Dmavas-Cas9 プラスミドから PCR 増幅した。得られた PCR 産物をフェノール-クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法でペレット化し、UltraPure DNase RNase free water (Life Technologies) に溶解させた。精製された PCR 産物を鋳型に、mMessage mMachine T7 kit (Life Technologies) を用いて capped RNA を合成した。さらに、PolyA tailing kit (Life Technologies) を用いて capped RNA に polyA 鎖を付与した。それぞれの実験操作はプロバイダーのマニュアルに従った。合成された mRNA

を、mini Quick Spin RNA column (Roche diagnostics) によりカラム精製後、2 回のフェノール抽出、2 回のクロロホルム抽出、2 回のエタノール沈殿を行なった。RNA ペレットは適量の UltraPure DNase RNase free water (Life Technologies) に溶解した。

次に、gRNA を合成するために、pDR274-Dma-ey プラスミドを *DraI* 制限酵素で処理し、酵素不活化のためにフェノール-クロロホルム抽出を行なった。*DraI* で切断された DNA 断片を鋳型として、mMessage mMachine T7 kit (Life Technologies) を用いて gRNA を合成した。Cas9 mRNA と同様に、mini Quick Spin RNA column (Roche diagnostics) のカラム精製、2 回のフェノール抽出、2 回のクロロホルム抽出、2 回のエタノール沈殿を行なうことで、合成された gRNA を精製した。RNA ペレットは適量の UltraPure DNase RNase free water (Life Technologies) に溶解した。

#### 2-2-6. マイクロインジェクション

Kato Y, *et al.*, 2011 で確立されたプロトコールにしたがい、*in vitro* で合成された RNA をミジンコ胚に顕微注入した [19]。産卵後 1 時間以内の初期胚をミジンコ成体から回収したのち、胚発生を遅らせるために氷冷した M4-Sucrose 培養液 (Sucrose 80 mM) に初期胚を移した。合成 RNA 溶液はガラス針に充填し、窒素ガス圧で溶液を送り込むことで初期胚に注入した。注入量は約 0.2 nL とした。

#### 2-2-7. 標的遺伝子座の PCR 増幅

Cas9 により in-del 変異が標的遺伝子座に導入されたか確認するために、複眼が奇形のみジンコからゲノム DNA を抽出し、gRNA 標的部局周辺の DNA 配列を PCR により増幅した。複眼が奇形のみジンコを 1 匹スクリーキャップチューブ (TOMY) に入れ、液体窒素で瞬間凍結後、1  $\mu$ L の salmon sperm DNA (10 mg/mL)、90  $\mu$ L の 50 mM NaOH と  $\phi$ 1.0 のジルコニアビーズを加えた。Micro Smash MS-100 (TOMY) を用いて、3,000 rpm、30 秒間の振動破碎を 3 回繰り返して行なった。破碎液を 95°C で 10 分間インキュベートしたのち、10  $\mu$ L の 1 M Tris-HCl (pH. 7.5) を加えて中和した (= 粗 DNA 抽出液)。標的部局の DNA 断片を得るために、この粗 DNA 抽出液を 12,000 rpm で 5 分間遠心したのち、上澄みを鋳型 DNA として以下のように PCR を行なった。

(反応溶液)

10x KOD plus buffer	1.25 $\mu$ L
2 mM dNTPs mix	1.25 $\mu$ L
25 mM MgSO <sub>4</sub>	0.5 $\mu$ L
5 $\mu$ M forward primer	1 $\mu$ L

5 $\mu$ M reverse primer	1 $\mu$ L
1 U/ $\mu$ L KOD plus polymerase	0.5 $\mu$ L
crude genome DNA sample	1 $\mu$ L
miliQ water	to 12.5 $\mu$ L

(サーマルサイクラー条件)

	94 °C	2 min
x35 cycles	94 °C	15 sec
	55 °C	30 sec
	68 °C	1 min
	68 °C	7 min
	15 °C	hold

PCR 産物のサイズをアガロースゲル電気泳動で調べたのち、MinElute PCR purification kit (QIAGEN) によりカラム精製した。精製された PCR 産物は pBlunt II-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングした。クローンした PCR 産物の配列は、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) を利用した Sanger Sequencing により同定した。使用したプライマーの配列は表 2-B にまとめた。また、すべての PCR 反応には KOD plus (TOYOBO) を用いた。

表 2-A,B. 第 2 章で使用したオリゴ DNA、RNA の配列

A.

Name	Target site (5'-3', PAM shown by lowercase)	Sense oligonucleotide (5'-3')	Antisense oligonucleotide (5'-3')
Dma-ey-gRNA-1	GGTGTTGTTGTCGTCGGCGTggg	TAGGTGTTGTTGTC GTCGGCGT	AAACACGCCGACGA CAACAACA
Dma-ey-gRNA-2	GGCGTCGTGAGGAGAAATTAcgg	TAGGCGTCGTGAGG AGAAATTA	AAACTAATTTCTCC TCACGACG
Dma-ey-siRNA	TTGAACGGACTCATTATCC	UUGAACGGACUCAU UAUCCtt	GGAUAAUGAGUCCG UUCAAtt

B.

Primer name	Sequence (5'-3')	Purpose
Dmavas-5UTR-fwd	GAGACAAAACGTTTCACAATTG	Cloning Dmavas 5' and 3' UTRs
Dmavas-5UTRnest-rev	TTTTAAAAGCCTTTTTCAAGTAA	
Dmavas-3UTR-fwd	CTCGAGGTCGTTAACTTGATTG	
Dmavas-3UTR-rev	AACAAAATGAATTCGTTCTGTATTC	
IF-vasMLMCas9-fwd	AAAAGGCTTTTTAAAAATGGATAAGAAATAC TCAATAG	Amprifying Cas9 ORF
IF-vasMLMCas9-rev	GTTAACGACCTCGAGTCATCCTGCAGCTCC ACC	
IF-pCSvas-fwd	CGAATTCATTTTGTGGTACCCAGCTTTTG TTCC	Construction of Dmavas-Cas9 expression vector
IF-pCSvas-rev	GAAACGTTTTGTCTCCTCTTCTATAGTGTC ACCTAAATCAAG	
T7-vasCas9-IVT-fwd	TAATACGACTCACTATAGGGAGGAGACAAA AC	Amprifying Dmavas-Cas9 fragment for in vitro transcription
Dma-ey_homeo_fwd	GTGACGATGTGATGTCGGA	RT-PCR and Genotyping on Dma-ey gene
Dma-ey_homeo_rev	TCAATGAACGGATTTGGTG	
Dma-ey_homeo_rev2	TGCACCACAACAGTCACAAC	
off855-fwd	GAAATCCAAACAACAAGATTCCG	Validation of off-target effect
off855-rev	GGTGGAGGATACAAAGAACG	
off915-fwd	GACGCCATCATGTCAACAC	
off915-rev	CTGCCTGTTAATTCTTCCTCG	
off986-fwd	TGTTGAGATCCGCTTCAGAC	
off986-rev	GGAGTGACATCTGACGACTTTG	
off3390-fwd	AATTCCAAAACACACCCAAG	
off3390-rev	CGACAAGAACAACACCACC	

(A) gRNA、siRNA の標的配列。また、それらを構築するセンス、アンチセンスオリゴDNA/RNA の配列。(B) プライマー配列。

## 2-3. 実験結果

### 2-3-1. *Dma-ey* 遺伝子の機能解析

*Dma-ey* 遺伝子をノックアウト実験のマーカーとして利用するために、哺乳類の *pax6*



オルソログをミジンコゲノム中で探索した。BLAST 検索の結果、いくつかの節足動物で保存されていることが知られている *ey*、*twin of eyeless (toy)* 遺伝子がそれぞれ確認された [42]。ミジンコゲノムデータベースより、*Dma-ey* 遺伝子は 13 のエクソンから成ると予想された (図 2-1)。homeobox ドメインを包括するプライマーセットを用いて RT-PCR を実施し、得られた PCR 産物の配列を確認したところ、*Dma-ey* 遺伝子が当研究室のミジンコで発現していることが確認された (図 2-2)。

*Dma-ey* 遺伝子が複眼の形態形成に関与するか調べるために、RNA 干渉法によるノックダウンを試みた。homeobox ドメインをコードする領域に siRNA を設計し、ミジンコの卵に顕微注入した。その結果、野生型ミジンコの複眼は頭頂部前方に位置し、さらに球形をしているのに対し、100  $\mu$ M の siRNA をインジェクションされたミジンコの複眼は体内側 (神経側) に位置し、さらに球形を構築できていなかった (図 2-3 右)。本研究では、上述の表現型を *deformed eye* と呼称する。以上の結果から、*Dma-ey* 遺伝子は複眼の形態形成に関与することが示唆された。さらに、*deformed eye* の表現型は見た目にも明らかなで判別が容易なので、*Dma-ey* 遺伝子は以下につづく CRISPR-Cas によるノックアウト実験のモデルターゲットとして適していると考えられた。

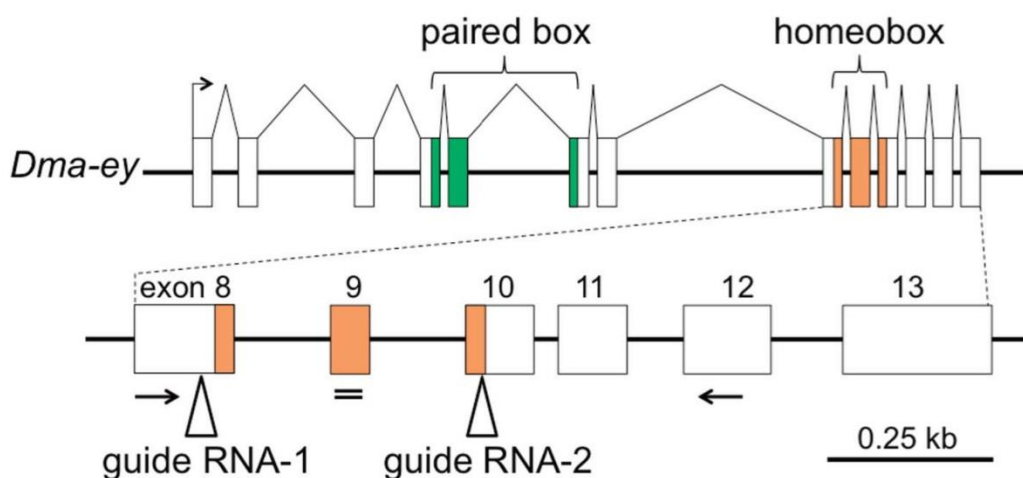


図 2-1. *Dma-ey* 遺伝子のエクソン/イントロン構造

*Dma-ey* 遺伝子は 13 のエクソン (矩形) から構成されると予想された。Dma-EY タンパク質の機能に重要な DNA 結合ドメイン (paired box, homeobox) をコードしているエクソンはそれぞれ緑、オレンジでハイライトしてある。RT-PCR に使用したプライマーの位置は矢印で示した。siRNA で標的とした領域は二重線で、gRNA で標的とした領域は三角形で示した。

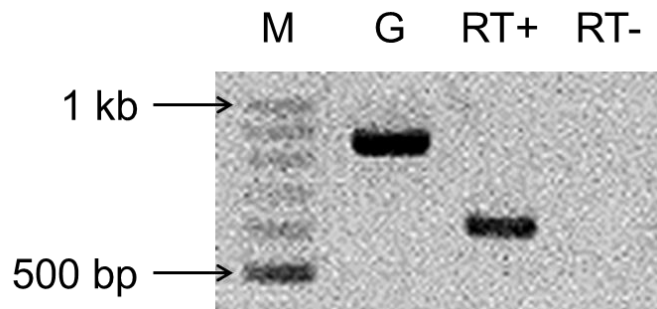


図 2-2. *Dma-ey* 遺伝子に対する RT-PCR 産物の電気泳動結果  
M: 100 bp DNA ラダーマーカー (TOYOBO), G: ゲノム PCR 産物 (陽性対照)、RT+:  
逆転写合成した cDNA から増幅された RT-PCR 産物, RT-: 逆転写反応を行わない  
total RNA を鋳型に増幅した RT-PCR 産物。

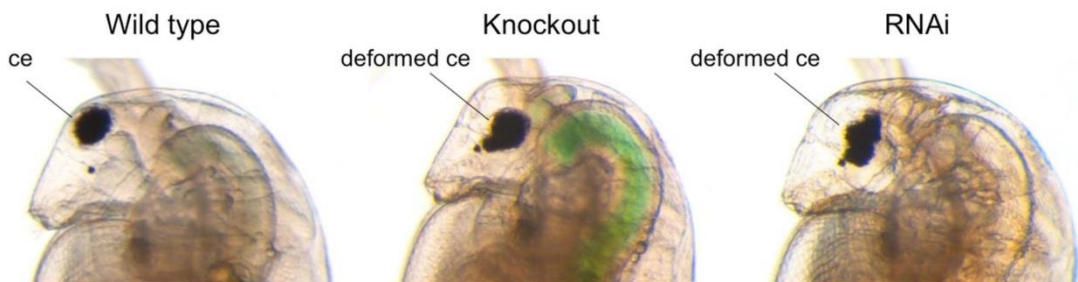


図 2-3. *Dma-ey* 遺伝子ノックアウト、ノックダウンの表現型  
左、中央、右の順に野生型、CRISPR-Cas によるノックアウト個体、siRNA による  
ノックダウン個体の頭部側面の写真が示してある。中央のノックアウト個体は図  
2-4 における”mutant #5 (m5)”である。

### 2-3-2. CRISPR-Cas による *Dma-ey* 遺伝子破壊

CRISPR-Cas がミジンコでもノックアウトに利用できるか調べるために、*Dma-ey* 遺伝子の homeobox ドメインを標的とした。先行研究で、homeobox ドメインを含む C 末端領域を欠損した *ey* 遺伝子をホモで保持するショウジョウバエが、複眼を完全に欠損することが知られている [43]。同様の変異を *Dma-ey* 遺伝子に導入することで、ミジンコでも当該遺伝子の機能を欠損させることができると考えられた。homeobox 領域を標的とするために、exon 8 のセンス鎖に gRNA-1、exon 10 のアンチセンス鎖に gRNA-2 を設計した (図 2-1)。先行研究で、複数の gRNA の共注入により変位導入効率が上昇するこ

とが示唆されていたため、設計した二つの gRNA を Cas9 mRNA とともにミジンコ胚に共注入した。このとき、Cas9 タンパク質を生殖細胞で高発現させるために、Cas9 mRNA には *Daphnia magna vasa* (*Dma-vas*) 遺伝子の 5', 3'-非翻訳領域 (UTR: untranslated region) を付与しておいた [44]。注入する RNA の濃度条件について、Cas9 mRNA は 3 パターン (500; 1,000; 2,000 ng/μL)、gRNA mix は 2 パターン (50; 150 ng/μL each) の合計 6 パターンを検討した (表 2-1)。各条件での顕微注入実験を行なったところ、インジェクションされた胚から 61-78%の幼体が生存した。さらに、生存した幼体の 18-47%が deformed eye 表現型を示した。これは、CRISPR-Cas がミジンコの少なくとも体細胞で機能し、*Dma-ey* 遺伝子をノックアウトしたことを示唆している。

生殖細胞において CRISPR-Cas が機能したか調べるために、インジェクションされた個体 (G0: Generation 0 とよぶ)の成熟後、それぞれの G0 から産まれる G1 仔虫に deformed eye の表現型を示すもの (ノックアウト G1) がいるか調べた。さらに、ノックアウト系統の樹立効率を計算するために、全 G0 のうちノックアウト G1 を産仔する G0 (ファウンダーG0) の個体数を数えた。結果として、[Cas9 mRNA, gRNA mix] = [2,000 ng/μL, 50 each ng/μL] の条件を除いて、ファウンダーG0 は 2.6-8.2%の効率で得ることができた (表 2-1)。マイクロインジェクション技術には個人差があるため、ファウンダーG0 の樹立効率を計算する際、母数はインジェクションした胚の数ではなく生存した成体の数とした。図 2-3 中央に示す通り、得られたノックアウト G1 の表現型は siRNA によるノックダウン個体とよく似ていた。最終的に得られた 14 のノックアウト系統のうち、13 系統のノックアウト G1 は産まれたあと一週間以内に死亡した。先行研究から、ショウジョウバエにおいて *ey* 遺伝子は劣性致死遺伝子であることが知られており、本結果とよく一致している。しかしながら、残りの 1 系統は生存可能で、deformed eye 表現型も世代を超えて観察された。変異体間の生存可能性における違いは、詳細を後述する (考察)。さらに、ノックアウト G1 のゲノムにどのような in-del 変異が導入されたか調べるために、14 系統中、生存可能な 1 系統を含んで合計 5 系統のノックアウト G1 からゲノム DNA を抽出し、gRNA 標的部位の配列を調べた (表 2-1)。その結果、ノックアウト G1 の *Dma-ey* 遺伝子座において、両アレルの gRNA 標的部位に in-del 変異が導入されたことが確認できた (図 2-4)。以上をまとめると、CRISPR-Cas はミジンコの体細胞だけでなく生殖細胞でも機能し、ノックアウトを引き起こすことができることが示された。

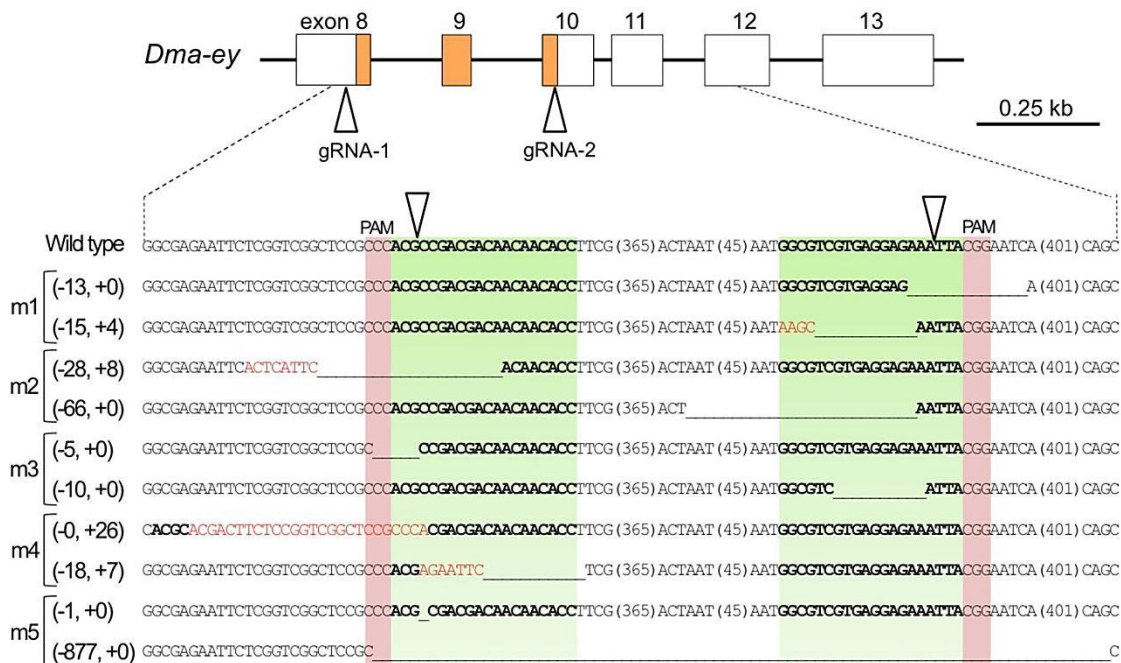


図 2-4. *Dma-ey* ノックアウト個体のゲノムに導入された in-del 変異  
 gRNA で標的とした homeobox 領域 (オレンジ) を含む、部分的な *Dma-ey* 遺伝子座のエクソン/イントロン構造を上部に示した。DNA 配列のアライメントにおいて、上段に野生型の DNA 配列が、それ以下に各変異体 (mutant #1-5: m1-m5) の DNA 配列を示した。gRNA ターゲットは緑で、PAM 配列は赤でハイライトした。また、Cas9 タンパク質による DNA 切断位置は三角形で示した。in-del 変異の長さ (bp) を各 DNA 配列の左側に数字で示した。各 DNA 配列において、アンダーバーで塩基の欠失を、赤文字で塩基の挿入をそれぞれ示した。太字の塩基で gRNA 標的配列を、丸括弧中の数字で省略された塩基の長さ (bp) をそれぞれ示した。

表 2-1. 様々な RNA 濃度条件下での変位導入効率

RNA concentrations (ng/μL)		Embryos	Juveniles		Adults	
gRNA mix	Cas9 mRNA	Injected	Surviving	Deformed eye	Surviving	Founder lines
50 each	500	77	59 / 77 (77%)	28 / 59 (47%)	49 / 77 (64%)	*4 / 49 (8.2%)
	1,000	121	90 / 121 (74%)	16 / 90 (18%)	81 / 121 (67%)	5 / 81 (6.2%)
	2,000	113	75 / 113 (66%)	29 / 75 (39%)	61 / 113 (54%)	0 / 61 (0%)

150 each	500	98	70 / 98 (71%)	19 / 70 (27%)	60 / 98 (61%)	2 / 60 (3.3%)
	1,000	86	67 / 86 (78%)	20 / 67 (30%)	60 / 86 (70%)	*2 / 60 (3.3%)
	2,000	64	39 / 64 (61%)	8 / 39 (21%)	38 / 64 (59%)	*1 / 38 (2.6%)

\**Dma-ey* 変異体のうち、ジェノタイピングに使用されたもの。図 2-4 中で、m1 と m2 は [gRNA mix, Cas9 mRNA] = [50 each, 500] の 4 系統から 2 つを選んだ。m3 と m4 は [gRNA mix, Cas9 mRNA] = [150 each, 1,000] の 2 系統を、m5 は [gRNA mix, Cas9 mRNA] = [150 each, 2,000] の 1 系統を選んだ。

### 2-3-3. ノックアウト個体における off-target 変異

CRISPR-Cas システムにおいて、ターゲットの特異性は gRNA がもつ 20 bp の標的に相補な配列に依存している。そのため、ゲノム上にターゲットによく似た配列 (off target) が存在する場合、ターゲットだけでなく類似配列も標的となり、in-del 変異が導入される可能性がある [45-46]。そこで、本項では樹立された *Dma-ey* ノックアウト G1 個体に off-target 変異が導入されたかを調べた。

先行研究から、off-target になりうる配列の条件が以下のように提案されている。

- (1) 本来の標的 (on-target) とのミスマッチが 5 bp 以下である
- (2) 3'末端に PAM (NGG) 配列が存在する

そこで、ミジンコゲノムデータベースを用いて、BLASTn 検索により off-target 配列を探索した。結果として、gRNA-1 は 4 つの off-target 候補が見つかり、gRNA-2 については以上の条件を満たす off-target 候補は見つからなかった (表 2-2)。前項 (2-3-2) で樹立されたノックアウト G1 個体が上記 4 つの off-target 候補部位に in-del 変異をもつか調べるために、ジェノタイピングした 5 系統のゲノム DNA について、各 off-target 周辺をゲノム PCR により増幅し配列を調べた。結果として、どの系統のゲノムにも off-target 変異は確認されなかった。以上の結果は、ミジンコにおける CRISPR-Cas を用いた遺伝子破壊技術は、高い標的特異性をもつことを示唆している。

表 2-2. gRNA-1 の off-target 候補配列

	on-/off-target sites (5'-3')	Locations	Annotations	Mismatches
on target	GGTGTGTTGTTGTCGTCGGCGTggg	exon	eyeless	-
off target	GGTGTGTTG <b>G</b> TGTCGTCGGCGTcgg	exon	protocadherin fat 2 precursor	1 bp
	G <b>T</b> TGG <b>T</b> GTTGTCGTCGG <b>C</b> A <b>T</b> cgg	exon	cytochrome c oxidase	3 bp
	<b>A</b> <b>T</b> TGG <b>T</b> GTTGTCGTCGG <b>C</b> A <b>T</b> cgg	exon	cytochrome c oxidase	4 bp
	<b>T</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>C</b> G <b>T</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> GTCGGCGTtgg	intergenic	-	5 bp

表中左側から、on-/off-target のゲノム配列 (大文字) と PAM 配列 (小文字)、ゲノム上の位置、アノテーション、ミスマッチ塩基 (赤文字) の数 (bp) を示した。

## 2-4. 考察

本章では、ミジンコにおける CRISPR-Cas を利用した標的遺伝子破壊技術の確立を行った。そのために、複眼の形態形成に必須の *Dma-ey* 遺伝子をモデルターゲットとして選定し、*in vitro* で合成した Cas9 mRNA と *Dma-ey* targeting gRNA をミジンコ胚に共注入することで、*Dma-ey* 遺伝子への in-del 変異の導入を試みた。様々な RNA 濃度条件を調べたところ、ロックアウト G1 仔虫を産仔するファウンダー G0 個体が最大 8% 程度の効率で樹立できた。以上より、CRISPR-Cas を用いたロックアウトは、簡便かつ高効率にミジンコ内在性の遺伝子を破壊できる技術だと考えられる。

これまでミジンコで利用可能な逆遺伝学的ツールは RNA 干渉法のみであったが、(1) 標的遺伝子の機能を完全には欠損させられない、(2) 一過的にしか標的遺伝子機能を抑制できないところが欠点であった。本章で確立した CRISPR-Cas によるロックアウト技術は、上記 (1), (2) の欠点を克服しており、対象遺伝子の機能を完全に欠損させた表現型を、生活環全体を通して観察可能にする。このロックアウト技術は、今後ミジンコの遺伝子機能を解析するうえで重要な役割を果たすと考えられる。

通常好ましい環境下で単為生殖を行なうミジンコで遺伝子機能解析を行なうにあたり、CRISPR-Cas の簡便かつ高効率で両アレルに機能欠損変異を導入できるという特徴は非常に重要である。ヘテロ変異体同士を交配させてホモ変異体を作成する場合、ミジンコに環境ストレス (餌不足、日照時間短縮など) を与えてオス産生を惹起し、有性生殖卵 (耐久卵) を得たのち、環境を整えて耐久卵からの孵化を促すなどの膨大で時間のかかる実験操作が必要になる。CRISPR-Cas によるロックアウト技術の簡便かつ高効率な特徴は、ミジンコを含む単為生殖を行なう生物における遺伝学を発展させると考えられる。

本章の実験で、Cas9 mRNA と gRNA-1, -2 mix の濃度条件は合計で 6 パターンが試験され、そのうち [Cas9 mRNA, gRNA mix] = [2,000 ng/μL, 50 ng/μL each] の条件でのみフ

ファウンダーG0 が得られなかった。細胞内に gRNA と結合していないフリーの Cas9 タンパク質が過剰に存在した場合、Cas9 タンパク質が凝集して機能しなくなると仮定すると、この実験結果は説明がつく。この解釈は、gRNA の濃度を大きくした場合 ([Cas9 mRNA, gRNA mix] = [2,000 ng/μL, 150 ng/μL each]) にファウンダーG0 が得られた実験結果と矛盾しない。本章の実験データから上記仮説の真偽を明確にはできないが、Cas9, gRNA のモル比は CRISPR-Cas システムの活性に大きな影響を与えると考えられる。

本研究で樹立された 14 系統の *Dma-ey* ノックアウトのうち、1 系統のみが生存可能であった。ショウジョウバエやマウスの先行研究で明らか通り、*Dma-ey* のホモログ *ey* または mammalian *pax6* のホモ変異体は致死の表現型を示すため、13 系統の致死的な表現型は *Dma-ey* 遺伝子の完全な機能欠損によるものだと考えられる [36, 43]。生存可能な系統は、片方のアレルに 1 bp 欠損 (フレームシフト変異)、もう一方のアレルに 877 bp の欠損を保有していた。しかしながら、877 bp の欠損は *Dma-EY* タンパク質の homeobox ドメイン全体を欠落させているものの、それ以降の C 末端領域に関しては本来の読み枠を保ったままであった。ヒトやゼブラフィッシュ由来の PAX6 タンパク質を用いた研究で、PAX6 は homeobox ドメインよりも C 末端側に重要な機能ドメイン (PST ドメイン) をもち、そこがリン酸化を受けることで PAX6 の転写能力を活性化されることが報告されている [47-49]。したがって、ミジンコでも同様の PST ドメインが保存されており、生存可能な変異体においては 877 bp 欠損アレルがコードしている *Dma-EY* タンパク質が C 末端領域 (putative PST ドメイン) を保持しているために完全には機能を失っていないことが示唆される。これが原因で、*deformed eye* の表現型は示すが生存可能な *Dma-ey* 変異体を得られたと考えられる。

CRISPR-Cas を利用することで、ノックアウトだけでなく将来的にノックインもミジンコで可能になると考えられる。細胞内で生じたゲノムの二本鎖切断は主に非相同末端結合または相同組換え修復により修復される [50]。ゲノムの二本鎖切断は、切断箇所における標的遺伝子組換え (gene targeting) を促進することが示唆されている [51]。先行研究において、CRISPR コンポーネントとともに外来遺伝子を plasmid DNA や single strand oligo DNA (ssODN) の形で細胞に共導入することで、標的遺伝子座へのノックインに成功した例が報告されている [52-54]。ミジンコでも同様のアプローチをとることで、インテグラーゼの標的配列 (e.g. attP) やエピトープタグ配列 (e.g. His タグ) などの外来 DNA 配列をミジンコゲノムに導入できると期待される。

以上のように、CRISPR-Cas を用いたゲノム編集技術は遺伝子破壊にとどまらない多様な応用研究を可能にし、ミジンコのジェノミクス研究を大きく加速させると考えられる。

## 第 3 章 TALEN を利用した相同組換えによる外来遺伝子導入技術の開発

### 3-1. 緒言

第 2 章で、CRISPR-Cas を利用した標的遺伝子破壊技術をミジンコで確立した。これまでミジンコでは RNA 干渉法でしか標的遺伝子の loss of function を誘導できなかったが、RNA 干渉法には完全な機能欠損を引き起こせない、機能抑制効果が一過的であるなどの問題点があった [19]。CRISPR-Cas を利用したノックアウト技術は以上の問題点を克服し、恒常的に標的遺伝子の機能を喪失した変異体を作成することがミジンコでも可能となった。

一方で、ミジンコのゲノムに外来遺伝子を導入する、つまりトランスジェニック個体を作成することはまだ困難であった。近年、我々の研究室は plasmid DNA のみをミジンコ胚に顕微注入することで、plasmid をゲノム上のランダムな位置に挿入することに成功した (ランダム挿入法, [22])。これにより、蛍光タンパク質を用いてミジンコの胚発生を可視化することができた。しかしながら、ランダム挿入法には以下の 3 つの欠点がある。(1) 低効率 (1%以下) なため顕微注入実験に多大な労力を要する、(2) ゲノム挿入時に目的の遺伝子が欠損する可能性がある、(3) 挿入遺伝子座を選択できない。

これらの問題に対処するため、相同組換え法 (HR: homologous recombination) に着目した。この方法では、plasmid DNA に目的の遺伝子だけでなく、標的遺伝子座に相同な DNA 配列 (相同領域またはホモロジーアーム) を乗せておくことで、ゲノム DNA と plasmid DNA 間で組換えが起こり、目的の遺伝子をゲノムに正確に挿入できる [55-57]。さらに、最近では plasmid DNA を供給すると同時に標的的特異的ヌクレアーゼを細胞内で発現させ、組換え時にゲノム DNA を切断することで、高効率な HR を達成できることが知られている (図 3-1, [53, 58-65])。そこで本章では、同様のアプローチをミジンコに応用することで、高効率な外来遺伝子導入法の確立を目指した。

近年、HR によるノックイン効率をさらに向上する手法が提案されている。標的的特異的ヌクレアーゼで切断されたゲノム DNA の末端は、主に非相同末端結合 (NHEJ) または相同組換え (HR) による修復で結合される。そこで、NHEJ 修復において機能する *ligase 4 (lig4)* や *Ku70* などの遺伝子を破壊または発現抑制することで、HR 効率を向上させた研究例が様々な生物種で報告されている [58, 66-69]。

本章では、ゲノム編集ツールとして TALEN に着目した。第 2 章ではミジンコの内在性遺伝子破壊に CRISPR-Cas を利用したが、ミジンコでは TALEN を用いた方が同じターゲット遺伝子を高効率でノックアウトできることが最近の我々の研究で明らかとなった [70, 71]。標的ゲノム配列の切断活性が高い方が高効率で HR を引き起こせると考えられたため、本章では TALEN を利用した HR ノックイン技術の確立を目指した。さらに、ミジンコ内在性の *D. magna-lig4 (Dma-lig4)* 遺伝子を破壊することで、HR 効率が



上昇するかも併せて検討した。

本章では、TALEN を利用した HR をミジンコ胚で引き起こすことで、ミジンコゲノムに部位特異的に外来 DNA 配列を導入することを目指した (以下、TALEN による HR ノックインとよぶ)。67 bp の外来 DNA 配列をもつドナーDNA と TALEN mRNA を胚に共注入することで、約 2% の効率で HR ノックインを達成することができた。このとき、plasmid DNA、および single strand oligo DNA (ssODN) をそれぞれドナーDNA として利用したが、どちらを使用しても HR ノックインを引き起こすことができた。また、TALEN による HR ノックインのさらなる高効率化を目指し、*Dma-lig4* ホモ変異体を作成した。しかしながら、*Dma-lig4* ホモ変異体に HR ノックインを応用しても、HR 効率の上昇は見られなかった。以上の実験から、TALEN による HR ノックイン技術を利用することで、ミジンコで初めて標的ゲノム特異的に外来遺伝子配列を挿入することに成功した。本技術は、ミジンコの遺伝子機能を調べるうえで、ノックアウト技術と併せて非常に重要な役割を果たすと考えられる。

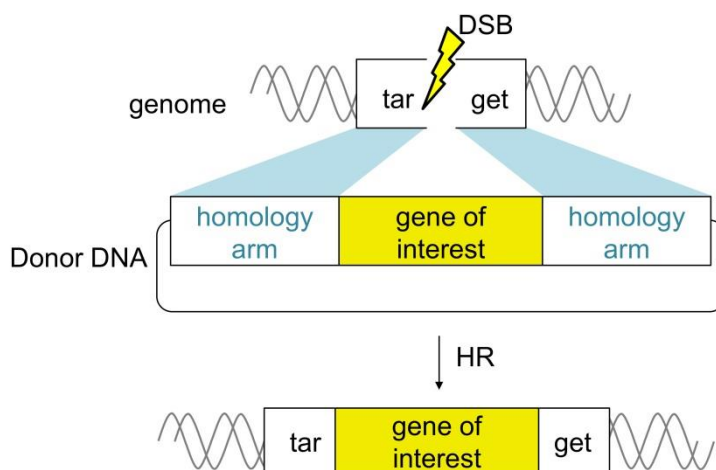


図 3-1. 標的的特異的ヌクレアーゼを利用した HR ノックインの概要

ゲノム上のターゲットに、標的的特異的ヌクレアーゼにより二本鎖切断 (DSB) を導入する。細胞は迅速に切断されたゲノム DNA を修復する必要があり、そのとき相同配列 (ホモロジーアーム) をもつドナーDNA が存在すると相同組換え (HR) が誘発され、ドナーDNA 上の目的遺伝子がゲノムに挿入される。

## 3-2. 実験方法

### 3-2-1. 実験動物と飼育条件

野生型として使用したオオミジンコは第 2 章と同様に NIES 系統である。deformed eye 表現型を示す *Dma-ey* 変異体として利用した  $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統は、第 2 章の CRISPR-Cas によるノックアウト実験により作出されたものである (図 2-E, “m5”)。また、*Dma-lig4* 遺伝子欠損の  $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  変異体は、本章で CRISPR-Cas によるノックアウト実験で樹立された。野生型、 $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  変異体、および *Dma-lig4* 遺伝子欠損の  $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  変異体すべて第 2 章と同様の条件で飼育した。

### 3-2-2. *Dma-lig4* 遺伝子の部分的な cDNA 配列の決定

使用したプライマーを除き、第 2 章と同様の手法で *Dma-lig4* 遺伝子の部分的な cDNA、ゲノム DNA 配列を決定した。使用したプライマーの配列は表 3-B にまとめた。

### 3-2-3. RNA 発現ベクターの構築

<TALEN 発現ベクター>

TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/>) を利用して、TALEN の標的部位を選択した [71]。このとき、パラメーターは以下のように設定した。

- 1) Spacer length: 15 から 20 ヌクレオチド
- 2) Repeat Array length: 15 から 20 アレイ
- 3) G substitute: NN
- 4) Streubel *et al.*, guidelines: On [72]
- 5) Upstream base: T only

最終的に選んだ TALEN の標的配列は、(left) 5'-CCGGCGAGAATTCTCGGTCG-3', (right) 5'-CGTCCGAAGGTGTTGTTGT-3'である。これらの TALEN のスペーサー部分の長さは野生型ゲノムで 18 bp、 $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  変異体ゲノムで 17 bp である。

TALEN タンパク質の DNA 結合ドメインを作製するため、ゴールドゲート法を利用して RVD リピートを任意の順序で結合させた [73]。組み立てられた RVD リピート全体は GoldyTALEN pT3TS ベクター (Addgene plasmid 38142, [63]) にクローンされ、pT3TS-ey-KI-TALEN-left および pT3TS-ey-KI-TALEN-right ベクターが構築された。ヘテロ二量体型の TALEN を利用するため、pT3TS-ey-KI-TALEN-left および pT3TS-ey-KI-TALEN-right ベクターを *XbaI* と *BsaBI* 制限酵素 (ともに New England Biolabs) により切断した。RVD リピートを含む方の *XbaI/BsaBI* 切断断片は、我々が以前の研究で作製した pCS-Dmavas-dsr-TALEN-left-ELD、pCS-Dmavas-dsr-TALEN-right-KKR ベクターの *XbaI/BsaBI* 切断部位にクローンされた [30]。以上の過程により、pCS-Dmavas-ey-KI-TALEN-left-ELD、

pCS-Dmavas-ey-KI-TALEN-right-KKR を構築した。

< Cas9, gRNA 発現ベクター >

Cas9 発現ベクター pCS-Dmavas-Cas9 は第 2 章で構築したものを使用した。

*Dma-lig4* 遺伝子を標的とする gRNA の発現ベクター pDR274-*Dma-lig4* を構築するために、第 2 章と同様の手法で gRNA 標的配列を決定し、*Dma-lig4* targeting oligo DNA を pDR274 ベクターにクローニングした。*Dma-lig4* targeting oligo DNA の配列および使用したプライマーの配列は表 3-A, B にまとめた。

#### 3-2-4. *in vitro* での RNA 合成

TALEN mRNA を合成するために、TALEN 発現ベクターを *Acc65I* 制限酵素で切断したのち、QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) で精製した。精製された断片を鋳型 DNA として、mMessage mMachine T7 kit (Life Technologies) を用いて capped RNA を合成した。さらに、PolyA tailing kit (Life Technologies) を用いて capped RNA に polyA 鎖を付与した。それぞれの実験操作はプロバイダーのマニュアルに従った。合成された mRNA を、mini Quick Spin RNA column (Roche diagnostics) によりカラム精製後、2 回のフェノール抽出、2 回のクロロホルム抽出、2 回のエタノール沈殿を行なった。RNA ペレットは適量の UltraPure DNase RNase free water (Life Technologies) に溶解させた。

Cas9 mRNA および *Dma-lig4* targeting gRNA の合成は、第 2 章と同様の手法で行なった。

#### 3-2-5. ドナー DNA の構築

ドナー DNA として ssODN と targeting plasmid の二種類を使用した。すべてのドナー DNA は、インサートとして 5'- C - (attP 60 nt) - GGATCC -3' という合計 67 塩基の外来 DNA 配列を含むように設計した (\*GGATCC は *Bam*HI 制限酵素の認識配列)。

ユーロフィンジェノミクス社に外注することで、ssODN はホモロジーアーム長の異なる二種類を合成した。上記 67 nt のインサートを中心として、標的ゲノム配列と相同な DNA 配列を 5', 3' 末端側にそれぞれ 20 nt ずつ (合計 107 mer)、または 40 nt ずつ含む (合計 147 mer) ssODN を得た。

上記 67 bp のインサートを含む targeting plasmid は、以下のように構築した。まず、TALEN 標的配列を中心とした 1.5 kb のゲノム配列を、PrimeSTAR (TaKaRa Bio) を利用した PCR により野生型ミジンコのゲノム DNA から増幅した。PCR 産物のサイズをアガロースゲル電気泳動で調べたのち、MinElute PCR purification kit (QIAGEN) によりカ

ラム精製した。精製された PCR 産物は in-Fusion kit (Clontech) により pBlunt II-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングし、pCR-BluntII-TOPO-Dma-ey1.5kb を得た。次に、60 bp のコア attP 配列は pTA-attP プラスミド (Addgene plasmid 18939, [25]) を鋳型として、KOD plus (TOYOBO) を利用した PCR により増幅された。このとき、プライマーの配列を工夫して attP 配列の 3'末端に BamHI 認識配列 (GGATCC) が付与されるように PCR を行なった。最後に、attP-BamHI の DNA 断片は、in-Fusion kit (Clontech) を用いて pCR-BluntII-TOPO-Dma-ey1.5kb の TALEN 標的部にクローニングされ、pCR-BluntII-TOPO-Dma-ey1.5kb-attP (= targeting plasmid) を得た。使用したプライマーの配列は表 3-B にまとめた。

### 3-2-6. マイクロインジェクション

第 2 章と同様の手法で行なった。

### 3-2-7. ジェノタイピング

HR ノックインによる *Dma-ey* 遺伝子座への attP 配列の挿入がミジンコの生殖細胞で起こったか調べるために、まず実体顕微鏡下で G1 仔虫の複眼の形態を観察した。続いて、正常な複眼をもつ G1 仔虫から前章 2-2-6 と同様の手法でゲノム DNA を抽出し、TaKaRa ExTaq HS (TaKaRa Bio) を利用して TALEN 標的部周辺を PCR 増幅した。PCR 産物のサイズをアガロースゲル電気泳動で調べたのち、MinElute PCR purification kit (QIAGEN) によりカラム精製した。精製された PCR 産物の DNA 配列は、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) を利用した Sanger Sequencing により同定した。使用したプライマーの配列は表 3-B にまとめた。

*Dma-lig4* 遺伝子ノックアウト系統を得るために、Cas9 mRNA と *Dma-lig4* targeting gRNA を  $ey^{A877/\Delta 1}$  系統のミジンコ胚に共注入し、成長した G0 が産仔した G1 仔虫のジェノタイピングを行なった。*Dma-lig4* ノックアウト個体は見た目に明らかな表現型を示さないと考えられたので、ランダムに 18 系統の G1 仔虫を選択し、前章 2-2-6 と同様の手法でゲノム DNA を抽出した。これらのゲノム DNA を鋳型として、TaKaRa ExTaq HS (TaKaRa Bio) により gRNA 標的部周辺を PCR 増幅した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE) で PCR 産物のサイズを確認した。両アレルに in-del 変異をもつと考えられた系統について、PCR 産物を MinElute PCR purification kit (QIAGEN) によりカラム精製した。精製された PCR 産物の DNA 配列は、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) を利用した Sanger Sequencing により同定した。使用したプライマーの配列は表 3-B にまとめた。

NHEJ 活性を *Dma-lig4* 野生型と変異体間で比較するために、TALEN mRNA と targeting

plasmid をミジンコ胚 (オリジナルの  $ey^{A877/\Delta 1}$  系統または *Dma-lig4* 欠損の  $ey^{A877/\Delta 1}$  系統) に共注入し、成長した G0 が産仔した G1 仔虫のジェノタイピングを行なった。ホストのミジンコはどちらも元々 *deformed eye* 表現型を示すため、どの G1 仔虫のゲノムに *in-del* 変異が入ったかは表現型からは判別不能である。そこで、ランダムに 24 系統の G1 仔虫をそれぞれ選択し、上記と同様にしてゲノム PCR と Native-PAGE により PCR 産物のサイズを解析することで、24 系統のうち何系統のゲノムに *in-del* 変異が挿入されたか調べた。使用したプライマーの配列は表 3-B にまとめた。

表 3-A,B. 第 3 章で使用したオリゴ DNA の配列

A.

Name	Target site (5'-3', PAM shown by lowercase)	Sense oligonucleotide (5'-3')	Antisense oligonucleotide (5'-3')
Dma-lig4-gRNA-1	AGCTTATCATCCAGATGCAAagg	TAGGCTTATCAT CCAGATGCAA	AAACTTGCATCTGG ATGATAAG
Dma-lig4-gRNA-2	GGAAGCATTCCTCTAGACGAagg	TAGGAAGCATTC CTCTAGACGA	AAACTCGTCTAGAG GAATGCTT

B.

Name	Sequence (5'-3')	Purpose
Dma-ey_homeo_fwd3	CTCTAACGCAGCAGACAACAG	Construction of donor plasmid
Dma-ey_homeo_rev	CACCAAATCCGTTTCATTGA	
IF-ey1.5k-fwd	CGACGACAACAACACCTTCGGACG	
IF-ey1.5k-rev	GCGTGGGCGGAGCCGACC	
IF-eyattP-fwd	CGGCTCCGCCCACGCCGACCCTACGCC CCCAAC	
IF-eyBamHIattP-rev	GTGTTGTTGTGTCGTCGGGATCCCGGGAG TAGTGCCCCAAC	
Dma-ey_homeo_fwd	GTGACGATGTGATGTGCGGA	Genotyping and Sequencing on Dma-ey locus
Dma-ey_homeo_rev4	GAGGCTCTCGATCTGTTCG	
Dma-lig4-RT-fwd	GAAATTGCCTGCATTGGAAC	Genotyping and Sequencing on Dma-lig4 locus
Dma-lig5-RT-rev	GAGCCAACACGAGCGAAAG	
Dma-lig4-genome-fwd1	TATGGGTATTATTACGGCG	
Dma-lig4-genome-rev2	TCCAAGCTACCATTTACCA	

T7-vasCas9-IVT-fwd	TAATACGACTCACTATAGGGAGGAGAC AAAAC	Template synthesis for Cas9 mRNA transcription
Dmavas-3UTR-rev	AACAAAATGAATTCGTTCTGTATTC	

(A) gRNA の標的配列。また、それらを構築するセンス、アンチセンスオリゴ DNA/RNA の配列。(B) プライマー配列。

### 3-3. 実験結果

#### 3-3-1. TALEN による HR ノックイン実験系

ミジンコで TALEN による HR ノックインが引き起こせるかどうか効率的に調べるために、容易に選別可能な表現型を示す遺伝子を選択する必要があった。第 2 章の研究で、*Dma-ey* 遺伝子の両アレルに *in-del* 変異をもつ個体は複眼の形態形成に異常をきたし、奇形の複眼 (*deformed eye*) という見た目に明らかな表現型を示すことがわかった (図 3-2)。そこで、図 3-3 に示すように、TALEN による HR ノックインを利用した *deformed eye* 表現型のレスキュー実験を設計した。この実験系では、*Dma-ey* 遺伝子座に導入された変異を回復させるような外来 DNA 配列を含むドナー DNA と、TALEN mRNA を *Dma-ey* 変異体の胚に共注入する必要がある。もし TALEN による HR ノックインが成功したなら、HR 個体は正常な複眼 (*normal eye*) をもつため HR ノックインの成否を簡単に判別できると考えられた。

上記の実験系を実現するために、第 2 章で得られた生存可能な *Dma-ey* 変異体 (図 2-4, “m5”) に着目した。この変異体は *Dma-ey* 遺伝子座の片方のアレルに 877 bp の欠失 ( $\Delta 877$  アレル) を、もう一方のアレルに 1 bp の欠失 ( $\Delta 1$  アレル) を保持しているため、 $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統と名付けた (図 3-4)。 $\Delta 1$  アレルは 1 bp 欠損によりフレームシフト変異を引き起こしているため、HR ノックインで読み枠を正常通りに戻すことができれば、 $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統の *deformed eye* 表現型が回復すると考えられた (図 3-5)。そこで本章では、外来 DNA 配列として *phiC31* インテグラーゼの認識配列である *attP* を含む合計 67 bp を  $\Delta 1$  アレルに導入することを試みた (図 3-4, [74])。この 67 bp インサートは、5'-3'方向に (1) 本来  $\Delta 1$  アレルに存在していたシトシン (C)、(2) 60 bp の *attP* 配列、(3) 6 bp の *Bam*HI 制限酵素サイトの三つから成る。このインサートが期待通り  $\Delta 1$  アレルに挿入された場合、*Dma-EY* のペプチド配列上、二つの DNA 結合ドメイン間にあるリンカー領域に 22 アミノ酸が追加されることになる (図 3-4)。そのため、22 アミノ酸が挿入されても *Dma-EY* タンパク質は正常に機能し、*deformed eye* 表現型はレスキューされると想定された。



図 3-2.  $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統の deformed eye 表現型

(左) 正常な複眼 (ce: compound eye) をもつ野生型、(右) 奇形の複眼 (deformed ce) をもつ  $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統。これらの表現型は実体顕微鏡下で容易に判別できる。

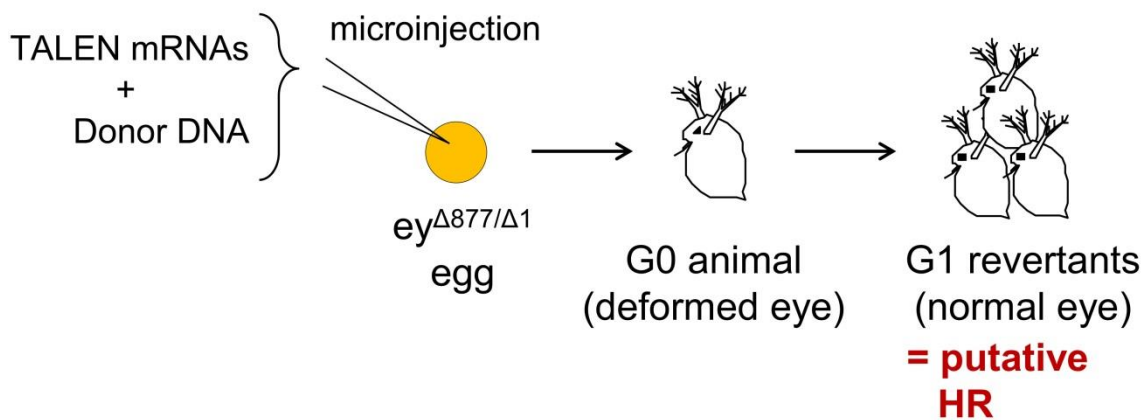


図 3-3. 表現型回復を利用した HR ノックイン個体の選別

$ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統の卵に TALEN mRNA とドナーDNA を共注入することで、外来 DNA 配列を HR ノックインによりゲノムに導入することを目指した。 $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統由来の G0 親個体は deformed eye 表現型を示すが、生殖細胞で HR ノックインが起こると、G1 仔虫では表現型が回復して normal eye 個体が現れると期待される。

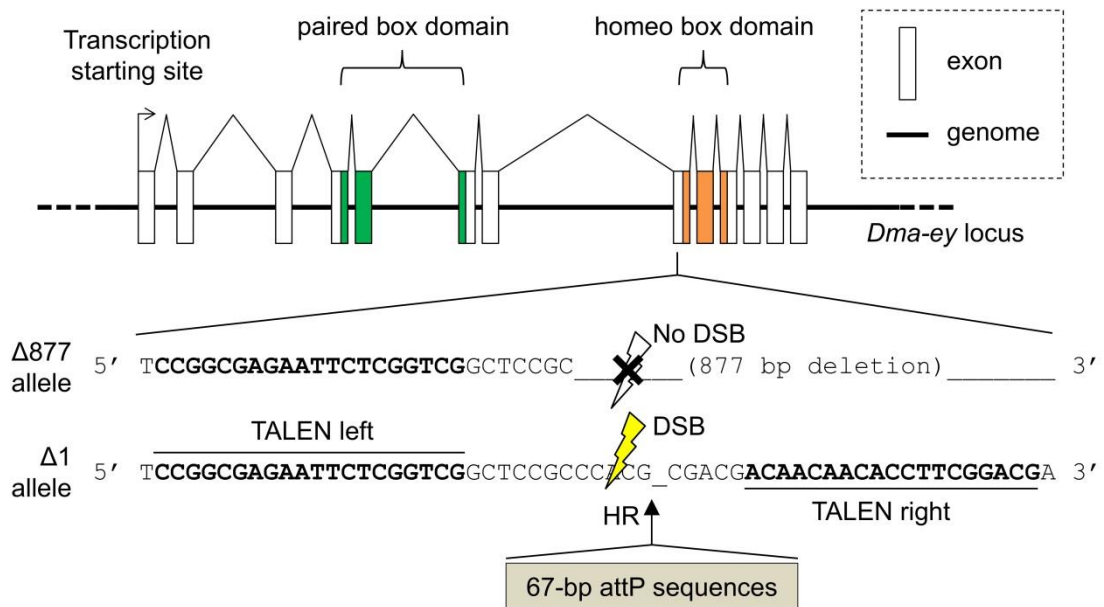


図 3-4. *Dma-ey* 遺伝子の概略図と TALEN 標的的部位

図上部に *Dma-ey* 遺伝子座の模式図を示した。*Dma-ey* 遺伝子の重要なドメイン (paired box, homeobox) をそれぞれ緑、オレンジでハイライトした。TALEN でターゲットした場所は、それらのドメイン間にあるリンカー領域である。図下部に、 $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統の遺伝子型を示した。 $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統は *Dma-ey* 遺伝子の各アレルに 877 bp、1 bp の欠損をそれぞれもつ。Δ877 アレルでは TALEN right の認識配列が欠損しているため、設計した TALEN ペアは Δ1 アレルのみをターゲットとして認識する。本実験では、attP を含む 67 bp の外来 DNA 配列を Δ1 アレルに挿入することを試みた。

wild type	CCGCCACGCGCAGACACAACACCTTCGGACGACGATCAGGCTCGACTGCGACTCAAGCGCAAACCTCCAGCGCAACCGCACTTCCTTCACCAACGAA P P T P T T T T P S D D D Q A R L R L K R K L Q R N R T S F T N E
$ey^{\Delta 877/\Delta 1}$	CCGCCACG_CGACGACAACAACACCTTCGGACGACGATCAGGCTCGACTGCGACTCAAGCGCAAACCTCCAGCGCAACCGCACTTCCTTCACCAACGAA P P T R E Q Q H L R T T I R L D C D S S A N S S A T A L P S E T N
HR	CCGCCACGcgacacctagccccaactgagagaactcaaaggttaccccgacttggggcactactcccggatccCGACGACACAACACCTTCGGAC P P T P T L R P Q L R E L K G Y P S W G T T P G I P T T T T P S D

integrated 67-bp attP sequences

図 3-5. 野生型、 $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統、HR 個体の DNA、アミノ酸配列比較

TALEN 標的的部位周辺の *Dma-ey* ゲノム配列 (上側の配列) と、それがコードしているアミノ酸配列 (下側の配列) を示した。Δ1 アレルにおいて欠損した塩基は赤字でハイライトされている。 $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統では、フレームシフトによりコードするアミノ酸配列が野生型と異なるものに置き換わっている (アンダーバー付きのアミノ酸残基)。HR 個体のゲノムにおいて、外来 DNA 配列はベージュでハイライ



トされている。さらに、外来 DNA 配列中の attP は太字で、*Bam*HI 認識サイトはアンダーバーで示した。外来 DNA の挿入により、HR 個体の *Dma*-EY アミノ酸配列は本来の読み枠を取り戻すと考えられる。

### 3-3-2. TALEN タンパク質の設計と濃度条件

まず、 $\Delta 1$  アレルに二本鎖切断を導入するためのヘテロ二量体 TALEN を構築した (図 3-4)。RVD リピートの組み立てには、先行研究と同様にゴールドゲート法を利用した [73]。 $\Delta 877$  アレル上では TALEN right の結合配列が欠損していることから、設計した TALEN タンパク質は  $\Delta 1$  アレルのみに二本鎖切断を導入すると考えられた (図 3-4)。構築した TALEN タンパク質の *Dma-ey* 遺伝子座への変異導入活性を評価するために、*in vitro* で合成した TALEN mRNA を野生型ミジンコの胚に顕微注入した。TALEN left, right それぞれ 125, 250, 500 ng/ $\mu$ L の三つの濃度条件を試したところ、G0 ミジンコにおける deformed eye 表現型がそれぞれ 28, 22, 42% の効率で観察された (表 3-1)。そのため、本項で新規に構築した TALEN ペアは標的に対する変異導入活性をもち、三つの濃度条件中では 500 ng/ $\mu$ L each で最大の効率を示すことが示唆された。

表 3-1. 各濃度条件における TALEN の活性評価

Injected Construct	Concentration (ng/ $\mu$ L)	Embryos	Juveniles	Survival Rate (%)	Deformed eye	Phenotypic Changes*
					Juveniles	(%)
TALEN mRNAs	125	116	86	74	24/86	28
	250	95	76	80	17/76	22
	500	78	62	79	26/62	42

\* 「phenotypic changes」の効率は、インジェクション後に生存した G0 個体中、deformed eye 表現型を示す個体の割合で算出した。

### 3-3-3. ドナーDNA の設計と濃度条件

次に、HR ノックインに必要なドナーDNA を設計した。モデル生物における先行研究で plasmid DNA および ssODN がドナーDNA として機能することが示されていた [75] ので、本章では一種類の plasmid DNA (targeting plasmid)、および二種類の ssODN をドナーDNA として用意した。targeting plasmid は標的遺伝子座に対して合計 1.5 kb の相同領域をもち、ssODN は相同領域の長さが合計 40 nt, 80 nt のものをそれぞれ構築した。これらのドナーDNA は相同領域の中央に合計 67 bp の外来 DNA 配列を共通して保有している (実験方法 3-2-5 参照)。ドナーDNA は相同領域中に TALEN 結合配列をもつものの、

67 bp のインサートが存在することでスペーサー配列が大きくなっているため、TALEN タンパク質による切断を回避できる。

DNA 溶液の動物胚への顕微注入は毒性を示すことがあるが、我々は以前の研究で 50 ng/μL の plasmid DNA の注入はミジンコ胚に大きなダメージを与えないことを示していた [22]。しかしながら、ssODN のミジンコ胚への毒性は調べられていなかったため、短い方の ssODN (107 mer) を野生型の卵に顕微注入して生存率を評価した。30, 100, 300 ng/μL の三つの濃度条件を試したところ、G0 ミジンコにおける生存率はそれぞれ 74, 45, 0%であった (表 3-2)。以上から、TALEN による HR ノックイン実験において、targeting plasmid の注入濃度は 50 ng/μL、ssODN の注入濃度は 100 ng/μL に決定した。

表 3-2. ssODN の顕微注入における胚への毒性評価

Injected Construct	Concentration (ng/μL)			Survival Rate (%)
		Embryos	Juveniles	
Donor	30	42	31	74
ssODN	100	44	20	45
(107mer)	300	45	0	0

#### 3-3-4. TALEN mRNA と targeting plasmid の共注入

targeting plasmid をドナーDNA として、ミジンコでも TALEN による HR ノックインが引き起こせるか確かめるために、TALEN mRNA と targeting plasmid を  $ey^{A877/\Delta 1}$  系統の胚に共注入した。結果として、135 個の胚にインジェクション成功し、そのうち 101 個体が成体 (G0) となった (生存率 75%, 表 3-3)。ミジンコは良好な環境下では単為生殖を行なうため、交配させることなく各 G0 個体は G1 仔虫を産仔した。各 G0 個体から得られた G1 仔虫をそれぞれ実体顕微鏡下で観察し、normal eye の表現型を示す G1 仔虫がいるか確認したところ、101 匹中 8 匹の G0 が normal eye をもつ G1 復帰変異体を産仔した (表 3-3, 図 3-6, “HR revertant”)。復帰変異体の  $\Delta 1$  アレルに attP が挿入されたか確認するために、8 つの G1 復帰変異体それぞれからゲノム DNA を抽出し、TALEN 標的部周りを PCR 増幅した。図 3-7 に示す通り、attP が挿入された場合 240 bp の PCR 産物が、何も改変されていなければ 173 bp の PCR 産物が得られると想定された。結果として、8 系統の復帰変異体中、2 系統から 240 bp の PCR 産物が得られた (図 3-7, “attP-knocked-in 1, 2”)。さらに、DNA シーケンシングにより、これら 2 系統のゲノムには期待通りにシングルコピーの 67 bp インサートが挿入されていたことが示された (図 3-5, “HR”)。したがって、targeting plasmid をドナーDNA として、ミジンコでも TALEN による HR ノックインを引き起こすことができた。一方で、他の 6 系統の復帰変異体は  $\Delta 1$  アレルに追加の in-del 変異が導入されており、その結果 *Dma-ey* 遺伝子の読み枠が正

常に戻っていることが分かった (図 3-8)。

以上をまとめると、targeting plasmid をドナーDNA として利用して、TALEN による HR ノックインをミジンコでも引き起こすことができた。合計 101 匹の G0 個体から 2 匹のファウンダーG0 が得られたことから、HR ノックインが生殖細胞で起こる効率は約 2%であった。ゲノムに挿入された attP 断片は、10 世代以上継代しても安定的に遺伝されることも確認できた。

表 3-3. 各種ドナーDNA を用いた場合の TALEN による HR ノックイン効率

Injected constructs	Embryos	Juveniles	Adults		
	Injected	Surviving (%)	Surviving (%)	Revertant lines (%)	Precise attP knock-in lines (%)
plasmid (1.5 kb)	135	103/135 (76)	101/135 (75)	8/101 (7.9)	2/101 (2.0)
ssODN (40 nt)	147	113/147 (77)	88/147 (60)	7/88 (8.0)	0/88 (0)
ssODN (80 nt)	98	64/98 (65)	52/98 (53)	8/52 (15)	1/52 (1.9)

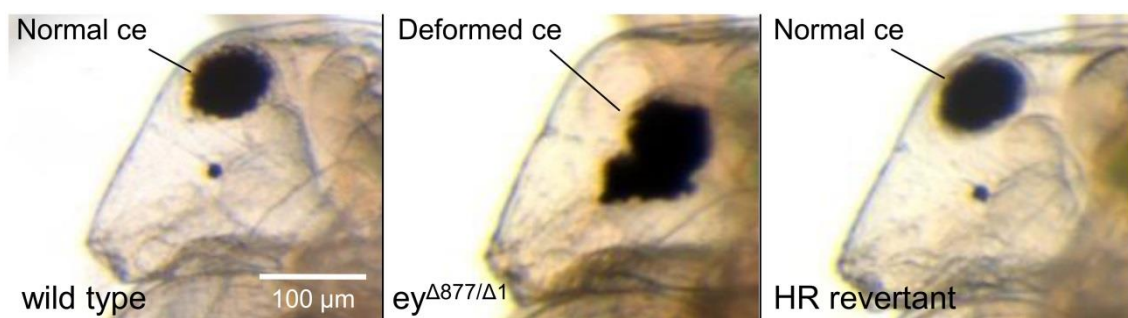


図 3-6. HR ノックインによる復帰変異体の表現型

図中左から野生型、 $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統、HR 復帰変異体の頭部側面の写真を示した。中央の  $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統は deformed eye 表現型を示しているが、右の HR 復帰変異体は、左の野生型と同様に正常な球形の複眼 (normal eye) を持っている。

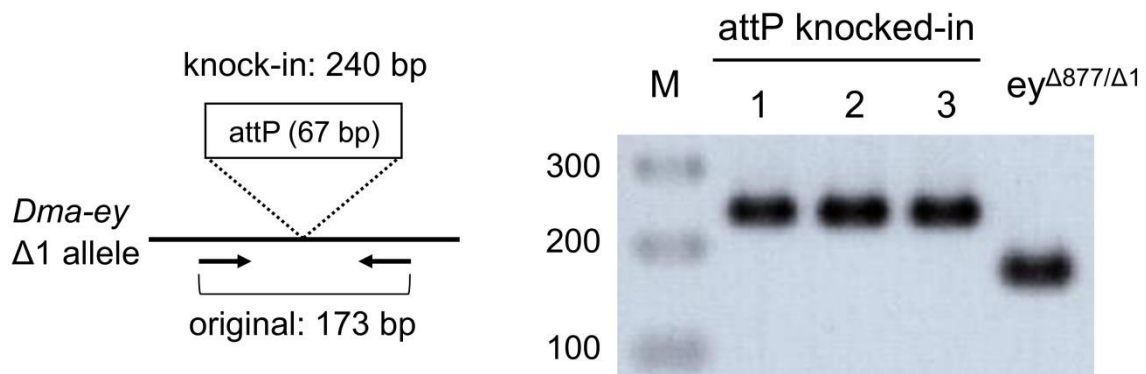


図 3-7. PCR による attP ノックインの確認

(左図) ゲノム PCR の模式図。Dma-ey 遺伝子座の  $\Delta 1$  アレルにおいて、attP ノックインが起これば 240 bp の、無改変であれば 173 bp の PCR 産物が得られるようにプライマーを設計した。(右図) HR 復帰変異体におけるゲノム PCR 産物のアガロースゲル電気泳動結果。M は DNA マーカーで、左側の数字はサイズ (bp) を表している。左の模式図通り、 $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統由来のゲノム PCR 産物は 170 bp 付近に、HR 復帰変異体由来のゲノム PCR 産物は 240 bp 付近に現れている。

	TALEN left	TALEN right	
wild type	5'-TCCGGCGAGAATTCTCGGTCGGCTCCGCCACG	CGACGACAACAACACCTTCGGACGA-3'	
$ey^{\Delta 877/\Delta 1}$	5'-TCCGGCGAGAATTCTCGGTCGGCTCCGCCACG	CGACGACAACAACACCTTCGGACGA-3'	(-1 bp)
RV1	5'-TCCGGCGAGAATTCTCGGTCGGC	ac CGACGACAACAACACCTTCGGACGA-3'	(-10+2-1=-9 bp)
RV2	5'-TCCGGCGAGAATTCTCGGT	CGACGACAACAACACCTTCGGACGA-3'	(-14-1=-15 bp)
RV3	5'-TCCGGCGAGAATTCTCG	GACGACAACAACACCTTCGGACGA-3'	(-17-1=-18 bp)
RV4	5'-TCCGGCGAGAATTCTCGGTCGGCTC	CGACGACAACAACACCTTCGGACGA-3'	(-8-1=-9 bp)
RV5	5'-TCCGGCGAGAATTCTCGGT	CGACGACAACAACACCTTCGGACGA-3'	(-14-1=-15 bp)

図 3-8. 追加の in-del 変異導入により得られた復帰変異体の遺伝子型  
attP の挿入でなく、単に in-del 変異が導入されて得られた復帰変異体 (RV: revertant) の、TALEN 標的部局周辺のゲノム配列を示している。図中上から野生型、 $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統、代表的な 5 系統の復帰変異体の DNA 配列を示した。各 DNA 配列中または図右側の数字において、追加で挿入された in-del 変異は青で、もともと  $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統が持っていた 1 bp 欠損は赤でハイライトされている。図右側の黒数字で示した通り、各 RV が合計で持っている in-del 変異はすべて 3 の倍数の塩基欠損となっており、読み枠が戻っていることがわかる。

### 3-3-5. TALEN mRNA と ssODN の共注入

前項で targeting plasmid を利用した HR ノックインがミジンコでも可能なことが示された。次に、TALEN による HR ノックインアプローチにおいて、ミジンコでも ssODN がドナーDNA として機能するかを調べた。まず TALEN mRNA と短い ssODN (107 mer) を  $ey^{A877/\Delta 1}$  系統の胚に共注入したところ、147 個の胚にインジェクション成功し、そのうち 88 匹が成体となった (生存率 60%, 表 3-3)。各 G0 個体から得られた G1 仔虫をそれぞれ実体顕微鏡下で観察したところ、88 匹中 7 匹の G0 が normal eye をもつ G1 復帰変異体を産仔した (表 3-3)。しかしながら、3-3-4 と同様にして 7 系統の復帰変異体の  $\Delta 1$  アレルにおけるゲノム配列を確認したところ、読み枠を正常に戻すように in-del 変異が導入されているだけで、attP 配列は挿入されていなかった (図 3-8)。

短い ssODN では HR ノックインを達成できなかったため、次に長い ssODN (147 mer) を利用して HR ノックインを引き起こせるか調べた。TALEN mRNA と長い ssODN を  $ey^{A877/\Delta 1}$  系統の胚に共注入したところ、98 個の胚にインジェクション成功し、そのうち 52 匹が成体となった (生存率 53%, 表 3-3)。各 G0 個体から得られた G1 仔虫をそれぞれ実体顕微鏡下で観察したところ、52 匹中 8 匹の G0 が normal eye をもつ G1 復帰変異体を産仔した (表 3-3)。この 8 系統の復帰変異体のうち、1 系統のゲノムにおいて  $\Delta 1$  アレルに attP を含む 67 bp のインサートが期待通りに挿入されていた (表 3-3, 図 3-7, “attP-knocked-in 3”)。

以上の結果をまとめると、ssODN (147 mer) をドナーDNA として利用して、TALEN による HR ノックインを引き起こすことができた。合計 52 匹の G0 個体から 1 匹のファウンダーG0 が得られたことから、ssODN を介して HR ノックインが生殖細胞で起こる効率は現状約 2% である。HR ノックインに成功した個体数が少ないため正確な効率に言及することは難しいが、本項の実験により ssODN がドナーDNA としてミジンコでも機能することが示された。

### 3-3-6. CRISPR-Cas による *lig4* 遺伝子欠損変異体の樹立

先行研究において、NHEJ 修復経路に関与する *lig4* や *Ku70* といった遺伝子を破壊することで、高効率な HR ノックインを達成した例が報告されている [58, 66-69]。そこで本項では、TALEN による HR ノックイン効率の向上を図るため、 $ey^{A877/\Delta 1}$  系統において *lig4* 遺伝子の破壊を試みた。ミジンコのゲノムデータベースを調べたところ、*lig4* 遺伝子オルソログ *Dma-lig4* が確認され、8 つのエクソンから成ると予想された (図 3-9)。Dma-LIG4 タンパク質は 727 アミノ酸から成ると予想された。ヒト、ハエ (*Drosophila melanogaster*)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の LIG4 タンパク質のアミノ酸配列

と比較したところ、生物種を超えて保存されている 4 つの機能ドメインがミジンコの *Dma-LIG4* タンパク質でも保存されていることが示唆された (図 3-10)。さらに、アデニル化ドメイン中に存在する活性中心のリジン残基 (175 番目のアミノ酸) も確認された (図 3-10, [76-78])。 *in silico* で発見した *Dma-lig4* 遺伝子が当研究室のミジンコで発現しているか確認するために、アデニル化ドメイン周辺にプライマーを設計し、RT-PCR を行なった (図 3-11)。得られた PCR 産物をクローニングして配列を読んだところ、*Dma-lig4* 遺伝子由来の配列であることが確認できた。以上の結果から、*Dma-lig4* 遺伝子が当研究室のミジンコでも機能していると想定された。

次に、 $ey^{A877/\Delta 1}$  系統で *Dma-lig4* 遺伝子の機能を失った二重変異体を作成するため、二つの gRNA をアデニル化ドメイン周辺に設計した (図 3-9)。第 2 章と同様に、*in vitro* で合成した Cas9 mRNA (500 ng/ $\mu$ L) と *Dma-lig4* targeting gRNA mix (50 ng/ $\mu$ L each) を  $ey^{A877/\Delta 1}$  系統の胚に共注入した。66 個の胚にインジェクション成功し、50 匹の成体が得られた。

先行研究から、哺乳類における *lig4* 変異体は致死だが、ショウジョウバエの *lig4* 変異体は見た目に明らかな表現型を示さず、かつ生存可能であることが知られている [79-80]。甲殻類と昆虫は進化的に近い位置関係であることから、*Dma-lig4* 変異体ミジンコはショウジョウバエの *lig4* 変異体と似た表現型を示すと考えた。つまり、得られた G1 仔虫の外見的な特徴からは変異の有無を判別不可能なので、ジェノタイピングをそれぞれの G1 仔虫について行なうことで、*Dma-lig4* 変異体の同定を試みた。

得られた 50 系統の G1 仔虫の中から *Dma-lig4* 遺伝子のホモ変異体を選び出すために、まず 18 系統をランダムに選択し、gRNA 標的部局周辺のゲノム配列を調べた。ゲノム PCR 産物のサイズを PAGE により確認したところ、18 系統のうち 5 系統の gRNA #2 標的部局に様々な in-del 変異が導入されたことが示唆された (図 3-12)。このうち #14 系統由来の PCR 産物からは野生型のバンドが検出されなかったため、この系統が *Dma-lig4* のホモ変異体である可能性が高いと考えた。そこで、この系統の *Dma-lig4* 両アレルに機能欠損変異が導入されたか確かめるために、ゲノム PCR 産物の配列を同定した。その結果、両アレルの gRNA #2 標的部局に premature stop コドンが導入されていることが確認された (図 3-13)。また、この系統は gRNA #1 標的部局には in-del 変異をもっていなかった。以上から、この系統を  $ey^{A877/\Delta 1}$  変異かつ *Dma-lig4* 機能欠損の二重変異体 ( $\Delta lig4-ey^{A877/\Delta 1}$ ) として以降の実験に利用した。

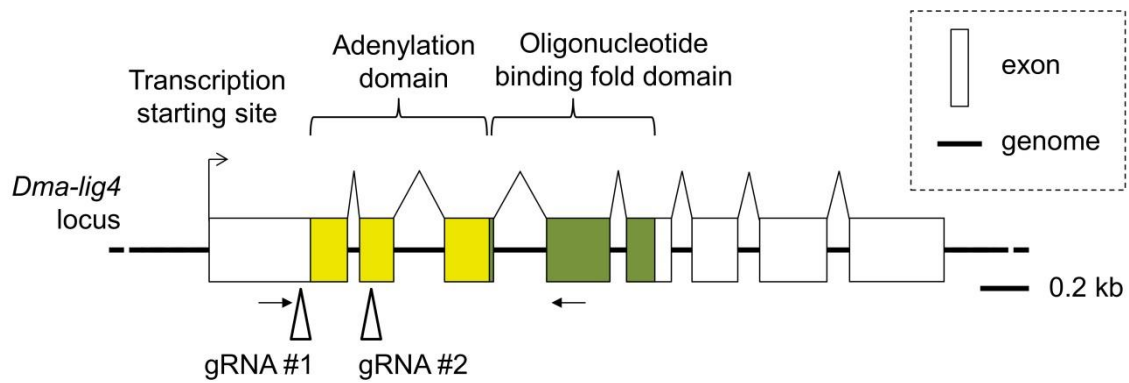


図 3-9. *Dma-lig4* 遺伝子のエクソン/イントロン構造

ミジンコゲノムデータベースより予想された、*Dma-lig4* 遺伝子座の模式図。*Dma-lig4* 遺伝子は 8 つのエクソン (矩形) から成ると想定された。触媒作用をもつ機能ドメイン (アデニル化ドメイン、オリゴヌクレオチド結合ドメイン) はそれぞれ黄色、緑色でハイライトした。gRNA 標的的部位は三角形で示した。また、RT-PCR に利用したプライマーの位置を矢印で示した。

Dmagna_LIG4	1	-----
human_LIG4	1	MAASQTSQTVAHVHPFADLCSTLERIQKSKGRAEKIRHFEEELDSWRKFHDALHKNH---
Dmelan_LIG4	1	-----MSVDIASTIKERDLCSLFEKIKATQKVANKEEVLKSYYESFCRHRSEFRRQTGLN
yeast_DNL4	1	--MISALDSIPEPQNFAPSPDFKWLCEELFVKIHEVQINGTAGTGKSRSFKYVEIISNFV
Dmagna_LIG4	1	-----MVYNFYVYAF-----MFR
human_LIG4	58	----KDVTDTSFYFAMRLILPQLERERMAVGIKETMLAKLYIEILNLPRDGRDALKLLNYR
Dmelan_LIG4	56	NDQPEDGASSFYSVLRLILPGADTGRDTYGLQITALGRLYIRVLQLPTDSSD-----AIR
yeast_DNL4	59	EMWRKTVENNIYPALVLALEP--YRDRRIYNIKLYVLIRITICSYLKLPKNSATEQRLKDWK
<-----DNA_ligase N terminus domain----->		
Dmagna_LIG4	14	VPKTTQTAKDFADICYNILRTRCSSDVSSLSVSEINQYLENSKTYMSKILENT----E
human_LIG4	114	TPTGTHGDAGDFAMIAYFVLKPRCLQKGS-LTIQQVNDLLDSASNNSAKRKDLI----K
Dmelan_LIG4	111	IQHRNGNMYFDYGDVVYSVLKPRCFNPPSNLRKEIHOMLDTIAN----EDTEVK----Q
yeast_DNL4	117	QRVCKGGNLS--SLIVEETAKRRAEPSSKAITIDNVNHYLDSISGDRFASGEGFKSLVKS

----->

Dmagna\_LIG4 70 KLLQPLMKIPALEQKWLIRIILRDVKLIGISPKIVLSAMHPDAKELYDVENDLEKVCIT  
human\_\_LIG4 169 KSLLOLITQSSALEQKWLIRMIKDLKLGVSQQTIFSVFHNDAEELHNVTTDLEKVCRO  
Dmelan\_LIG4 163 QQLIRFTEQASPEEQKWLIRLLKSLGLGIGEOKIFGVLHPKAQDIYQRCSDIGHVCNL  
yeast\_\_DNL4 175 KPFLHCVENMSFVELKYFFDIVLKNRVIGGQEHKLLNCWHPDAQDYLSVISDLKVVTSK

<-----

Dmagna\_LIG4 130 LLNPLSRSE-----IEISLENPFRPMLADRLEMSKIFAKMGNKPFYV  
human\_\_LIG4 228 LHDPSVGLSD-----ISITLESFAKPMIAAIDIEHIEKDMKHQSFYI  
Dmelan\_LIG4 222 LADRTTDLASSSKDSKAAVKFVNLNSVIRPEHQIRPMLCERFPG--DIQEIMQSDVLYL  
yeast\_\_DNL4 234 LYDPKVRKDD-----DISIKVGFAPQLAKVNI SYEKICRTLHDDFLV

-----Adenylation domain-----

Dmagna\_LIG4 173 ETKIDGERMQHKS--GKRYCYSRRGFDYTSNFGTNSSSGNLSPRLEECFRETVTSCII  
human\_\_LIG4 271 ETKIDGERMQHKS--GDVYKYFSRNGYNYTDQFGASPTESLTPFIHNAFKADIQICIL  
Dmelan\_LIG4 280 ETKMDGERFQIHID--RGRMYISRNGVDYTRNFGHSYDHGTLTPKLRGLLPLGIESIIL  
yeast\_\_DNL4 280 EEKMDGERIQHYMNYGESIKFSSRGGIDYTYLYGASLSSGTISQHLR--FTDSVKECVL

-----

Dmagna\_LIG4 231 DGEM-----  
human\_\_LIG4 329 DGEMMAYNPNTQTFMOK-----GTFKDIKRVVSDSLQTCYCVFDVLMVNNKKGHETL  
Dmelan\_LIG4 338 DGEMMVWDINKLRFREK-----GENTDVKSLKPEGSWQPCFVVVLDLDFNGQSLLDHTY  
yeast\_\_DNL4 338 DGEMVTFDAKERVILPFGLVKGSAKEALSFNSNNVDFHPLYVFDLFLYINGTSLTPLPL

-----

Dmagna\_LIG4 235 -ERLKI LESA KIKESVIQFPNKLVTTKMEVTNLLNDAIDQREEGIVLKNPDSIYKPNE  
human\_\_LIG4 383 RKRYEILSSIFPIPGRIEIVQIQTOAHTKNEVIDALNEAIDKREEGIMVKQPLSIYKPKD  
Dmelan\_LIG4 392 IQRAYKLOKLIVEQSGVLQMRARKIGSVQEFNELFQOALDSHAEGIVLKKQGSRYQPGV  
yeast\_\_DNL4 398 HQRKQYLNLSILSPLKNIVEIVRSSRCYGVESKKSLEVAISLGSEGVVLKYNSSYNVAS

-----> <-----

Dmagna\_LIG4 294 RKG-GWFK-----GRRRNLIAMFLVGVAV-----  
human\_\_LIG4 443 RGE-GWLKIKPEYVSGLMDELDELIVGGYWGKSRGGMMSHFLCAVAE-----  
Dmelan\_LIG4 452 RLGGGWYKDKADYIKGLITEFDVLIIG--AFYNRKRIFVDSFLVGLQ-----  
yeast\_\_DNL4 458 RNN-NWIKVKPEYLEEFGENLDLIVIG--RDSCKKDSFMLGLVLVDEEYKHKHQGDSSEI



-----Oligonucleotide binding fold domain-----

Dmagna\_LIG4 317 -----PSLEKEKEQLEFYSFARVGSQFSDKQLRSLLLEKLNPHWQKWDKNAPPKIHG  
human\_\_LIG4 490 -----KPPPEK-PSVTHLSRVGSCCMKELYDLGLKLAKYWKPFHRKAPSSILC  
Dmelan\_LIG4 498 -----PAPPSSNRPEVHSICVVAN--NTKQRGVLNHTLAPHWHDVVNEPPLWFHY  
yeast\_\_DNL4 515 VDHSSQEKHQNSRRRVKILSFCSIANGISQEEFKRIDRKTFRGHWKRTSEVAPPASILE

Dmagna\_LIG4 369 SREK---PDVWINPSSSAILEIKASEIISNS---YKAGSTLRFPRVERVREDRAWYS  
human\_\_LIG4 541 GTEK---PEVYIEPCNSVIVQIKAAEIVPSDM---YKTGCTLRFPRIEKIRDDKEWHE  
Dmelan\_LIG4 548 KPKERSGCPDIWIEPONSIVIQKAADIAPNGA---FFTRKSLHFPRTEMKRDKTWSE  
yeast\_\_DNL4 575 FGSK---IPAEWIDPSESIVLEIKSRSLDNTEINMQKYATNCTLYGGYCKRIRYDKEWTD

--->

Dmagna\_LIG4 421 CMTFSEINEMRKMASGKLVTRHCSFQ-DDIPSGKR-IKTAS---VLAGVATPFQAADISD  
human\_\_LIG4 593 CMTLDDLEQLRGKASGKLASHKLYIGGDDEPQKK-RKAAPKMKVIGIIEHLKAPNLIN  
Dmelan\_LIG4 604 CMTLKEFNLCGGPLAIKKNRQIRLEDVTKRQMRMTPSEFSRIGLAVYBKRYDAST  
yeast\_\_DNL4 632 CYTLNDLYESRTVKSNPYSQAERSQLGLIRKKEKR-----VLISDSFHNKQLPI

<-----BRCT domain-----

Dmagna\_LIG4 476 VKRSS-NCFSDKEICVLNGSS-SFTKQELERSVVSAAH-----STFCIIAAK  
human\_\_LIG4 652 VNKIS-NIFEDVEFCVMSGID-SQPKPDLENRIAEFGGYIVQNGP-----DTYCVIAGS  
Dmelan\_LIG4 664 SASTS-KLFDGLSFCILSGSAGRHSKHQQLQELAVKNGGCIVENPLPN---DPKCFCIAGD  
yeast\_\_DNL4 683 SNIFAGLLEFVLSDYVTEDTGRITRAELEKTIVEHGGKLIYNVILKRHSIGDVRIISCK

----->

Dmagna\_LIG4 520 DDIRVKS LKARP--KWDIVCPAWLLRCLNLRNLIFFRPQDLVVTQATKEILAQNFDRFG  
human\_\_LIG4 705 ENIRVKNIILSN--KHDVVKPAWLLCFCFKSFPWPQPRFMHICPSTKEHFARFVDCYG  
Dmelan\_LIG4 720 ETFLVKRLIILQPRTCDIVRMEWLLRVCQKQ-ELELKPRDLIAATEPLQODLAECEFRHG  
yeast\_\_DNL4 743 TTTECKALIDRG---YDILHENWVLDCAIYKRLILIEPNYCFNVSQKMRAVABKRVDCLG

Dmagna\_LIG4 578 NSLREATS-VEDVGPILOQVKDLENPVPLSVY-EIADLEYEIFGKILHKYGIFFTCIVYVD  
human\_\_LIG4 763 DSYFIDTD-LNQLKEVFSGIKNSNEQTPEEMASLIADLEYRYSWDCSPLSMFRRETIVYLD  
Dmelan\_LIG4 779 DSYTKDIANVEELQDLQGIELIADNVAGITASNNALEDQLDGKKNLNMFRNLNAFFY  
yeast\_\_DNL4 800 DSEFENDIS-----ETKLSLSLYKSQSLPMPGELEIASEVRRFPPLFLFSNFIAYVP

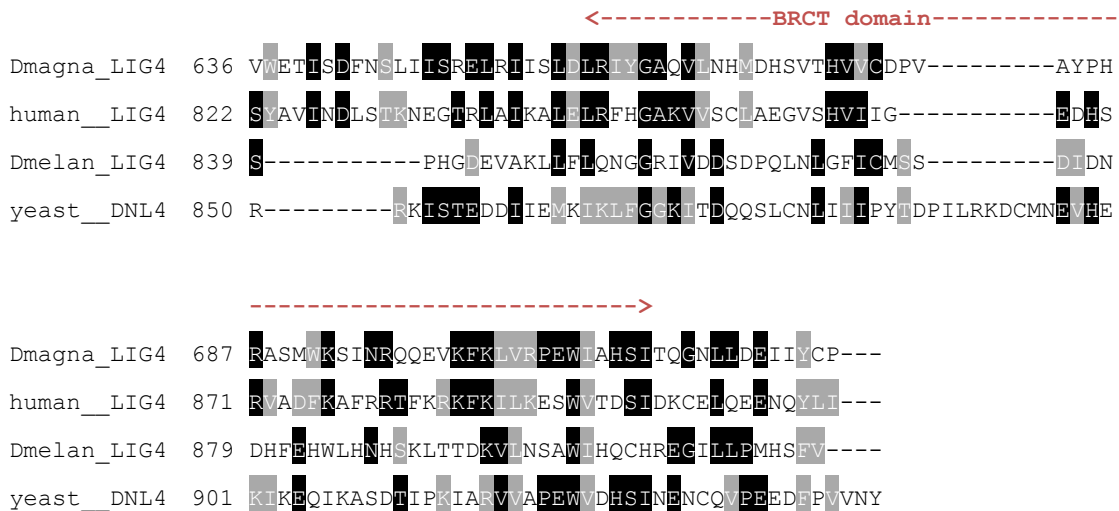


図 3-10. ヒト、ハエ、酵母由来の LIG4 と Dma-LIG4 のアミノ酸配列比較  
 NCBI データベースよりヒト human LIG4 (Accession: NP002303)、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* LIG4 (NP572907)、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* DNL4 タンパク質のアミノ酸配列を得て、オオミジンコ Dma-LIG4 の予想されるアミノ酸配列と比較した。アミノ酸配列のアライメントには ClustalW を使用した (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>)。Boxshade プログラムにより、同一または類似のアミノ酸残基はそれぞれ黒または灰色でハイライトされている。Dma-LIG4 タンパク質はヒト、ハエ、酵母の LIG4 タンパク質と高い相同性を示した (それぞれ 30, 27, 22% identity)。予想される活性中心のリジン残基 (175 番目) も保存されており、赤色でハイライトした。LIG4 タンパク質がもつ 4 つの機能ドメイン (DNA ligase N terminus domain (Accession: pfam04675), adenylation domain (cd07903), oligonucleotide binding fold domain (cd07968), and BRCT domain (cd00027)) はすべてミジンコの Dma-LIG4 タンパク質でも保存されており、それぞれの位置はアライメント上部に示した。

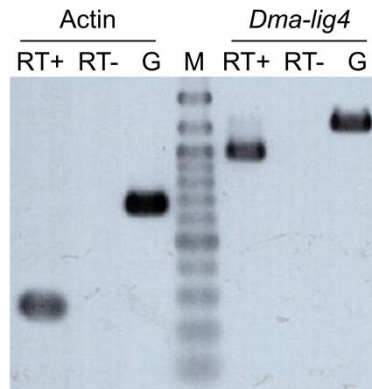


図 3-11. *Dma-lig4* 遺伝子に対する RT-PCR 結果

*Actin*、*Dma-lig4* 遺伝子からそれぞれ増幅した RT-PCR 産物とゲノム PCR 産物のアガロースゲル電気泳動結果。M: DNA マーカー。上から 1.5 kb, 1.2 kb, 1 kb, 0.9 kb...0.1 kb のサイズを示している。G: ゲノム PCR 産物 (陽性対照)、RT+: 逆転写合成した cDNA から増幅された RT-PCR 産物, RT-: 逆転写反応を行わない total RNA を鋳型に増幅した RT-PCR 産物。

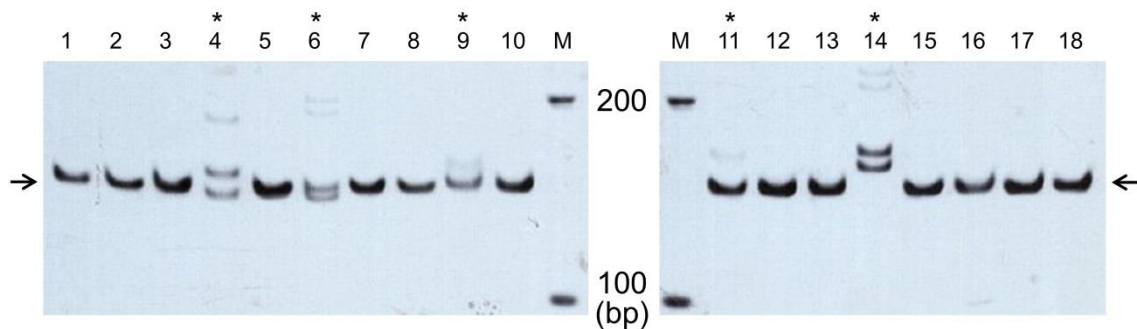


図 3-12. *Dma-lig4* 変異体の候補 18 系統のジェノタイプピング

*Dma-lig4* 変異体候補 18 系統のゲノム DNA を用いて、gRNA #2 標的部周りを PCR 増幅し、Native-PAGE で PCR 産物のサイズを確認した。レーン上部の数字は、各系統を区別するために便宜上付与した番号である。M は DNA マーカーを示している。オリジナルの PCR 産物サイズは 145 bp であり、図中では矢印によりその位置を示した。そのため、異なる移動度を示すバンドは gRNA #2 標的部に in-del 変異が導入されたことを示唆している。系統番号上のアスタリスク (\*) は、ホモまたはヘテロ変異が導入されたと考えられる系統を示している。

	PAM	gRNA#2 target	
wild type	CTTAGCCCTCGTCTAGAGGAATGCTTCC		GTGAAACTGTGA
	L S P R L E E C F R E T V		
#14 Allele1	CTTAGCCCTCGatgacgagttggggttcctacc		TCTAGAGG (+21 bp)
	L S P R *		
#14 Allele2	CTTAGCCCTCGetcttagccttgc		TCTAGAGGAATGCTTCC (-1, +13 bp)
	L S P R S *		

図 3-13. *Dma-lig4* ホモ変異体の遺伝子型

*Dma-lig4* 遺伝子座における、gRNA #2 標的部位周辺のゲノム配列とコードしているアミノ酸配列を示した。上段に野生型の配列を、中央と下段に *Dma-lig4* ホモ変異体 (図 3-12, “#14”) の配列を示した。変異体のゲノムに導入された in-del 変異の配列は小文字で、in-del 変異の大きさ (bp) は右側に数字で表されている。変異体のアレル 1, 2 ともに読み枠はずれていないが、premature stop コドン (赤字, \*) が導入されているため、このホモ変異体は不完全な Dma-LIG4 タンパク質しか発現できないと考えられる。

### 3-3-7. TALEN による HR ノックイン技術の *Dma-lig4* 変異体への応用

*Dma-lig4* 変異体において NHEJ 修復の活性が抑制されているか確かめるために、オリジナルの  $ey^{A877/\Delta 1}$  系統と  $\Delta lig4-ey^{A877/\Delta 1}$  系統それぞれにおける生殖細胞への in-del 変異導入効率を比較した。まず、TALEN mRNA と targeting plasmid を 3-3-6 で樹立した  $\Delta lig4-ey^{A877/\Delta 1}$  系統の胚に顕微注入したところ、61 個の胚にインジェクション成功し、46 匹の成体が得られた (表 3-4)。46 系統の G1 仔虫のうち何系統のゲノムに in-del 変異が導入されたか調べるため、24 系統をランダムに選択して TALEN 標的部位周辺のゲノム配列を確認した。結果として、24 系統中 3 系統の G1 仔虫が TALEN 標的部位に in-del 変異を持っていた (図 3-14, 効率 13%)。オリジナルの  $ey^{A877/\Delta 1}$  系統についても同様の解析を行なうため、3-3-4 で TALEN mRNA と targeting plasmid を顕微注入して得られた 101 系統の G1 仔虫からランダムに 24 系統を選択し、TALEN 標的部位に in-del 変異をもつか調べた。その結果、24 系統中 11 系統のゲノムに in-del 変異が導入されていた (図 3-15, 効率 46%)。よって、 $\Delta lig4-ey^{A877/\Delta 1}$  系統においては in-del 変異の導入効率が抑制されていることが示唆された。これは、 $\Delta lig4-ey^{A877/\Delta 1}$  系統で期待通りに NHEJ 修復活性が低下しているためだと考えられる。

次に、 $\Delta lig4-ey^{A877/\Delta 1}$  系統において TALEN による HR ノックイン効率が向上するか調べるために、上記のインジェクションの結果得られた 46 系統の G1 仔虫の中に attP 挿入個体がいるか確認した。各 G1 仔虫の複眼の形態を実体顕微鏡下で確認したところ、46 系統中 2 系統において normal eye をもつ G1 復帰変異体が見つかった (表 3-4)。しか

しながら、ジェノタイプングの結果、 $\Delta 1$  アレルに attP インサートは挿入されておらず、読み枠を回復するように in-del 変異が導入されていたことがわかった。つまり、 $\Delta lig4-ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統における HR ノックイン効率は約 2% (=1/46) 以下であることが示唆された。正常な *Dma-lig4* 遺伝子をもつオリジナルの  $ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統における HR ノックイン効率が約 2%であることを鑑みると、*Dma-lig4* 遺伝子のノックアウトはミジンコでは HR 効率を向上させないと考えられる。以上の結果をまとめると、3-3-6 で樹立した *Dma-lig4* 変異体では NHEJ 修復活性が低下していたものの、HR ノックインの効率の向上にはつながらなかった。

表 3-4.  $\Delta lig4-ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統における HR ノックインの効率

Injected constructs	Embryos	Juveniles	Adults		
Donor DNA (homology arm)	Injected	Surviving (%)	Surviving (%)	Revertant lines (%)	Precise attP knock-in lines (%)
plasmid (1.5 kb)	61	54/61 (89)	46/61 (75)	2/46 (4.3)	0/46 (0)

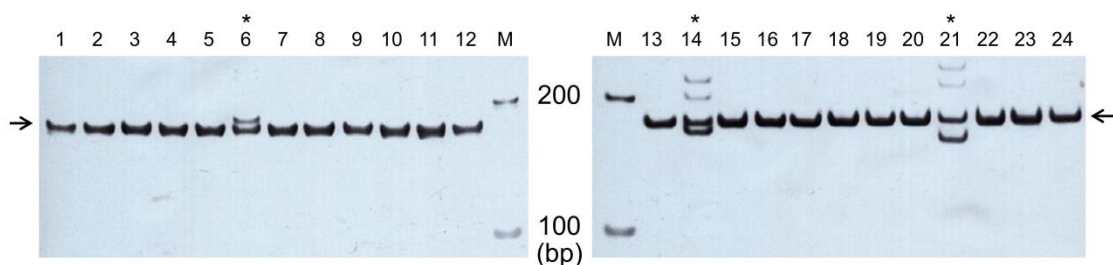


図 3-14.  $\Delta lig4-ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統における in-del 変異導入効率の解析

$\Delta lig4-ey^{\Delta 877/\Delta 1}$  系統の生殖細胞における in-del 変異の導入効率を評価するために、TALEN mRNA と targeting plasmid をインジェクションした個体の G1 を 24 系統ランダムに選出し、TALEN 標的部位に in-del 変異をもつかゲノム PCR と Native-PAGE により調べた。レーン上部の数字は、各系統を区別するために便宜上付与した番号である。M は DNA マーカーを示している。オリジナルの PCR 産物サイズは 173 bp であり、図中では矢印でその位置を示した。異なる移動度を示すバンドは TALEN 標的部位に in-del 変異が導入されたことを示唆している。系統番号上のアスタリスク (\*) は、in-del 変異が導入されたと考えられる系統を示している。

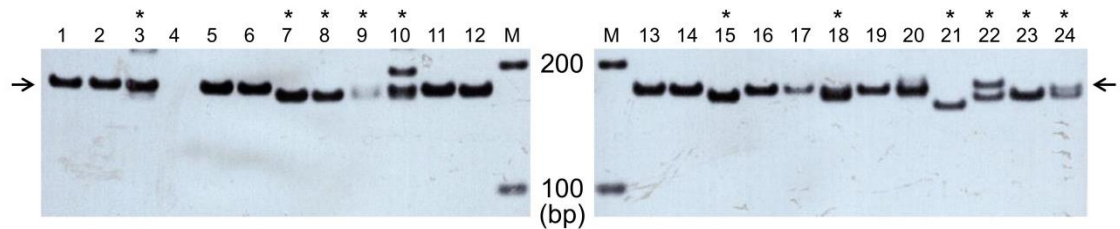


図 3-15.  $ey^{A877/\Delta 1}$  系統における in-del 変異導入効率の解析

オリジナルの  $ey^{A877/\Delta 1}$  系統の生殖細胞における in-del 変異の導入効率を評価するために、TALEN mRNA と targeting plasmid をインジェクションした個体の G1 を 24 系統ランダムに選出し、TALEN 標的部位に in-del 変異をもつかゲノム PCR と Native-PAGE により調べた。レーン上部の数字は、各系統を区別するために便宜上付与した番号である。M は DNA マーカーを示している。オリジナルの PCR 産物サイズは 173 bp であり、図中では矢印でその位置を示した。異なる移動度を示すバンドは TALEN 標的部位に in-del 変異が導入されたことを示唆している。系統番号上のアスタリスク (\*) は、in-del 変異が導入されたと考えられる系統を示している。

### 3-4. 考察

本章では、ミジンコにおける TALEN を用いた HR ノックイン技術の確立を行なった。そのために、第 2 章で得られた deformed eye 表現型を示す  $ey^{A877/\Delta 1}$  変異体を宿主として利用し、HR ノックインが起これば normal eye の復帰変異体が得られるように実験系を設定した。結果として、TALEN 標的部位にシングルコピーの 67 bp 外来 DNA 配列を正確に挿入することができた。先行研究と同様に、plasmid DNA、ssODN とともにミジンコでもドナー DNA として機能した。ミジンコにおける TALEN を用いた HR ノックインのファウンダー G0 樹立効率は約 2% であり、ショウジョウバエやゼブラフィッシュにおける同アプローチと同程度の効率であった [53, 63]。そのため、HR ノックイン技術は緒言で議論されたようなランダム挿入法の欠点を克服する技術であり、効率的に遺伝子組換えミジンコを作出可能にするものと考えられる。

標的遺伝子座に外来 DNA 配列を導入する技術は、ミジンコにおいてより複雑な分子生物学的実験を可能にすると期待される。本章では、モデルインサート DNA として attP 配列 (ファージンテグラーゼ phiC31 の標的配列) を選択した。ミジンコゲノムに挿入された attP 断片は少なくとも 10 世代以上安定的に継代されていることも確認できた。本章で樹立された attP 保有ミジンコは、将来的に phiC31 を利用した外来遺伝子導入技

術をミジンコに応用する際に有用であると考えられる [74]。それだけでなく、本技術は例えば loxP 配列の導入により floxed アレルを作出する、内在性遺伝子に HA や His などのエピトープタグ配列を融合させるなどの応用が可能である。したがって、TALEN を用いた HR ノックイン技術は、コンディショナルノックアウトや染色体免疫沈降 (ChIP) など、発展的な分子生物学的手法をミジンコでも可能にすると考えられる。

本章では HR ノックインを達成するために TALEN に着目したが、CRISPR-Cas を用いても同様のアプローチが可能であると考えられる。CRISPR-Cas の活性は gRNA の配列に依存することが知られているため [81-82]、CRISPR-Cas を用いた HR ノックインを達成するためには、高活性な gRNA をスクリーニングすることが重要になると考えられる。実際に、High-Resolution Melt Analysis (HRMA) アッセイを利用して高活性な gRNA を選択し、その結果効率的な HR ノックインを達成した研究例が報告されている [68]。TALEN に比べて CRISPR-Cas は簡便かつ迅速に利用することができるため、CRISPR-Cas を用いた HR ノックイン技術が確立すれば、より簡単かつ効率的にミジンコゲノムを改変できると期待される。

本章では HR ノックインの標的としてヘテロアレルを選択したが、将来的にはホモアレルに対する効率も評価する必要がある。HR ノックインが可能かどうか簡便に調べるために、本研究では  $ey^{A877/\Delta 1}$  変異体をもつ *Dma-ey*  $\Delta 1$  アレルのみを標的とした。このとき、ゲノムに attP をもつ遺伝子組換え体は約 2% の効率で樹立できたが、ホモアレルを標的とした場合の効率は不明である。もしホモアレルターゲットに対しても TALEN を用いた HR ノックインが高効率で引き起こせるならば、より広範な遺伝子座を標的にできると考えられる。

様々な動植物種において、NHEJ 修復に関与する *lig4* や *Ku70* などの機能を阻害することで、より効率的な HR ノックインを達成した研究例が報告されている [58, 66-69]。しかしながら、本章で樹立された *Dma-lig4* 変異体ミジンコは NHEJ 活性の低下を示したものの、HR ノックインの効率は向上しなかった。シロイヌナズナの研究例で、*lig4* 変異体よりも *Ku70* 変異体の方がより高い HR 効率を示すことが報告されている [67]。そのため、ミジンコでも同様に *Ku70* 遺伝子の変異体を利用することで、高効率な HR ノックインを達成できるかもしれない。

本章の実験により、標的遺伝子座に外来 DNA 配列を導入する技術をミジンコで初めて確立することができた。TALEN を用いた HR ノックイン技術は、毒性学や環境学において蓄積されたミジンコに関する知識を、遺伝子レベルで理解するのに重要な役割を果たすと考えられる。

## 第 4 章 TALEN を利用した非相同末端結合による外来遺伝子導入技術の開発

### 4-1. 緒言

第 3 章で、TALEN による相同組換え (HR) を利用した外来遺伝子導入技術をミジンコで確立した。これまで、ミジンコでは plasmid DNA のランダム挿入法でしか外来遺伝子をゲノムに組み込むことができなかったが、ランダム挿入法には (1) 低効率である (1%以下)、(2) ゲノム挿入時に目的の遺伝子が欠損する可能性がある、(3) 挿入遺伝子座を選択できないなどの問題点があった。第 3 章で確立した TALEN による HR ノックイン技術は以上の問題点を克服し、標的遺伝子座に目的遺伝子配列だけを高効率で導入することを可能にした。

一方で、数 kb 単位の長い外来遺伝子をミジンコゲノムに導入することはいまだに困難であった。第 3 章では、モデル実験として 67 bp の外来 DNA 配列をミジンコゲノムに導入したが、TALEN による HR ノックイン技術がより長い外来遺伝子導入に利用可能かは不明である。将来的にミジンコを毒性物質レポーターや有用タンパク質生産の宿主生物として利用する場合、数 kb 程度の外来遺伝子導入が必須となるため、別のアプローチが必要だと考えられる。

そこで本章では、非相同末端結合 (NHEJ) 機構を利用したノックイン技術に着目した。NHEJ は細胞が持つ DNA 修復機構の一種で、切断された DNA 断片の末端同士を相同性に関係なく結合させる。近年、標的的特異的ヌクレアーゼと NHEJ 修復機構を活用した外来遺伝子導入法 (NHEJ ノックイン) がゼブラフィッシュや培養細胞で報告されている (図 4-1, [83-86])。NHEJ ノックイン技術の要点は、ドナーDNA (plasmid DNA) に目的遺伝子に加えて標的的特異的ヌクレアーゼの認識配列を組み込んでおくところである。細胞にドナーDNA を供給する際、同時にヌクレアーゼを発現させることで、細胞内でゲノム DNA とドナーDNA が同時に切断される。生じた切断末端がゲノム DNA/ドナーDNA 間で NHEJ 機構により結合されることで、ドナーDNA 全体が標的遺伝子座に組み込まれる。このとき、ゲノム DNA とドナーDNA 間の境界 (ジャンクション) 部分にはランダムな in-del 変異が導入されることがある。NHEJ ノックイン技術がミジンコにも応用できれば、高効率で長鎖外来遺伝子をゲノムに組み込むことが可能になる。そこで本章では、標的的特異的ヌクレアーゼとして TALEN を選択し、ミジンコでの TALEN による NHEJ ノックイン技術の確立を目指した。

本章では、TALEN による NHEJ ノックイン技術をミジンコに応用することで、ゲノムに挿入したい遺伝子を含むドナープラスミド全体を標的遺伝子座に組み込むことを試みた。モデル実験として、幼若ホルモン (JH: Juvenile Hormone) 依存的に GFP 発現を促すレポーターカセットを構築し、ドナープラスミドに組み込んだ。また、我々の先行研究で使用した *Dma-ey targeting* TALEN の認識配列もドナープラスミドに組み込んだ。



ドナープラスミドのみをミジンコ胚に顕微注入しても GFP 発現トランスジェニック個体は得られなかったが、TALEN mRNA と共注入することで、約 3% の効率で GFP 発現トランスジェニック個体を樹立することに成功した。得られた 3 系統のトランスジェニックのうち、2 系統は TALEN 標的遺伝子座にドナープラスミドが組み込まれていた。以上の実験により、ミジンコでも TALEN による NHEJ ノックインを達成できることを証明できた。本技術は、長鎖の遺伝子導入を必要とするレポーターミジンコの作出や、ミジンコを宿主とした有用物質生産などの研究で重要な役割を果たすと考えられる。

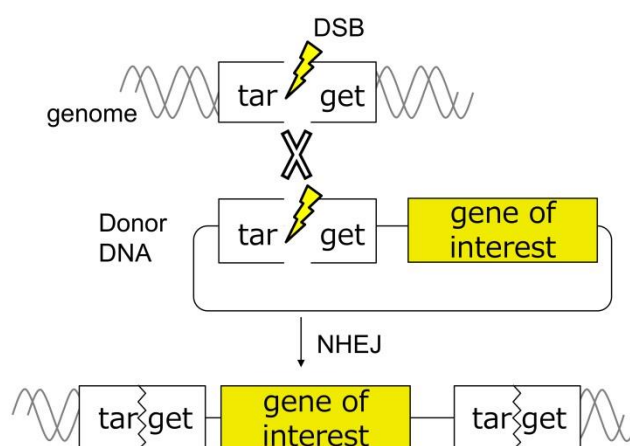


図 4-1. 標的的特異的ヌクレアーゼを利用した NHEJ ノックインの概要  
ゲノム上のターゲットに、標的的特異的ヌクレアーゼにより二本鎖切断 (DSB) を導入する。このとき、ヌクレアーゼ標的配列を含んだドナーDNA を細胞に供給しておくことで、ドナーDNA も DSB を受ける。ゲノム、ドナーの切断末端同士が非相同末端結合 (NHEJ) によりつなげられた場合、ドナーDNA 全体がゲノムの標的遺伝子座に組み込まれる。

## 4-2. 実験方法

### 4-2-1. 実験動物と飼育条件

本章で使用したオオミジンコは、第 2 章と同様に野生型の NIES 系統のみである。飼育方法も第 2 章と同様にした。

### 4-2-2. プラスミドの構築

<TALEN mRNA 発現ベクター>

TALEN 発現ベクターは、第 3 章で構築した pCS-Dmavas-ey-KI-TALEN-left-ELD、pCS-Dmavas-ey-KI-TALEN-right-KKR (便宜上 ey1 TALEN とよぶ) と、先行研究で構築した pCS-Dmavas-ey-TALEN-left-ELD、pCS-Dmavas-ey-TALEN-right-KKR (便宜上 ey2 TALEN とよぶ) を使用した [30]。ey1 TALEN の認識配列は (left) 5'-CCGGCGAGAATTCTCGGTCG-3', (right) 5'-CGTCCGAAGGTGTTGTTGT-3'で、スペーサー部分の長さは 18 bp である。ey2 TALEN の認識配列は (left) 5'-GTTGTTCTGGTCCACGCC-3', (right) 5'-GGCGTCGTGAGGAGA-3'で、スペーサー部分の長さは 15 bp である。

#### <JHRE::H2B-GFP を含むベクター>

Kayukawa *et al.*, (2012) で提案された 5'-CTCCACGTG-3'を JHRE コア配列として [87]、4 回繰り返しの JHRE を含むオリゴ DNA を外注した (配列は表 4-A)。4x JHRE を H2B-GFP レポーター遺伝子上流に組み込むために、先行研究で作製した 4x EcRE-H2B-GFP-EF1a-DsRed2 プラスミドの 4x EcRE 配列を除く部分を PCR 増幅した。得られた PCR 産物を MinElute PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて精製した。次に、アニーリングした 4x JHRE 二本鎖オリゴ DNA とベクターバックボーンを in-fusion kit (Clontech) によりクローニングした (4x JHRE-H2B-GFP-EF1a-DsRed2)。さらに、このベクターから EF1a-DsRed2 断片を除くために、バックボーンを含む 4x JHRE-H2B-GFP 部分を PCR 増幅した。得られた PCR 産物を MinElute PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて精製した。得られた PCR 産物を in-fusion kit (Clontech) によりクローニングし、4x JHRE-H2B-GFP プラスミドを得た。

次に、4x JHRE-H2B-GFP に ey1, ey2 TALEN 標的配列を挿入するため、野生型ミジンコゲノムから対象となる領域を PCR 増幅した。また、4x JHRE-H2B-GFP のベクターバックボーン、および 4x JHRE-H2B-GFP をコードする領域をそれぞれ別々に PCR 増幅した。得られた PCR 産物を得られた PCR 産物を MinElute PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて精製後、in-fusion kit (Clontech) によりクローニングし、ey2-4x JHRE-H2B-GFP-ey1 プラスミド (=ドナープラスミド) を得た。

#### 4-2-3. *in vitro* での RNA 合成

第 3 章と同様の手法で行なった。

#### 4-2-4. マイクロインジェクション

第2、第3章と同様の手法で行なった。

#### 4-2-5. GFP 発現トランスジェニック個体 (TG1, TG3) のジェノタイピング

TG1、TG3 系統は生存可能なトランスジェニックであったために、以下のようにインバース PCR 法を利用して、トランスジーン挿入位置を同定した。

##### <ゲノム DNA 抽出>

2 週齢以上の GFP 発現トランスジェニックミジンコ (TG1, TG3) を 10 匹ずつ 2 mL チューブに移し、混入した飼育水をできるだけ取り除いたのち、液体窒素で急速凍結した。これらのチューブに $\phi$ 1.0 のジルコニアビーズを添加し、Micro Smash (MS-100, TOMY) により 3,000 rpm, 30 秒振動を 3 セット繰り返して個体を破碎した。765  $\mu$ L の 1.18x Lysis Buffer (59 mM Tris-HCl (pH 7.5), 23.6 mM EDTA (pH 8.0), 1.18 M NaCl, 1.18% SDS)、135  $\mu$ L の Proteinase K (10 mg/mL) を加え、50 °C の気相インキュベーター (MBR-022UP, タイテック) 中で振盪しながら一晩インキュベートした。RNase 処理、フェノール/クロロホルム処理後、イソプロパノール沈殿により核酸をペレット化し、100  $\mu$ L の TE に溶解させた。

##### <インバース PCR によるトランスジーン挿入位置の同定>

インバース PCR の鋳型となる環状 DNA をゲノム DNA から調製するために、まず以下のように制限酵素処理を行なった。

(反応溶液)

genome DNA (total 2 $\mu$ g)	x $\mu$ L
10x NEB Buffer 3.1	5 $\mu$ L
<i>Nco</i> I (50 U/ $\mu$ L, New England Biolabs)	0.4 $\mu$ L
miliQ water	to 50 $\mu$ L

(サーマルサイクラー設定)

37 °C	24 hour
80 °C	20 min
15 °C	hold

制限酵素処理後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により消化されたゲ

ノム DNA をペレット化し、25  $\mu\text{L}$  の TE に溶解させた。

次に、リニアライズされたゲノム DNA を環状化するために、T4 ligase (TOYOBO) を用いて以下の反応溶液を調製し、4  $^{\circ}\text{C}$  で 24 時間インキュベートした。

(反応溶液)

digested genome DNA	10 $\mu\text{L}$
10x T4 ligase buffer	40 $\mu\text{L}$
10mM rATP	40 $\mu\text{L}$
T4 ligase (4 U/ $\mu\text{L}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
miliQ water	to 400 $\mu\text{L}$

インキュベート後、エタノール沈殿により環状化したゲノム DNA をペレット化し、150  $\mu\text{L}$  の miliQ water に溶解させた。

次に、PrimeSTAR GXL DNA polymerase (TaKaRa) を用いて、以下の組成の反応溶液を調製後、PCR Thermal Cycler Dice Gradient TP-600 (TaKaRa) で PCR 反応を行なった。(サーマルサイクラー設定) に示した通り、アニーリング温度を 55, 59, 63, 68  $^{\circ}\text{C}$  の 4 点に設定して Gradient PCR を行なった。

(反応溶液)

5x PrimeSTAR buffer	10 $\mu\text{L}$
2.5 mM dNTPs mix	4 $\mu\text{L}$
5 $\mu\text{M}$ forward primer	4 $\mu\text{L}$
5 $\mu\text{M}$ reverse primer	4 $\mu\text{L}$
1.25 U/ $\mu\text{L}$ PrimeSTAR GXL polymerase	1 $\mu\text{L}$
self-ligated genome DNA	5 $\mu\text{L}$
miliQ water	to 50 $\mu\text{L}$

(サーマルサイクラー設定)

	98 $^{\circ}\text{C}$	5 min
x30 cycles	98 $^{\circ}\text{C}$	10 sec
	55-68 $^{\circ}\text{C}$	15 sec
	68 $^{\circ}\text{C}$	10 min
	68 $^{\circ}\text{C}$	7 min
	15 $^{\circ}\text{C}$	hold

得られた PCR 産物のサイズはアガロースゲル電気泳動により確認した。

次に、得られた PCR 産物を MinElute PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて精製した。精製された PCR 産物は pBlunt II-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングした。クローンした PCR 産物の配列は、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) を利用した Sanger Sequencing により同定した。使用したプライマーの配列は表 4-A にまとめた。

#### 4-2-6. GFP 発現トランスジェニック個体 (TG2) のジェノタイピング

TG2 系統は、産まれたあと数日で死亡する致死的なトランスジェニックであったために、インバース PCR に必要な量のゲノム DNA が回収できなかった。そのため、以下のようにゲノム PCR によりトランスジーンが *Dma-ey* 遺伝子座に挿入されたか調べた。

##### <ゲノム DNA 抽出>

死亡する前の GFP 発現トランスジェニックミジンコ (TG2) を 2 mL チューブに移し、混入した飼育水をできるだけ取り除いたのち、液体窒素で急速凍結した。これらのチューブにφ1.0 のジルコニアビーズを添加し、Micro Smash (MS-100, TOMY) により 3,000 rpm, 30 秒振動を 3 セット繰り返して個体を破碎した。500 μL の 1x Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1 M NaCl, 1% SDS)、7.5 μL の Proteinase K (10 mg/mL)、1 μL の salmon sperm DNA (10 mg/mL) を加え、50 °C の気相インキュベーター (MBR-022UP, タイテック) 中で振盪しながら一晩インキュベートした。フェノール/クロロホルム処理後、イソプロパノール沈殿により核酸をペレット化し、50 μL の TE に溶解させた。

##### <ゲノム PCR>

PrimeSTAR GXL DNA polymerase (TaKaRa) を用いて、以下の組成の反応溶液を調製後、PCR Thermal Cycler Dice Gradient TP-600 (TaKaRa) で PCR 反応を行なった。(サーマルサイクラー設定) に示した通り、アニーリング温度を 55, 59, 63, 68 °C の 4 点に設定して Gradient PCR を行なった。

##### (反応溶液)

5x PrimeSTAR buffer	5 μL
2.5 mM dNTPs mix	2 μL
5 μM forward primer	2 μL

5 $\mu$ M reverse primer	2 $\mu$ L
1.25 U/ $\mu$ L PrimeSTAR GXL polymerase	0.5 $\mu$ L
genome DNA	1 $\mu$ L
miliQ water	to 25 $\mu$ L

(サーマルサイクラー設定)

	98 °C	5 min
x30 cycles	98 °C	10 sec
	55-68 °C	15 sec
	68 °C	5 min
	68 °C	7 min
	15 °C	hold

得られた PCR 産物のサイズはアガロースゲル電気泳動により確認した。

次に、得られた PCR 産物を MinElute PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて精製した。精製された PCR 産物は pBlunt II-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングした。クローンした PCR 産物の配列は、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) を利用した Sanger Sequencing により同定した。使用したプライマーの配列は表 4-A にまとめた。

表 4-A. 第 4 章で使用したオリゴ DNA 配列

A.

Name	Sequence (5'-3')	Purpose
4x_JHRE_F	agtcctgcattgctccacgtgatctccacgtgta <u>ctccacgtgcactccacgtgatcgcttagctg</u>	4x JHRE containing oligo (JHRE consensus underlined)
4x_JHRE_R	cagctaagcgatcacgtggagtgacgtggagta <u>cacgtggagatcacgtggagcaatgcaggact</u>	
4xJHRE-F1	GAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGC	Construction of JHRE::H2B-GFP vector
4xJHRE-R1	GCCTTTTTACGGTTCGTGGAATTGTGAGCGGATA ACA	
IF-ey2-JHRE:GFP-fwd	AATCCCCAGCAGCAGTGTGGGAAGGGCGATCG	Construction of ey2-JHRE::H2B-GFP-ey1 vector (Donor
IF-ey2-JHRE:GFP-rev	CTGAACCAAACCTGTGTTGCGCAGCCTGAATGG	

IF-ey1-JHRE:GFP-fwd	CAGATCGAGAGCCTCGTTAATTGCGCGCTTGGC	plasmid)
IF-ey1-JHRE:GFP-rev	ACATCACATCGTCACAAGGGAACAAAAGCTGGGT ACC	
Dmey_homeo_fwd4	ACAGGTTTGGTTCAGTAACCG	
Dmey_homeo_rev5	CTGCTGCTGGGGATTGAC	
Dmey_homeo_fwd	GTGACGATGTGATGTCGGA	
Dmey_homeo_rev4	GAGGCTCTCGATCTGTTCG	
GFP-F1	CGGCATGGACGAGCTGTACAAG	inverse PCR (TG1.TG2)
eGFP-realtime-rev	GGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTC	
Dmey_homeo_rev2	GTTCCCTTTGATCTTTGTTGTCTG	genomic PCR (TG2 5'end)
eGFP-5-rev	AACTTCAGGGTCAGCTTGCC	
GFP-F1	CGGCATGGACGAGCTGTACAAG	genomic PCR (TG2 3'end)
Dmey_homeo_rev5	CTGCTGCTGGGGATTGAC	

(A) JHRE クローニング用オリゴ DNA、およびプライマー配列。

### 4-3. 実験結果

#### 4-3-1. ランダム挿入法によるドナープラスミドのゲノムへの導入

ミジンコにおける幼若ホルモン (JH) 動態を可視化するために、当研究室の卒業生である浅田は 4 つ繰り返しの幼若ホルモン応答配列 (JHRE: Juvenile Hormone Response Element) の下流にヒストン 2B 融合 GFP (H2B-GFP) 遺伝子をクローンしたレポーターベクター (図 4-2 左, “JHRE::GFP plasmid”) を構築した。JH は節足動物で広く確認されるホルモンで、細胞内で転写因子 Methoprene-tolerant (Met)、コアクチベーター Taiman と会合して JHRE 下流の遺伝子を転写活性化する [88]。先行研究から、JHRE 配列は生物間で保存されたコア配列が存在することが知られているため [87, 89]、本研究ではコンセンサス (下線部) を含む 5'-CTCCACGCTG-3' を JHRE コア配列として使用した。また、JHRE 下流の H2B-GFP 遺伝子は我々の以前の研究で使用したレポーターであり、細胞核から GFP 蛍光が確認できる [22]。以上から、構築した JHRE::GFP レポーターベクターは JH 依存的に H2B-GFP 遺伝子を発現させ、ミジンコにおける JH の動態を可視化できると期待された。

レポーターベクターを利用して JH 活性をミジンコの生活環を通して観察するためには、JHRE::GFP コンストラクトをミジンコゲノムに導入してトランスジェニック個体を得る必要がある。そこで浅田は、plasmid DNA インジェクションによるランダム挿入法を利用したベクターのノックインを試みた。終濃度 62.5 ng/μL の plasmid DNA を野生型

ミジンコの胚に顕微注入した結果、290 個の胚にインジェクション成功し、そのうち 172 匹が成体まで生存した (表 4-1, Asada, *et al.*, unpublished data)。しかしながら、どの G0 親個体が産仔した G1 仔虫においても、GFP 蛍光は観察されなかった。つまり、トランスジェニックミジンコを得ることはできなかった (効率<0.6%)。同様に、本博士論文著者の中西が同 plasmid DNA を終濃度 50 ng/μL でインジェクションしても、トランスジェニック系統は得られなかった (表 4-1)。以上の結果は、構築した JHRE::GFP plasmid をランダム挿入法でゲノムに導入することは非常に困難であることを示唆している。そのため、本章で私は TALEN を利用した NHEJ ノックイン技術に着目し、それを利用して JHRE::GFP コンストラクトのゲノム導入効率が向上するか調べた。

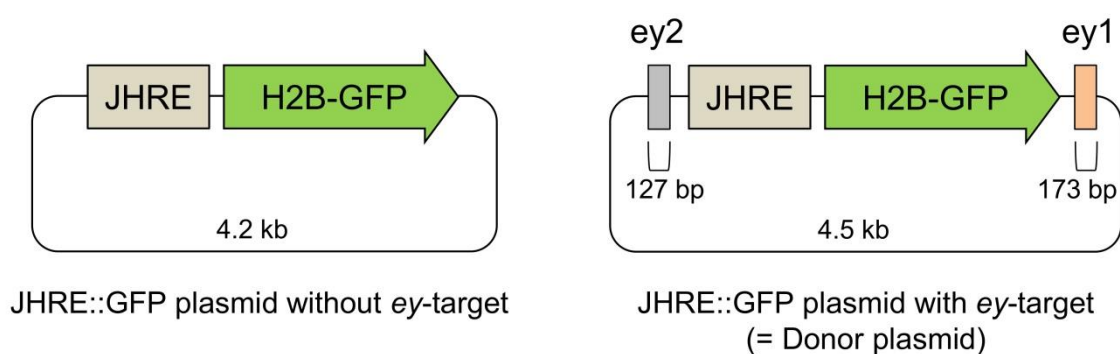


図 4-2. 本章で使用した plasmid DNA の構造

(左) 幼若ホルモン応答配列 (JHRE) をプロモーターとして H2B-GFP 遺伝子を発現させるトランスジーンを含む plasmid DNA。4-3-1 の実験で使用した。

(右) 左と同じトランスジーンをもち、さらに *eyeless*-targeting TALEN (ey1 または ey2) の標的配列を含む plasmid DNA。4-3-2 の実験で使用した。図中の要素は実際のスケールを反映していない。

表 4-1. *ey* 標的配列を含まない plasmid DNA の顕微注入実験

Injected Construct	Concentration (ng/μL)	Embryos	Juveniles (%)	Adults (%)	Transgenics (%)
JHRE::H2B-GFP plasmid	*62.5	290	185/290 (64)	172/290 (59)	0/172 (<0.6)
	50	96	76/96 (79)	70/96 (73)	0/96 (<1.0)

アスタリスク (\*) で示された、plasmid DNA (62.5 ng/μL) のインジェクション実験は、当研究室の卒業生である浅田の未発表データ。下段 plasmid DNA (50 ng/μL) のインジェクション実験は本博士論文著者の中西のデータ。



#### 4-3-2. TALEN による NHEJ ノックインを利用したドナープラスミドのゲノムへの導入

TALEN による NHEJ ノックインがミジンコで応用可能か調べるために、第 3 章で私が構築した *Dma-ey-targeting* TALEN (ey1 TALEN)、および TALEN によるノックアウト実験時に卒業生の内藤らが構築した *Dma-ey-targeting* TALEN (ey2 TALEN) を使用することにした (図 4-3)。また、NHEJ ノックインを実施するためには、目的遺伝子を含む plasmid DNA は TALEN 認識配列を保有している必要がある (図 4-1)。ey1, ey2 TALEN 認識配列を先述の JHRE::GFP ベクターに挿入するために、ゲノム PCR で ey1, ey2 TALEN 認識配列をそれぞれ増幅し、図 4-2 右に示す位置にクローニングした (以下、ドナープラスミドとよぶ)。ey1, ey2 TALEN 認識配列を含む断片はそれぞれ 173 bp, 127 bp であり、それぞれの中央付近に TALEN 認識サイトが位置している。TALEN による NHEJ ノックインがミジンコでも利用可能であれば、ドナープラスミド全体が *Dma-ey* 遺伝子座に組み込まれると期待された (図 4-3)。

まず、ドナープラスミドがランダム挿入法によりゲノムに導入されるか調べた。終濃度 50 ng/μL のドナープラスミドをミジンコ胚に顕微注入した結果、183 個の胚にインジェクション成功し、113 匹の成体が得られた (表 4-3)。しかしながら、4-3-1 と同様に、GFP 蛍光を発するトランスジェニック個体は得られなかった (効率<0.9%)。以上の結果から、ey1 および ey2 配列の有無に関わらず、ランダム挿入法で JHRE::GFP カセットをミジンコゲノムに挿入することはできなかった。

TALEN を利用した NHEJ ノックインがミジンコで引き起こせるか確かめるために、*in vitro* で合成した ey1 TALEN mRNA をドナープラスミドとともにミジンコ胚に顕微注入した。第 3 章で得られた結果を踏まえて、ey1 TALEN mRNA の終濃度は 500 ng/μL とした。48 個の胚にインジェクション成功し、38 匹の成体が得られた (表 4-3)。各 G0 成体が産仔する G1 仔虫を蛍光顕微鏡下で観察したところ、38 匹中 1 匹の G0 が GFP 蛍光を発する G1 トランスジェニック仔虫を産仔した (効率は約 2.6%, 表 4-3)。このトランスジェニック系統を便宜上 TG1 と名付けた。JH の影響を受ける脂肪細胞や筋肉などの組織から GFP 蛍光が確認できるため、構築した JHRE::GFP コンストラクトが期待通りに機能していると考えられた (図 4-4 ”TG1”)。*Dma-ey* 遺伝子座を標的としたが、TG1 は *deformed eye* の表現型を示さなかった。これは、ドナープラスミドが *Dma-ey* 遺伝子座の一方のアレルにのみ挿入されたことを示唆している。

次に、ey2 TALEN を用いても同様にトランスジェニックが得られるか確認するために、*in vitro* で合成した ey1 TALEN mRNA をドナープラスミドとともにミジンコ胚に顕微注入した。我々の先行研究で得られた結果を踏まえて、ey2 TALEN mRNA の終濃度は 250 ng/μL とした [30]。117 個の胚にインジェクション成功し、60 匹の成体が得られた。各

G0 成体が産仔する G1 仔虫を蛍光顕微鏡下で観察したところ、60 匹中 2 匹の G0 が GFP 蛍光を発する G1 トランスジェニック仔虫を産仔した (効率 は約 3.3%, 表 4-3)。これらのトランスジェニック系統を便宜上 TG2、TG3 と名付けた。TG2 は TG1 と類似の GFP 蛍光発現パターンを示したが、TG3 は他の TG より強い GFP 蛍光を示した (図 4-4 ”TG2, TG3”)。また、TG2 は *deformed eye* の表現型を示し、産まれたあと数日で死亡する致死的な表現型を示した。これは、*Dma-ey* 遺伝子座の両アレルに *in-del* 変異または外来遺伝子の挿入が起こったことを示唆している。一方、TG3 の複眼は正常のままで、生存可能であった。

以上の結果をまとめると、ドナープラスミドのみのインジェクションでは JHRE::GFP のトランスジェニックを得ることはできなかった (少なくとも 0.9% 以下の効率) が、*ey1* または *ey2* TALEN mRNA と共注入することで、約 3% の効率でトランスジェニックを樹立することができた。これは、TALEN を利用した NHEJ ノックインにより、効率的な外来遺伝子導入が引き起こされたことを示唆している。

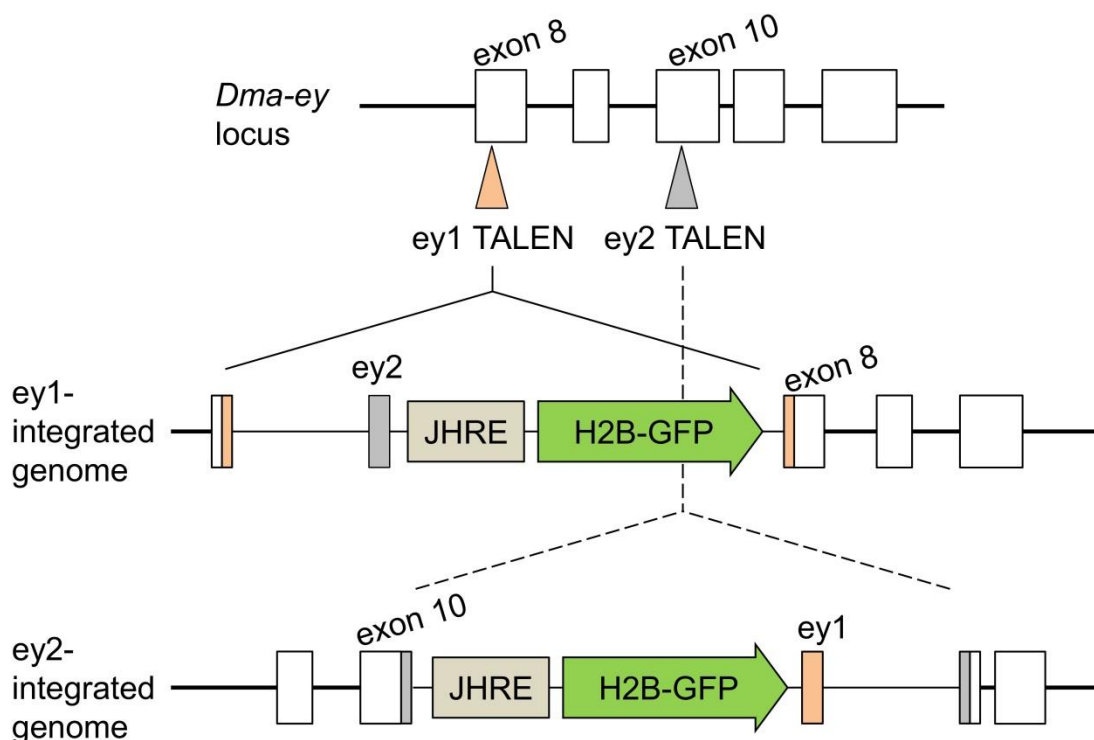


図 4-3. NHEJ ノックインが成功した場合に想定されるゲノム構造

上段のイラストは野生型ミジンコにおける *Dma-ey* 遺伝子座の部分的な構造を示している。TALEN の標的部位は三角形で示されており、*ey1*, *ey2* TALEN はそれぞれエクソン 8、エクソン 10 をターゲットしている。*ey1* または *ey2* TALEN を用い

た NHEJ ノックインが成功した場合、中段、下段それぞれに示すようにドナープラスミド全体がゲノムに挿入されると期待された。図中の要素は実際のスケールを反映していない。

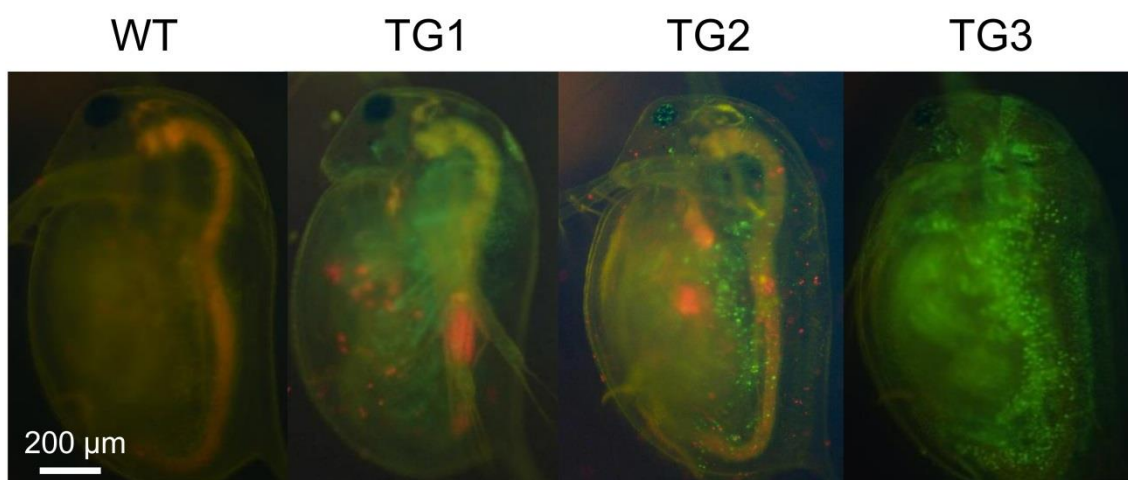


図 4-4. 樹立された GFP 発現トランスジェニック個体の表現型  
 図中左から、野生型 (WT)、TG1、TG2、TG3 を蛍光顕微鏡下で観察した写真。WT では GFP 蛍光が見られないが、TG1 から TG3 はそれぞれ GFP 蛍光を発する。体内または体外に存在するクロレラ (餌) のため写真中とところどころで赤い蛍光が確認されるが、TG の表現型とは関連しない。見やすくするために、TG1、TG2 写真に関してはコントラストを上げている。TG1、TG3 は継代可能であったが、TG2 は産まれたあと数日間しか生存できなかったため、継代不可能であった。

表 4-3. TALEN mRNA とドナープラスミドの共注入実験

Injected Construct	Embryos	Juveniles (%)	Adults (%)	Transgenics (%)	TG name
Donor plasmid	183	117/183 (64)	113/183 (62)	0/ 113 (<0.9)	-
Donor plasmid & ey1 TALEN mRNA	48	39 (81)	38 (79)	1/ 38 (2.6)	TG1
Donor plasmid & ey2 TALEN mRNA	117	81 (69)	60 (51)	2/ 60 (3.3)	TG2, TG3

顕微注入時、Donor plasmid の終濃度は 50 ng/μL、ey1 TALEN mRNA の終濃度は left, right それぞれ 500 ng/μL、ey2 TALEN mRNA の終濃度は left, right それぞれ 250 ng/μL とした。

#### 4-3-3. GFP 発現トランスジェニック個体のジェノタイピング

得られたトランスジェニック系統において、JHRE::GFP を含むトランスジーンが TALEN で標的とした *Dma-ey* 遺伝子座に挿入されたか確認するために、PCR や DNA シークエンスにより各トランスジェニック系統の遺伝子型を調べた。

まず、継代飼育が可能であった TG1、TG3 系統について、十分量の個体からゲノム DNA を抽出してインバース PCR を行なった。その結果、TG1 からは約 4.5 kb と約 2.5 kb の 2 つのバンドが得られ、TG3 からは 5 kb 超のバンドが 1 つ得られた (図 4-5)。これらの PCR 産物をクローニングし、DNA シークエンスにより配列を決定したところ、TG1 ではドナープラスミドが 2 コピータンデムに *Dma-ey* 遺伝子座に挿入されたことが分かった (図 4-7 上段)。さらに、トランスジーンとゲノム DNA のジャンクション部分、つまり ey1 TALEN で切断を受けた領域の DNA 配列を詳細に調べたところ、5'、3'ジャンクションのどちらにも in-del 変異は導入されておらず、ドナープラスミドがシームレスに挿入されたことが判明した (図 4-7 上段)。一方で、TG3 では 1 コピーのドナープラスミドが本来の ey2 TALEN 標的遺伝子座ではない *abba* (another B-box affiliate) 遺伝子座のイントロンに挿入されていた (図 4-7 下段)。さらに、トランスジーンとゲノム DNA のジャンクション部分の DNA 配列を詳細に調べたところ、5'側ジャンクションには 12 bp 欠損および 8 bp の in-del 変異が見られ、3'側ジャンクションには in-del 変異は確認されなかった (図 4-7 下段)。以上の結果をまとめると、少なくとも TG1 では TALEN による NHEJ ノックインが期待通りに引き起こされ、ドナープラスミドが ey1 TALEN 標的サイトに挿入されたと考えられる。つまり、ミジンコでも TALEN による NHEJ ノックインが利用可能であることが示された。TG3 において、*abba* 遺伝子座にドナープラスミドが挿入された原因については「4-4. 考察」で議論する。

次に、致死的な表現型を示した TG2 におけるトランスジーンの挿入遺伝子座を調べた。TG2 は産まれたあと数日で死亡してしまうためにインバース PCR を実施するのに十分な量のゲノム DNA が回収できなかった。そのため、トランスジーンが ey2 TALEN の標的である *Dma-ey* 遺伝子座に組み込まれたかどうかのみに着目した。トランスジーンが ey2 TALEN の標的サイトに組み込まれていれば、図 4-7 中段に青色、黒色矢印でそれぞれ示したプライマーセットを用いて PCR を行なうことで、トランスジーンの有無を調べることができると考えた。ゲノム PCR の結果、図 4-6 に示す通り、5'側、3'側ともにバンドが得られた。この結果は、トランスジーンが当初の期待通りに *Dma-ey* 遺伝子座に挿入されたことを示唆している。得られた PCR 産物をクローニングして配列を確認したところ、3'側ジャンクションは ey2 TALEN で標的とした *Dma-ey* 遺伝子のエクソン 10 で、つなぎ目部分に 6 bp 欠損および 8 bp の in-del 変異が見られた (図 4-7 中段)。一方で、5'側ジャンクションはエクソン 8 の ey1 TALEN 標的サイトであり、in-del

変異は確認されなかった。これは、5'側のトランスジーン DNA がゲノムに挿入される際、ドナープラスミド上の ey1 標的サイト (173 bp) の配列相同性により、5'側でのみ相同組換えが引き起こされたと考えられる。以上の結果をまとめると、TG2 でも TG1 と同様に TALEN による NHEJ ノックインが引き起こされ、ドナープラスミドが ey2 TALEN 標的サイト周辺に挿入されたと考えられる。

以上の実験により、ミジンコでも TALEN を利用した NHEJ ノックイン技術が利用可能であることが示された。ランダム挿入法と比べて、長鎖 DNA (~5 kb) のゲノムへの導入効率が大きく向上した (約 3%)。また、ランダム挿入法ではトランスジーンが組み込まれる遺伝子座を事前に決めることができなかったが、本技術では TALEN で標的とした遺伝子座に外来遺伝子を導入することができる。本技術は、これまで困難だった長鎖外来遺伝子のミジンコゲノムへの組み込みを高効率で行なうことができるため、毒性物質に応答するレポーターミジンコの作出や、ミジンコを用いた有用物質生産研究を進めるうえで非常に有用だと考えられる。

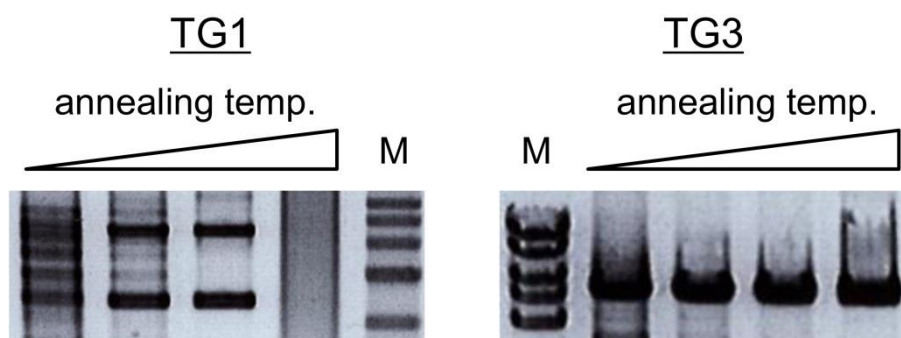


図 4-5. TG1, TG3 におけるインバース PCR 産物の電気泳動結果

(左) TG1 のゲノム DNA を用いたインバース PCR の結果。左のレーンから、アニーリング温度を 55、59、63、68 °C として PCR を行ない、それぞれの温度における PCR 産物が泳動されている。M は DNA マーカーで、上から 6、5、4、3、2 kb のサイズを示している。63 °C のレーンで確認された 2 つのバンドをクローニングして配列を確認した。

(右) TG3 のゲノム DNA を用いたインバース PCR の結果。M は DNA マーカーで、上から 10、8、6、5、4 kb のサイズを示している。M の右側 4 レーンは左図の説明と同様。

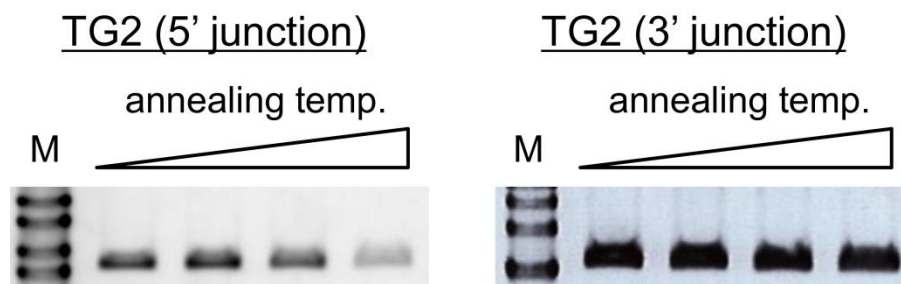
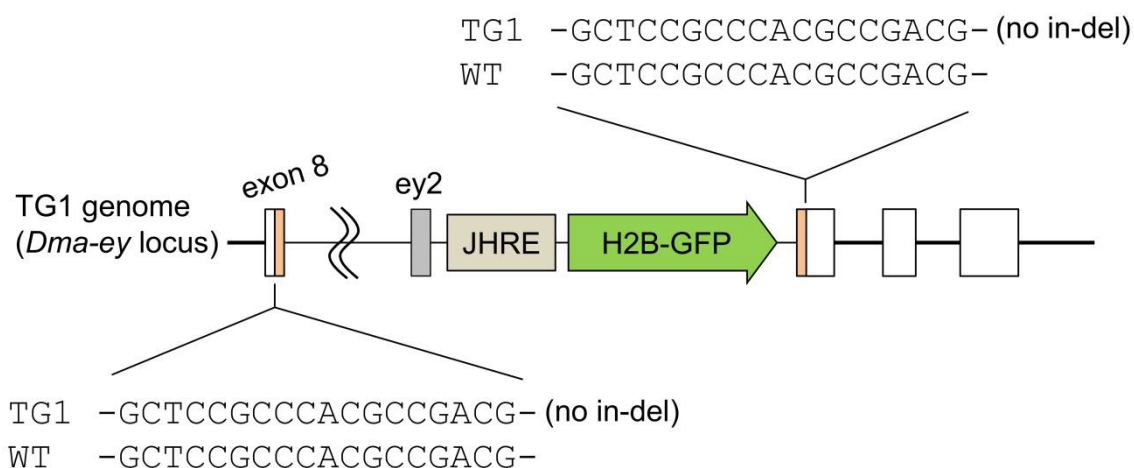


図 4-6. TG2 におけるゲノム PCR 産物の電気泳動結果

(左) TG2 のゲノム DNA を用いて、トランスジーンとゲノム DNA の 5'側ジャンクションを調べた PCR の結果 (図 4-7 中央, 青色のプライマーセット)。M は DNA マーカーで、上から 10、8、6、5 kb のサイズを示している。M の右側 4 レーンは、アニーリング温度を 55、59、63、68 °C として PCR を行ない、それぞれの温度における PCR 産物が泳動されている。

(右) TG2 のゲノム DNA を用いて、トランスジーンとゲノム DNA の 3'側ジャンクションを調べた PCR の結果 (図 4-7 中央, 黒色のプライマーセット)。M は DNA マーカーで、上から 5、4、3 kb のサイズを示している。M の右側 4 レーンは左図の説明と同様。



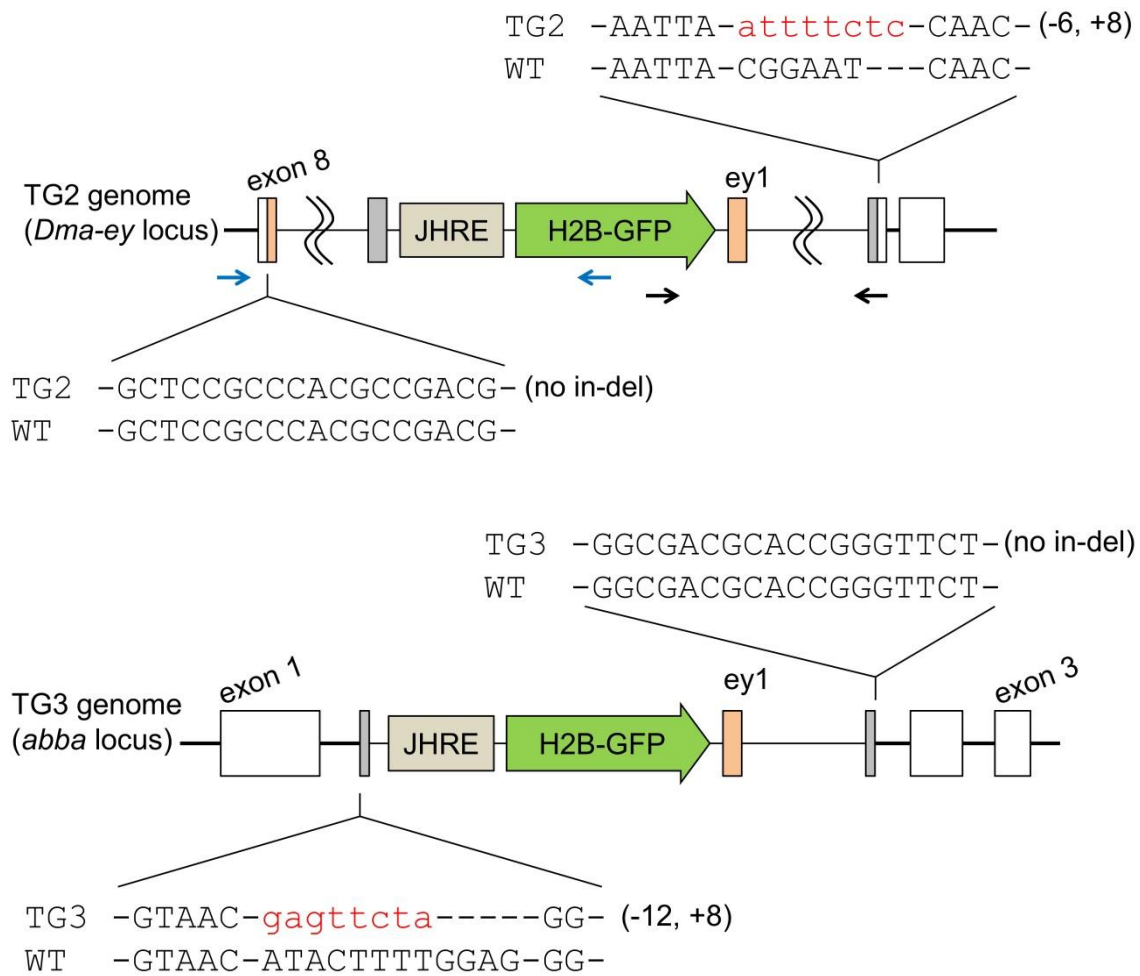


図 4-7. 得られたトランスジェニック系統のトランスジーン挿入遺伝子座  
 (上) TG1 ゲノムにおけるトランスジーン挿入位置の模式図。ドナープラスミドが  
 2 コピータンデムに *Dma-ey* 遺伝子座へ挿入されていた。また、トランスジーンと  
 ゲノム DNA のジャンクション部分に in-del 変異の導入は確認されなかった (図中  
 右上、左下の DNA 配列)。

(中央) TG2 ゲノムにおけるトランスジーン挿入位置の模式図。ドナープラスミド  
 がタンデムに *Dma-ey* 遺伝子座へ挿入されていた。トランスジーンとゲノム DNA  
 の 5'側ジャンクションは本来の標的である *ey2* TALEN の認識サイトでなく *ey1*  
 TALEN の認識サイトであり、in-del 変異は見られなかった (図中左下)。一方で、3'  
 側ジャンクションは本来の標的である *ey2* TALEN の認識サイトで、(-6 bp, +8 bp)  
 の in-del 変異が確認された (図中右上)。

(下) TG3 ゲノムにおけるトランスジーン挿入位置の模式図。TG3 において、トラ  
 ンスジーンは本来の標的である *Dma-ey* 遺伝子座ではなく、無関係の *abba* 遺伝子  
 座に挿入されていた。トランスジーンとゲノム DNA の 5'側ジャンクションには  
 (-12 bp, +8 bp) の in-del 変異が確認された (図中左下)。一方で、3'側ジャンクシヨ

ンには in-del 変異が確認されなかった (図中右上)。図中の要素は実際のスケールを反映していない。

#### 4-4. 考察

本章では、ミジンコにおける TALEN を用いた NHEJ ノックイン技術の確立を行なった。モデル実験として、JH 依存的に GFP を発現するレポーターコンストラクトを含むドナープラスミド (約 4.5 kb) を構築し、*Dma-ey targeting* TALEN mRNA とともにミジンコ胚に顕微注射した。ドナープラスミドだけをインジェクションしても GFP 発現トランスジェニック個体は得られなかったが、TALEN mRNA と共注入した場合、約 3% の効率でトランスジェニック個体を樹立することができた。得られた 3 つのトランスジェニック系統のうち、2 系統では TALEN の標的サイトにドナープラスミドが挿入されていた。つまり、TALEN による NHEJ ノックインは (1) 数 kb レベルの長鎖外来遺伝子を、(2) 約 3% という高効率で、(3) 標的遺伝子座に導入することを可能にする技術である。特に (1) の長鎖 DNA のゲノムへの組み込みは、第 3 章の HR ノックインでは達成されていない点で、本技術の新規な特徴である。

HR ノックイン、NHEJ ノックイン技術はそれぞれに別の利点、欠点をもつ。HR ノックインの利点は、標的遺伝子座に目的の外来 DNA 配列のみをシームレスに挿入できる点である。そのため、内在性遺伝子にエピトープタグや GFP などの配列をインフレームで融合させることが可能である。しかし、緒言で述べた通り、長鎖遺伝子の挿入が可能かは不明である。逆に、NHEJ ノックインの利点は長鎖遺伝子を効率的に導入できる点である。例えば蛍光タンパク質や有用タンパク質などの外来遺伝子を発現するトランスジェニックミジンコを樹立するとき、発現を誘導するプロモーターを含めると数 kb 程度の外来遺伝子をゲノムに組み込む必要がある。この場合、NHEJ ノックインが有効に機能すると考えられる。一方で、NHEJ ノックインは、挿入される遺伝子座に in-del 変異が導入されることがある、挿入される遺伝子のコピー数がランダムであるなどの欠点ももつ。これらの技術を研究目的に応じて使い分けることが重要だと考えられる。

本章で作出された 3 つのトランスジェニック系統のうち、2 系統 (TG1, TG2) は TALEN の標的である *Dma-ey* 遺伝子座にドナープラスミドが組み込まれていたが、残り 1 系統 (TG3) は本来の標的でない *abba* 遺伝子座にトランスジーンが挿入されていた。この原因として、(1) TALEN の off-target 効果で *abba* 遺伝子座が切断された、(2) 細胞中でリニアライズされたドナープラスミドがランダムにゲノムに組み込まれた、の 2 点が想定される。挿入位置のゲノム配列を詳しく調べたところ、ey2 TALEN ペアの標的配列 (on-target) にある程度類似した配列 (putative off-target) が確認された (図 4-8)。この putative off-target は ey2 TALEN right の認識配列は高い類似性を示す (15 塩基中 5 塩基がミスマッチ) もの、ey2 TALEN left 認識配列の類似性は比較的低い (18 塩基中 11 塩基



がミスマッチ)。先行研究から、7塩基以上のミスマッチが存在する場合、off-target になる可能性は低いと指摘されている [90] ため、(2) の仮説が確からしいが、どのようなメカニズムで *abba* 遺伝子座にトランスジーンが組み込まれたのか結論づけるのは現状困難である。

本章の実験により作出された JHRE::GFP トランスジェニックミジンコは、将来的に環境水中の JH 活性物質を検出する生体センサーとして利用できる可能性がある。JH 類似の活性を持つ物質は、農業などで害虫駆除剤として使われている [91]。近年、残留した化学物質の環境毒性が懸念されており、それを迅速に検出する新規バイオアッセイ法として、樹立されたトランスジェニック個体が機能するかもしれない。そのために、今後トランスジェニック個体が外来の JH 活性物質依存的に GFP を高発現するか、また検出感度 (濃度域、シグナル/ノイズ比) はどの程度か、などを調べる必要があると考えられる。

本章の実験により、標的遺伝子座に長鎖外来遺伝子を導入する技術をミジンコで初めて確立することができた。TALEN を用いた NHEJ ノックイン技術は、特に外来遺伝子 (蛍光タンパク質、有用タンパク質など) を恒常的に発現するトランスジェニック個体を作成する場合に有用な技術だと考えられる。ミジンコは他の水生生物と比べて化学物質への感受性が高いため、本技術は毒性化学物質依存的に蛍光を示すレポーターミジンコの作出などの研究に資すると期待される。

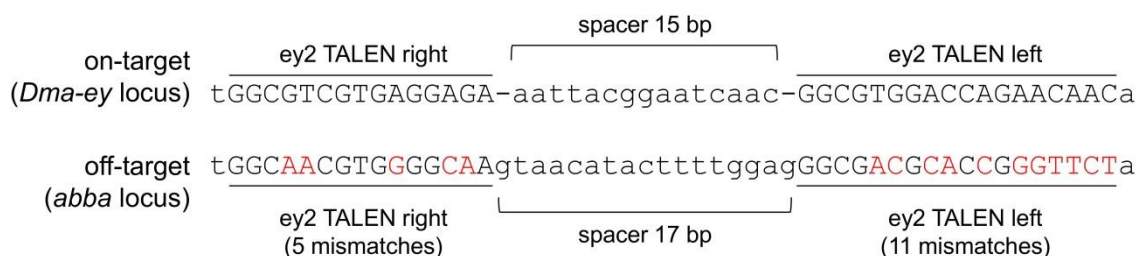


図 4-8. TG3 のトランスジーン挿入位置に見られた putative off-target 配列  
 上段の DNA 配列は、*Dma-ey* 遺伝子座に存在する ey2 TALEN の本来の認識配列 (on-target)。下段の DNA 配列は、*abba* 遺伝子座に存在する ey2 TALEN の認識配列に類似の DNA 配列 (putative off-target) で、TG3 ゲノムにおけるトランスジーンとゲノム DNA のジャンクション部分に確認されたものである。on-target と putative off-target のミスマッチ塩基は赤文字でハイライトされており、TALEN right については 5 塩基の、TALEN left については 11 塩基のミスマッチが確認された。

## 第 5 章 総括

本研究では、近年開発されたゲノム編集ツールである CRISPR-Cas や TALEN を利用して、オオミジンコで標的遺伝子破壊技術並びに外来遺伝子導入技術を確立することを目的とした。以下に概要・結果・結論を示す。

### 5-1. 総括

第 2 章では、ゲノム編集ツールのひとつである CRISPR-Cas を利用した標的遺伝子破壊 (ノックアウト) がミジンコに応用可能か調べた。モデルターゲットとして複眼の形態形成に必須の内在性遺伝子 *eyeless* オルソログ (*Dma-ey*) を選択した。*in vitro* で合成した Cas9 ヌクレアーゼをコードする mRNA 並びに *Dma-ey* targeting gRNA をミジンコ胚に共注入したところ、複眼が奇形の (deformed eye) ノックアウトミジンコを約 8% の効率で樹立することができた。ノックアウト個体のゲノム配列を調べたところ、両アレルの gRNA 標的部周りで塩基配列の挿入/欠失 (in-del) が引き起こされ、その結果読み枠がずれて *Dma-ey* 遺伝子が機能を失っていた。さらに、gRNA 標的配列 (on-target) と類似のゲノム配列 (off-target) には in-del 変異は確認されなかった。以上の結果から、CRISPR-Cas による特異性の高いノックアウト技術をミジンコで確立することができた。

第 3 章では、別のゲノム編集ツールである TALEN を用いた相同組換えによる外来遺伝子導入 (HR ノックイン) がミジンコに応用可能か調べた。HR ノックインが成功したかどうか簡単に調べるために、第 2 章で得られた *Dma-ey* 変異体のひとつで、deformed eye 表現型を示す  $ey^{A877/\Delta 1}$  系統を利用した。*Dma-ey* 遺伝子座の 1 塩基欠損アレル ( $\Delta 1$  アレル) を標的として、67 bp の外来 DNA 配列を 1 塩基欠損部位に HR ノックインで組み込み、復帰変異体を得ることを目指した。そのために、*in vitro* で合成した TALEN mRNA と外来 DNA 配列を含むドナー DNA を胚に共注入したところ、約 2% の効率で期待通りに外来 DNA 配列が組み込まれ、正常な複眼をもつ復帰変異体を樹立できた。このとき、ドナー DNA は plasmid DNA、ssODN (single strand oligo DNA) のどちらを用いても HR ノックインを達成することができた。以上の結果から、TALEN を用いた HR ノックイン技術をミジンコで確立することができた。

第 4 章では、TALEN を用いた非相同末端結合による外来遺伝子導入 (NHEJ ノックイン) がミジンコに応用可能か調べた。モデルインサートとして、幼若ホルモン依存的に GFP を発現する JHRE::H2B-GFP レポーターカセットを plasmid DNA 上に構築した。また、plasmid DNA 上には TALEN の標的配列 (*Dma-ey* 遺伝子の一部) も組み込んだ。この plasmid DNA と *Dma-ey* targeting TALEN mRNA を胚に共注入したところ、約 3% の効率で GFP 蛍光を発するトランスジェニック系統を樹立することができた。得られた 3 つのトランスジェニック系統のうち、2 つでは期待通り plasmid DNA 全体が標的である

*Dma-ey* 遺伝子座に導入されていた。以上の結果から、TALEN を用いた NHEJ ノックイン技術をミジンコで確立することができた。

本研究までにミジンコで利用可能だった遺伝子操作技術と、本研究で確立された技術を以下にまとめた (表 5-1)。

これまで、標的遺伝子の機能を抑制したい場合には RNA 干渉法を用いていた [19]。しかし、RNA 干渉法は完全な機能欠損を誘導できないうえ、効果が一過的であるという欠点があった。第 2 章で確立した CRISPR-Cas によるノックアウト技術はこれらの欠点を克服するもので、標的遺伝子の機能を恒常的に欠損させることが可能になった。また、当研究室の卒業生である内藤らによって TALEN を利用したノックアウト技術も開発され、ミジンコでは CRISPR-Cas よりも高いノックアウト効率を示した [30]。しかしながら、TALEN はコンストラクトの構築に時間がかかるという弱点もあるため、単にノックアウトが目的なら CRISPR-Cas を先に用いる方が、時間効率は良いと考えられる。

これまでミジンコに機能獲得を誘導する場合、エレクトロポレーション [21] や plasmid DNA のランダム挿入法 [22] などが利用されていた。しかし、エレクトロポレーションは幼生のミジンコ個体にしか適用できないうえ、トランスジェニックを作ることとは不可能だった。また、ランダム挿入法はトランスジェニックを作出できるが、低効率である点、標的遺伝子座が選択できない点などが問題であった。第 3 章で確立された TALEN による HR ノックイン技術は、標的遺伝子座に目的遺伝子のみを高効率で挿入することを可能にした。また、第 4 章で確立した TALEN による NHEJ ノックイン技術は、正確性は HR ノックインに劣るものの、標的遺伝子座に長鎖の外来遺伝子を高効率で導入することができる。これらの技術は、既存の機能獲得型遺伝子操作技術に見られた欠点を克服するもので、簡便かつ迅速にトランスジェニック個体を樹立することができるようになった。

表 5-1. ミジンコで利用可能な遺伝子操作技術

効果	機能欠損	機能獲得		
一過的	RNA 干渉法 [19]	mRNA or plasmid DNA のインジェクション エレクトロポレーション [21]		
恒常的	<b>CRISPR-Cas</b> または TALEN による <b>ノックアウト</b> (第 2 章、[30])	ランダム挿入法 [22]	<b>TALEN による HR ノックイン</b> (第 3 章)	<b>TALEN による NHEJ ノックイン</b> (第 4 章)

本博士論文で確立した技術を赤字でハイライトした。

## 5-2. おわりに

本研究の結果、表 5-1 にまとめた通り、標的遺伝子破壊技術並びに標的遺伝子座への外来遺伝子導入技術をミジンコで初めて確立することができた。しかしながら、以下に示すような課題も存在する。

### ■ さらなる高効率化

ミジンコ胚への顕微注入技術は熟練が必要で、現状誰でも簡単に実施できるわけではない。ノックアウト・ノックインの効率を向上させることができれば、インジェクションの成功数が少なくても、目的の遺伝子改変個体を得られると考えられる。TALEN においては、DNA 結合ドメインのリPEATアレイの配列を改変することで、高効率なバリエーション TALEN (platinum TALEN) を作出した例が報告されている [92]。CRISPR-Cas においては、Cas9 ヌクレアーゼを mRNA ではなくタンパク質として細胞または動物胚に供給することで、高効率化を実現した例が報告されている [93-96]。これらのアプローチをミジンコに応用すれば、さらに高効率な遺伝子改変が可能になると期待される。

### ■ ランダム突然変異の誘発技術

本研究で確立された技術は、すべて先に決定した標的遺伝子座に改変を加えるものである。しかしながら、未知遺伝子のプールの中から注目している表現型に関連する遺伝子を同定したい場合、ランダムに機能欠損変異を導入するアプローチの方が効率的である。実際に、伝統的には紫外線照射や変異誘発剤への曝露、トランスポゾンなどが利用されてきた。また、ランダム化した gRNA プールを用いた CRISPR-Cas によるランダム突然変異誘発技術も提案されている [97]。ミジンコゲノムは大量の機能未知遺伝子を含むため、これらのアプローチが実用的になれば、それらの遺伝子機能を効率的に調べることが可能になると考えられる。

### ■ 遺伝子操作技術の応用

本研究は新規の遺伝子操作技術開発に着目しており、確立された技術をどのように利用するかが今後の課題と考えられる。第 2 章で確立した CRISPR-Cas によるノックアウト技術は、オミクス技術などを利用して得られた候補遺伝子の機能を調べるときに有用である。例えば、ミジンコの表現型可塑性 (カイロモン応答) に関与する遺伝子は長い間未知であったが、近年ディファレンシャルディスプレイ法でいくつかの候補遺伝子が提案された [10]。ノックアウト技術により候補遺伝子の機能並びに表現型可塑性を示

す遺伝子カスケードが明らかとなれば、発生生物学において重要な知見になると期待される。

第3章で確立したHRノックイン技術は、内在性遺伝子をエピトープタグなどと融合する際に有用である。例えば、ミジンコの雌雄決定機構に関わる転写因子 *dsx1* 遺伝子は、その下流のカスケードが明らかとなっていない [11]。HRノックイン技術を用いて *dsx1* 遺伝子に His タグなどを付与し、ChIP-seq などを行なうことで、*dsx1* 下流の遺伝子が判明すると期待される。これは発生並びに進化生物学において重要な知見になると考えられる。

第4章で確立したNHEJノックイン技術は、レポーター遺伝子をもつトランスジェニックミジンコを作出するのに有用である。例えば、ミジンコが毒性化学物質に敏感に反応するという特徴を活かし、毒性化学物質依存的に蛍光を発する生体センサーミジンコなどを樹立できると考えられる。本研究の第4章で樹立された JHRE::GFP トランスジェニックミジンコは JH 活性物質を検出するセンサーとしての可能性をもつと期待される。様々な化学物質にそれぞれ対応するセンサーミジンコが開発できれば、それらを用いた環境水の簡便なバイオアッセイが可能になると期待される。

#### ■ 他の甲殻類への応用展開

本研究では、甲殻類の一種であるオオミジンコで初めて標的遺伝子座のノックアウト、ノックイン技術を開発したが、これらの技術は他の甲殻類にも応用できる可能性がある。例えば、実験動物として利用されている甲殻類としてヨコエビの一種である *Parhyale hawaiensis* が挙げられる。*P. hawaiensis* は複雑な発生過程を示すことから、発生生物学の領域において近年利用が進んでいる実験動物である [98]。本研究で得られたノックアウト、ノックイン技術に関する知見がヨコエビにも応用可能であれば、甲殻類の多様なボディプランがどのような遺伝子基盤から生じるのかを明らかにできると期待される。また、食用に供されるカニやクルマエビなどの甲殻類でも本研究成果が応用可能であれば、遺伝子操作技術をもとにした育種が可能になると期待される。例えば、遺伝子操作技術により遺伝子機能と病気耐性、食味などとの関連を明らかにすることができれば、よりよい品種の作出に貢献できると考えられる。

## 引用文献

1. Metchnikoff M.E. (1884) *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol.* **9**, 177.
2. Weismann A. (1885) *Die Continuität des Keimplasma's als Grundlage einer Theorie der Vererbung* (Gustav Fischer, Jena).
3. Ebert D. (2005) Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.
4. Tollrian R. & Leese F. (2010) Ecological genomics: steps towards unraveling the genetic basis of inducible defenses in *Daphnia*. *BMC Biol.* **8**, 51.
5. Hebert P.D.N. (1978) Population Biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biol Rev.* **53**, 387-426.
6. Martins J., Oliva Teles L., Vasconcelos V. (2007) Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environ Int.* **33**, 414-425
7. Watanabe H., Tatarazako N., Oda S., Nishide H., Uchiyama I., Morita M., Iguchi T. (2005) Analysis of expressed sequence tags of the water flea *Daphnia magna*. *Genome.* **48**, 606-609.
8. Orsini L., Decaestecker E., De Meester L., Pfrender M.E., Colbourne J.K. (2011) Genomics in the ecological arena. *Biol Lett.* **7**, 2-3.
9. Colbourne J.K., Pfrender M.E., Gilbert D., Thomas W.K., Tucker A., Oakley T.H., Tokishita S., Aerts A., Arnold G.J., Basu M.K., Bauer D.J., Cáceres C.E., Carmel L., Casola C., Choi J.H., Detter J.C., Dong Q., Dusheyko S., Eads B.D., Fröhlich T., Geiler-Samerotte K.A., Gerlach D., Hatcher P., Jogdeo S., Krijgsveld J., Kriventseva E.V., Kültz D., Laforsch C., Lindquist E., Lopez J., Manak J.R., Muller J., Pangilinan J., Patwardhan R.P., Pitluck S., Pritham E.J., Rechtsteiner A., Rho M., Rogozin I.B., Sakarya O., Salamov A., Schaack S., Shapiro H., Shiga Y., Skalitzky C., Smith Z., Souvorov A., Sung W., Tang Z., Tsuchiya D., Tu H., Vos H., Wang M., Wolf Y.I., Yamagata H., Yamada T., Ye Y., Shaw J.R., Andrews J., Crease T.J., Tang H., Lucas S.M., Robertson H.M., Bork P., Koonin E.V., Zdobnov E.M., Grigoriev I.V., Lynch M., Boore J.L. (2011) The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science.* **331**, 555–561.
10. Miyakawa H., Imai M., Sugimoto N., Ishikawa Y., Ishikawa A., Ishigaki H., Okada Y., Miyazaki S., Koshikawa S., Cornette R., Miura T. (2010) Gene up-regulation in response to predator kairomones in the water flea, *Daphnia pulex*. *BMC Dev Biol.* **10**, 45.
11. Kato Y., Kobayashi K., Watanabe H., Iguchi T. (2011) Environmental sex determination in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*: deep conservation of a *Doublesex* gene in the sex-determining pathway. *PLoS Genet.* **7**, e1001345.

12. 日本生態学会編. エコゲノミクス-遺伝子から見た適応-. 共立出版. 2012.
13. Piña B. & Barata, C. (2011) A genomic and ecotoxicological perspective of DNA array studies in aquatic environmental risk assessment. *Aquat Toxicol.* **105**, 40-49.
14. Kim H.J., Koedrith P., Seo Y.R. (2015) Ecotoxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of environmental chemical toxicity using aquatic invertebrate, *Daphnia* model organism. *Int J Mol Sci.* **16**, 12261-12287
15. Watanabe H., Takahashi E., Nakamura Y., Oda S., Tatarazako N., Iguchi T. (2007) Development of a *Daphnia magna* DNA microarray for evaluating the toxicity of environmental chemicals. *Environ Toxicol Chem.* **26**, 669-676.
16. Watanabe H., Kobayashi K., Kato Y., Oda S., Abe R., Tatarazako N., Iguchi T. (2008) Transcriptome profiling in crustaceans as a tool for ecotoxicogenomics: *Daphnia magna* DNA microarray. *Cell Biol Toxicol.* **24**, 641-647.
17. Asada M., Kato Y., Matsuura T., Watanabe H. (2014) Visualization of ecdysteroid activity using a reporter gene in the crustacean, *Daphnia*. *Mar Environ Res.* **93**, 118-122.
18. Gorelick D.A., Iwanowicz L.R., Hung A.L., Blazer V.S., Halpern M.E. (2014) Transgenic zebrafish reveal tissue-specific differences in estrogen signaling in response to environmental water samples. *Environ Health Perspect.* **122**, 356-362.
19. Kato Y., Shiga Y., Kobayashi K., Tokishita S., Yamagata H., Iguchi T., Watanabe H. (2011) Development of an RNA interference method in the cladoceran crustacean *Daphnia magna*. *Dev Genes Evol.* **220**, 337-345.
20. Morita S., Shiga Y., Tokishita S., Ohta T. (2015) Analysis of spatiotemporal expression and function of the single-minded homolog in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*. *Gene.* **555**, 335-345.
21. Kato Y., Kobayashi K., Watanabe H., Iguchi T. (2010) Introduction of foreign DNA into the water flea, *Daphnia magna*, by electroporation. *Ecotoxicology.* **19**, 589-592.
22. Kato Y., Matsuura T., Watanabe, H. (2012) Genomic integration and germline transmission of plasmid injected into crustacean *Daphnia magna* eggs. *PLoS One.* **7**, e45318.
23. Gaj T., Gersbach C.A., Barbas C.F. 3rd. (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* **31**, 397-405
24. Kim H. & Kim J.S. (2014) A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet.* **15**, 321-334.
25. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *FokI* cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 1156-1160.
26. Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes, M.C., Zhang H.S., Gregory P.D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Rev. Genet.* **11**, 636-646.
27. Miller J.C., Tan S., Qiao G., Barlow K.A., Wang J., Xia D.F., Meng X., Paschon D.E.,

- Leung E., Hinkley S.J., Dulay G.P., Hua K.L., Ankoudinova I., Cost G.J., Urnov F.D., Zhang H.S., Holmes M.C., Zhang L., Gregory P.D., Rebar E.J. (2011) A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol.* **29**, 143–148.
28. Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* **326**, 1509–1512.
29. Moscou M.J. & Bogdanove A.J. (2009) A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science.* **326**, 1501.
30. Naitou A., Kato Y., Nakanishi T., Matsuura T., Watanabe H. (2015) Heterodimeric TALENs induce targeted heritable mutations in the crustacean *Daphnia magna*. *Biol Open.* **4**, 364-369.
31. Horvath P. & Barrangou R. (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science.* **327**, 167-170.
32. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* **337**, 816-821.
33. Joung J.K. & Sandar J.D. (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol.* **32**, 347-355.
34. Quiring R., Walldorf U., Kloter U., Gehring W.J. (1994) Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans. *Science.* **265**, 785-789.
35. Walther C. & Gruss P. (1991) Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development.* **113**, 1435-1449.
36. Hill R.E., Favor J., Hogan B.L., Ton C.C., Saunders G.F., Hanson I.M., Prosser J., Jordan T., Hastie N.D., van Heyningen V. (1991) Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature.* **354**, 522-525.
37. Ton C.C., Hirvonen H., Miwa H., Weil M.M., Monaghan P., Jordan T., van Heyningen V., Hastie N.D., Meijers-Heijboer H., Drechsler M., Royer-Pokora B., Collins F., Swaroop A., Strong L.C., Saunders G.F. (1991) Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell.* **67**, 1059-1074.
38. Kluttgen B., Dulmer U., Engels M., Ratte H.T. (1994) ADaM, an artificial freshwater for the culture of zooplankton. *Water Res.* **28**, 743–746.
39. Sander J.D., Zaback P., Joung J.K., Voytas D.F., Dobbs D. (2007) Zinc Finger Targeter (ZiFiT): an engineered zinc finger/target site design tool. *Nucleic Acids Res.* **35**, W599-605.
40. Sander J.D., Maeder M.L., Reyon D., Voytas D.F., Joung J.K., Dobbs D. (2010) ZiFiT (Zinc Finger Targeter): an updated zinc finger engineering tool. *Nucleic Acids Res.* **38**, W462-468.



41. Hwang W.Y., Fu Y., Reyon D., Maeder M.L., Tsai S.Q., Sander J.D., Peterson R.T., Yeh J.R., Joung J.K. (2013) Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol.* **31**, 227-229.
42. Callaerts P., Clements J., Francis C., Hens K. (2006) Pax6 and eye development in Arthropoda. *Arthropod Struct Dev.* **35**, 379-391.
43. Kronhamn J., Frei E., Daube M., Jiao R., Shi Y., Noll M., Rasmuson-Lestander A. (2002) Headless flies produced by mutations in the paralogous *Pax6* genes *eyeless* and *twin of eyeless*. *Development.* **129**, 1015-1026.
44. Sagawa K., Yamagata H., Shiga Y. (2005) Exploring embryonic germ line development in the water flea, *Daphnia magna*, by zinc-finger-containing VASA as a marker. *Gene Expr Patterns.* **5**, 669-678.
45. Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F., Marraffini L.A. (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol.* **31**, 233-239.
46. Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., Sander J.D. (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* **31**, 822-826.
47. Mikkola I., Bruun J.A., Bjorkoy G., Holm T., Johansen T. (1999) Phosphorylation of the transactivation domain of Pax6 by extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* **274**, 15115-15126.
48. Kim E.A., Noh Y.T., Ryu M.J., Kim H.T., Lee S.E., Kim C.H., Lee C., Kim Y.H., Choi C.Y. (2006) Phosphorylation and transactivation of Pax6 by homeodomain-interacting protein kinase 2. *J Biol Chem.* **281**, 7489-7497.
49. Yan Q., Gong L., Deng M., Zhang L., Sun S., Liu J., Ma H., Yuan D., Chen P.C., Hu X., Liu J., Qin J., Xiao L., Huang X.Q., Zhang J., Li D.W. (2010) Sumoylation activates the transcriptional activity of Pax-6, an important transcription factor for eye and brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 21034-21039.
50. Chapman J.R., Taylor M.R., Boulton S.J. (2012) Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell.* **47**, 497-510.
51. Gloor G.B., Nassif N.A., Johnson-Schlitz D.M., Preston C.R., Engels W.R. (1991) Targeted gene replacement in *Drosophila* via *P* element-induced gap repair. *Science.* **253**, 1110-1117.
52. Chen C., Fenk L.A., de Bono M. (2013) Efficient genome editing in *Caenorhabditis elegans* by CRISPR-targeted homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* **41**, e193.
53. Gratz S.J., Cummings A.M., Nguyen J.N., Hamm D.C., Donohue L.K., Harrison M.M., Wildonger J., O'Connor-Giles K.M. (2013) Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics.* **194**, 1029-1035.

54. Zhao P., Zhang Z., Ke H., Yue Y., Xue D. (2014) Oligonucleotide-based targeted gene editing in *C. elegans* via the CRISPR/Cas9 system. *Cell Res.* **24**, 247-250.
55. Smithies O., Gregg R.G., Boggs S.S., Koralewski M.A., Kucherlapati R.S. (1985) Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature.* **317**, 230-234.
56. Thomas K.R., Folger K.R., Capecchi M.R. (1986) High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell.* **44**, 419-428.
57. Rong Y.S. & Golic K.G. (2000) Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science.* **288**, 2013-2018.
58. Beumer K.J., Trautman J.K., Bozas A., Liu J.L., Rutter J., Gall J.G., Carroll D. (2008) Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 19821-19826.
59. Meyer M., De Angelis M.H., Wurst W., Kühn R. (2010) Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 15022-15026.
60. Qiu Z., Liu M., Chen Z., Shao Y., Pan H., Wei G., Yu C., Zhang L., Li X., Wang P., Fan H.Y., Du B., Liu B., Liu M., Li D. (2013) High-efficiency and heritable gene targeting in mouse by transcription activator-like effector nucleases. *Nucleic Acids Res.* **41**, e120.
61. Shen B., Zhang J., Wu H., Wang J., Ma K., Li Z., Zhang X., Zhang P., Huang X. (2013) Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res.* **23**, 720-723.
62. Wefers B., Meyer M., Ortiz O., Hrabé de Angelis M., Hansen J., Wurst W., Kühn R. (2013) Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**, 3782-3787.
63. Bedell V.M., Wang Y., Campbell J.M., Poshusta T.L., Starker C.G., Krug R.G. 2nd, Tan W., Penheiter S.G., Ma A.C., Leung A.Y., Fahrenkrug S.C., Carlson D.F., Voytas D.F., Clark K.J., Essner J.J., Ekker S.C. (2012) In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature.* **491**, 114-118.
64. 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.
65. Bernardini F., Galizi R., Menichelli M., Papathanos P.A., Dritsou V., Marois E., Crisanti A., Windbichler N. (2014) Site-specific genetic engineering of the *Anopheles gambiae* Y chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111**, 7600-7605.
66. Bozas A., Beumer K.J., Trautman J.K., Carroll D. (2009) Genetic analysis of zinc-finger nuclease-induced gene targeting in *Drosophila*. *Genetics.* **182**, 641-651.

67. Qi Y., Zhang Y., Zhang F., Baller J.A., Cleland S.C., Ryu Y., Starker C.G., Voytas D.F. (2013) Increasing frequencies of site-specific mutagenesis and gene targeting in *Arabidopsis* by manipulating DNA repair pathways. *Genome Res.* **23**, 547-554.
68. Basu S., Aryan A., Overcash J.M., Samuel G.H., Anderson M.A., Dahlem T.J., Myles K.M., Adelman Z.N. (2015) Silencing of end-joining repair for efficient site-specific gene insertion after TALEN/CRISPR mutagenesis in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **112**, 4038-4043.
69. Ma S., Chang J., Wang X., Liu Y., Zhang J., Lu W., Gao J., Shi R., Zhao P., Xia Q. (2014) CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of BmKu70 in *Bombyx mori*. *Sci Rep.* **4**, 4489.
70. Nakanishi T., Kato Y., Matsuura T., Watanabe H. (2014) CRISPR/Cas-mediated targeted mutagenesis in *Daphnia magna*. *PLoS One.* **9**, e98363.
71. Doyle E.L., Booher N.J., Standage D.S., Voytas D.F., Brendel V.P., Vandyk J.K., Bogdanove A.J. (2012) TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Res.* **40**, W117-122.
72. Streubel J., Blücher C., Landgraf A., Boch J. (2012) TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nat Biotechnol.* **30**, 593-595.
73. Cermak T., Doyle E.L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J.A., Somia N.V., Bogdanove A.J., Voytas D.F. (2011) Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* **39**, e82.
74. Groth A.C., Olivares E.C., Thyagarajan B., Calos M.P. (2000) A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 5995-6000.
75. Carroll D. (2014) Genome engineering with targetable nucleases. *Annu Rev Biochem.* **83**, 409-439.
76. Wei Y.F., Robins P., Carter K., Caldecott K., Pappin D.J., Yu G.L., Wang R.P., Shell B.K., Nash R.A., Schär P., Barnes D.E., Haseltine W.A., Lindahl T. (1995) Molecular cloning and expression of human cDNAs encoding a novel DNA ligase IV and DNA ligase III, an enzyme active in DNA repair and recombination. *Mol Cell Biol.* **15**, 3206-3216.
77. Tomkinson A.E., Vijayakumar S., Pascal, J.M., Ellenberger T. (2006) DNA ligases: structure, reaction mechanism, and function. *Chem Rev.* **106**, 687-699.
78. Ochi T., Gu X., Blundell, T.L. (2013) Structure of the catalytic region of DNA ligase IV in complex with an Artemis fragment sheds light on double-strand break repair. *Structure.* **21**, 672-679.
79. Gorski M.M., Eeken J.C., de Jong A.W., Klink I., Loos M., Romeijn R.J., van Veen B.L., Mullenders L.H., Ferro W., Pastink A. (2003) The *Drosophila melanogaster* DNA Ligase IV gene plays a crucial role in the repair of radiation-induced DNA double-strand

- breaks and acts synergistically with Rad54. *Genetics*. **165**, 1929-1941.
80. McVey M., Radut D., Sekelsky J.J. (2004) End-joining repair of double-strand breaks in *Drosophila melanogaster* is largely DNA ligase IV independent. *Genetics*. **168**, 2067-2076.
  81. Gagnon J.A., Valen E., Thyme S.B., Huang P., Akhmetova L., Pauli A., Montague T.G., Zimmerman S., Richter C., Schier A.F. (2014) Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PLoS One*. **9**, e98186.
  82. Doench J.G., Hartenian E., Graham D.B., Tothova Z., Hegde M., Smith I., Sullender M., Ebert B.L., Xavier R.J., Root D.E. (2014) Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol*. **32**, 1262-1267.
  83. Cristea S., Freyvert Y., Santiago Y., Holmes M.C., Urnov F.D., Gregory P.D., Cost G.J. (2013) In vivo cleavage of transgene donors promotes nuclease mediated targeted integration. *Biotechnol Bioeng*. **110**, 871–880.
  84. Maresca M., Lin V.G., Guo N., Yang Y. (2013) Obligate ligation-gated recombination (ObLiGaRe): Custom-designed nuclease-mediated targeted integration through nonhomologous end joining. *Genome Res*. **23**, 539–546.
  85. Auer T.O., Duroure K., De Cian A., Concordet J.P., Del Bene F. (2014) Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res*. **24**, 142-153.
  86. Kimura Y., Hisano Y., Kawahara A., Higashijima S. (2014) Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Sci Rep*. **4**, 6545.
  87. Kayukawa T., Minakuchi C., Namiki T., Togawa T., Yoshiyama M., Kamimura M., Mita K., Imanishi S., Kiuchi M., Ishikawa Y., Shinoda T. (2012) Transcriptional regulation of juvenile hormone-mediated induction of Krüppel homolog 1, a repressor of insect metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**, 11729-11734.
  88. Jindra M., Palli S.R., Riddiford L.M. (2013) The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annu Rev Entomol*. **58**, 181-204.
  89. Li M., Mead E.A., Zhu J. (2011) Heterodimer of two bHLH-PAS proteins mediates juvenile hormone-induced gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**, 638-643.
  90. Kim Y., Kweon J., Kim A., Chon J.K., Yoo J.Y., Kim H.J., Kim S., Lee C., Jeong E., Chung E., Kim D., Lee M.S., Go E.M., Song H.J., Kim H., Cho N., Bang D., Kim S., Kim J.S. (2013) A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat Biotechnol*. **31**, 251-258
  91. Tatarazako N. & Oda S. (2007) The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on

- crustaceans. *Ecotoxicology*. **16**,197-203.
92. Sakuma T., Ochiai H., Kaneko T., Mashimo T., Tokumasu D., Sakane Y., Suzuki K., Miyamoto T., Sakamoto N., Matsuura S., Yamamoto T. (2013) Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Sci Rep*. **29**, 3379.
  93. Cho S.W., Kim S., Kim J.M., Kim J.S. (2013) Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*. **31**, 230-232.
  94. Paix A., Folkmann A., Rasoloson D., Seydoux G. (2015) High Efficiency, Homology-Directed Genome Editing in *Caenorhabditis elegans* Using CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Complexes. *Genetics*. **201**, 47-54.
  95. Schumann K., Lin S., Boyer E., Simeonov D.R., Subramaniam M., Gate R.E., Haliburton G.E., Ye C.J., Bluestone J.A., Doudna J.A., Marson A. (2015) Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **112**, 10437-10442.
  96. Woo J.W., Kim J., Kwon S.I., Corvalán C., Cho S.W., Kim H., Kim S.G., Kim S.T., Choe S., Kim J.S. (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol*. **33**, 1162-1164.
  97. Koike-Yusa H., Li Y., Tan E.P., Velasco-Herrera Mdel C., Yusa K. (2014) Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol*. **32**, 267-273.
  98. Rehm E.J., Hannibal R.L., Chaw R.C., Vargas-Vila M.A., Patel N.H. (2009) The crustacean *Parhyale hawaiiensis*: a new model for arthropod development. *Cold Spring Harb Protoc*. **2009**, 373–404.

## 発表論文

1. Nakanishi T., Kato Y., Matsuura T., Watanabe H. (2014) CRISPR/Cas-mediated targeted mutagenesis in *Daphnia magna*. *PLoS ONE*. **9**, e98363.
2. Nakanishi T., Kato Y., Matsuura T., Watanabe H. (2015) TALEN-mediated homologous recombination in *Daphnia magna*. *Sci Rep*. **5**, 18312.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇篤なご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学工学研究科 渡邊肇 教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究を進めるうえで、日頃から貴重なご助言を頂戴しました大阪大学工学研究科 松浦友亮 准教授、同 加藤泰彦 助教に深く感謝致します。

本論文を作成するにあたり、有益なご指導、ご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科 福井希一 教授、同 村中俊哉 教授に厚く感謝申し上げます。

本研究を行なうに際し、いつも協力し励ましてくださった生命環境システム工学領域の事務の方々、学生の皆様に心から感謝いたします。