

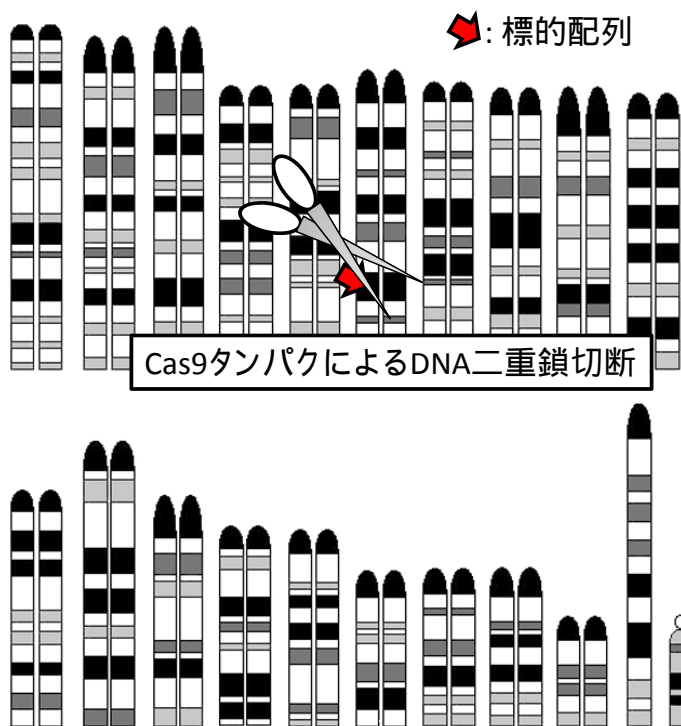


# CRISPR/Cas9 の作用原理

gRNA がゲノム中の特定のDNA配列に結合する  
Cas9 タンパク が2重鎖のゲノムDNAを切断する

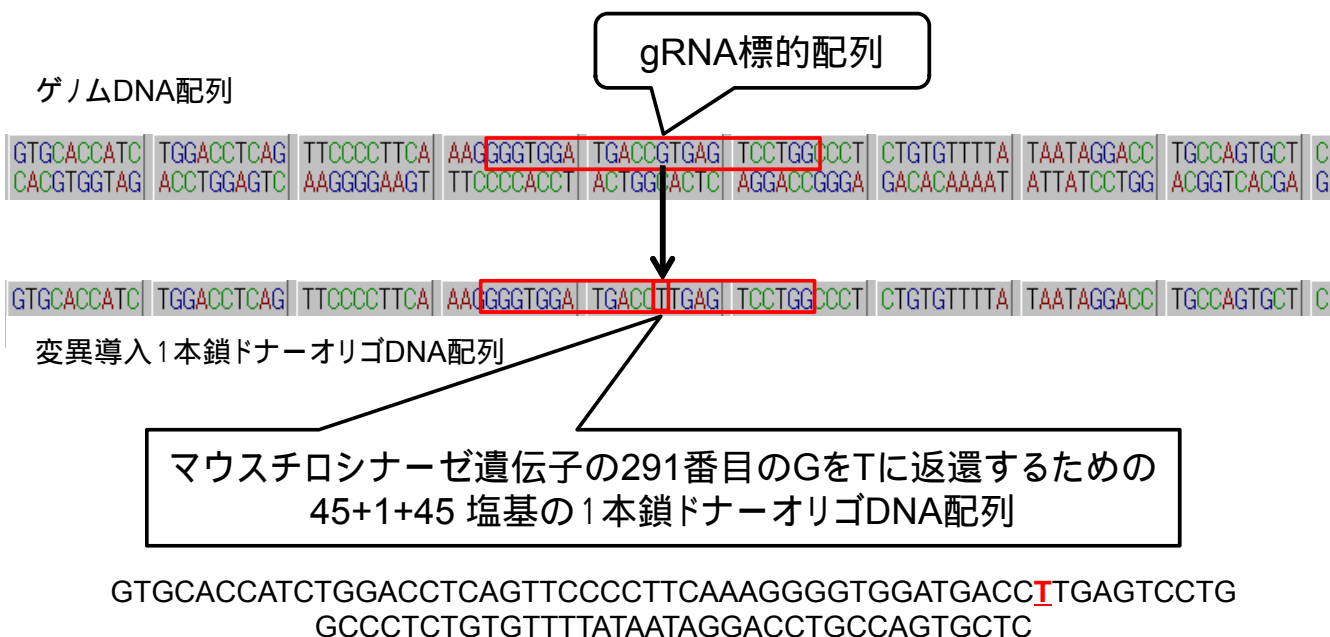


gRNA

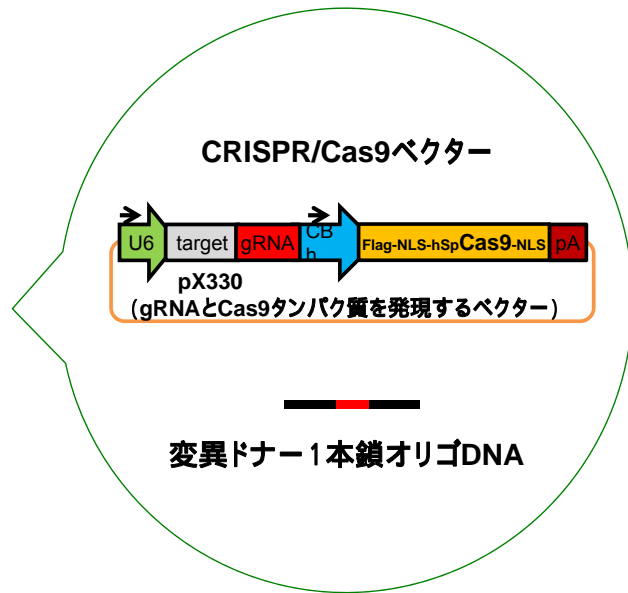


## CRISPR/Cas9による遺伝子改変の実際

マウス受精卵を用いて、チロシナーゼ遺伝子の291番目のGをTに改変して機能を欠損させ、黒色マウスを白色に改変した。

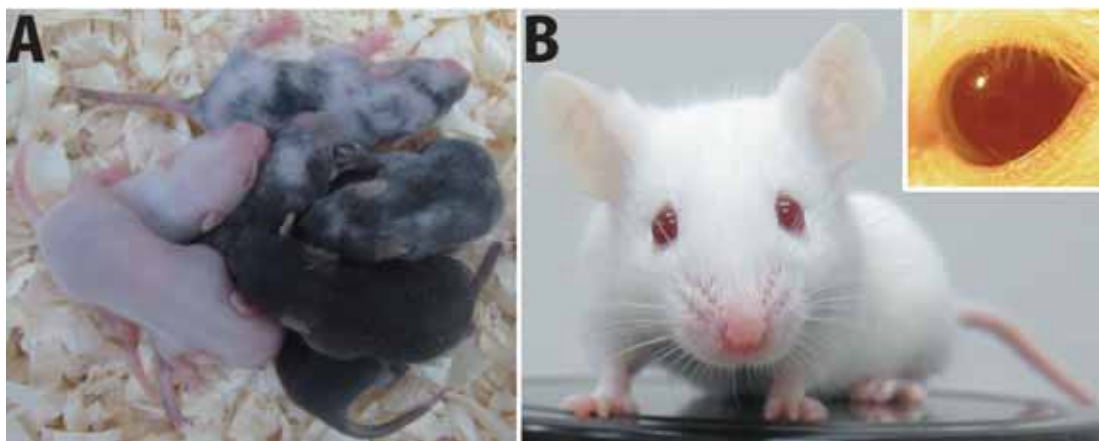


# CRISPR/Cas9ベクターのC57BL/6Jマウス受精卵への導入



環状のCRISPR/Cas9 ベクターと変異ドナー一本鎖オリゴDNAを導入

# CRISPR/Cas9による白色C57BL/6Jマウスの作製



**Wild-type** ACCTCAGTCCCCTTCAAAGGGGTGGATGACC**G**TGAGTCCTGGCCCTCTGTGTTTTATAATAG  
**#1-1** ACCTCAGTCCCCTTCAAAGGGGTGGATGACC**T**TGAGTCCTGGCCCTCTGTGTTTTATAATAG  
**#1-2** ACCTCAGTCCCCTTCAAAGGGGTGGATGACC-----**TCCTGG**CCCTCTGTGTTTTATAATAG  
**#2-1** ACCTCAGTCCCCTTCAAAGGGG----- (20 bp) -----CCCTCTGTGTTTTATAATAG  
**#2-2** ACCTCAGTCCCCTTCAAAGGGGTGG----- (17 bp) -----CCCTCTGTGTTTTATAATAG

(Mizuno S and Sugiyama F, et al. *Mammalian Genome*, 2014. )

## CRISPR/Cas9による白色C57BL/6Jマウスの作製

インジェクションDNA	インジェクション 受精卵数	移植受精卵数	出生マウス数	
			毛色	
px330 Tyr M (5ng/ul) ssDNA donor (10ng/ul)	224	205	黒色(野生型)	18 (30.0%) <sup>a</sup>
			モザイク	14 (23.3%) <sup>b</sup>
			白色(変異型)	28 (46.7%) <sup>c</sup>
			合計	60

<sup>a</sup>黒色マウス数/出生マウス数

<sup>b</sup>モザイクマウス数/出生マウス数

<sup>c</sup>白色マウス数/出生マウス数

(Mizuno S and Sugiyama F, et al. Mammalian Genome, 2014. )

## CRISPR/Cas9による白色C57BL/6Jマウスの作製

出生マウス数		変異が導入されたマウス数	
白色マウス数	px330非挿入マウス数		
28	27 (96.4%) <sup>a</sup>	非特異的変異	16 (59.3%) <sup>b</sup>
		非特異的変異/点変異 (G291T)	10 (37.0%) <sup>c</sup>
		点変異 (G291T)	1 (3.7%) <sup>d</sup>
		合計	27

<sup>a</sup>px330ベクターが挿入されなかったマウス数/白色マウス数

<sup>b</sup>非特異的変異マウス数/px330ベクターが挿入されていなかった白色マウス数

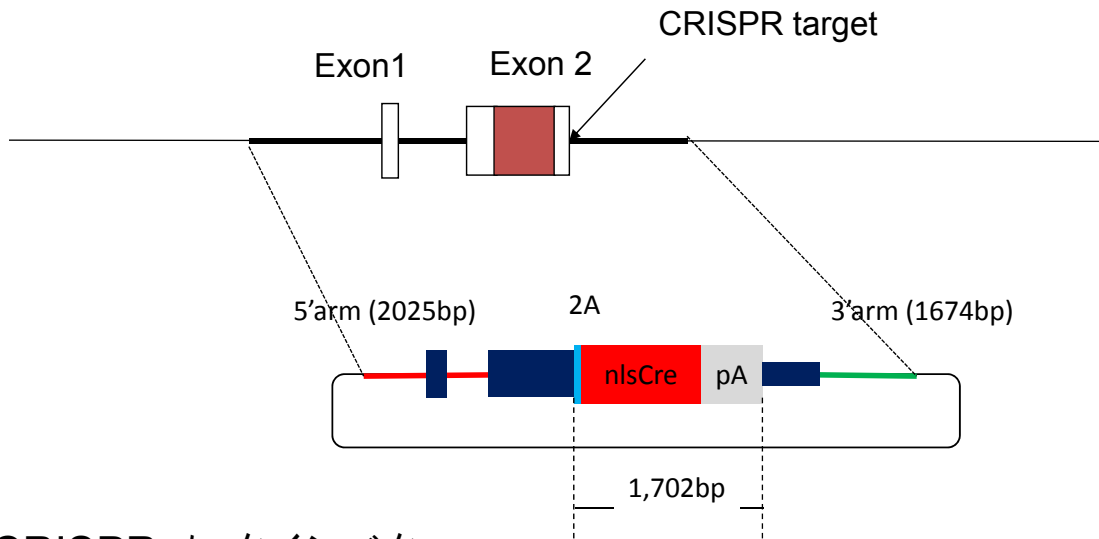
<sup>c</sup>非特異的変異アレールと点突然変異を有するマウス数/px330ベクターが挿入されていなかった白色マウス数

<sup>d</sup>点突然変異のみを有するマウス数/px330ベクターが挿入されていなかった白色マウス数

(Mizuno S and Sugiyama F, et al. Mammalian Genome, 2014. )

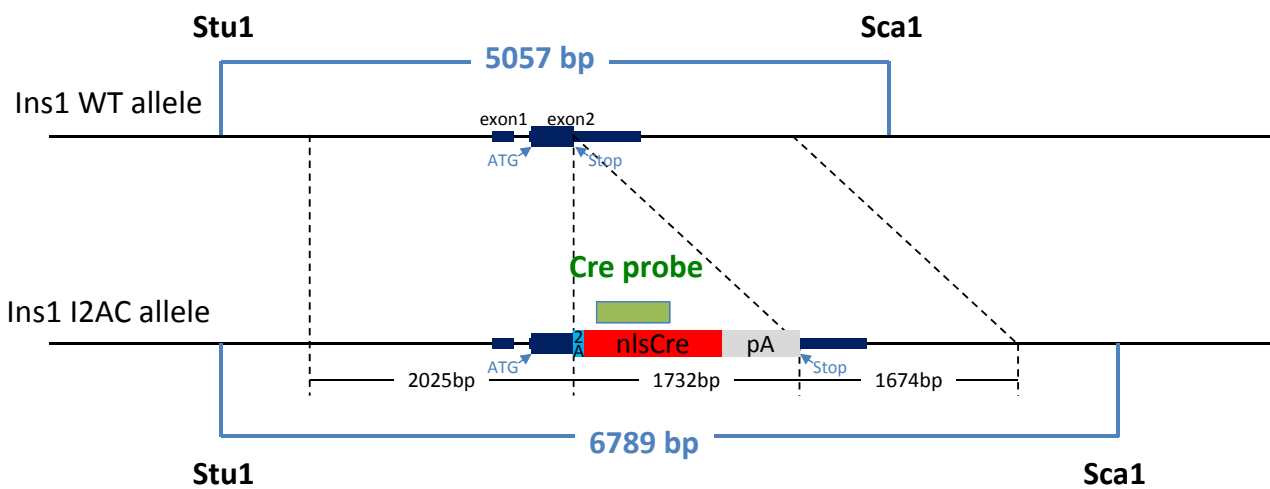
# CRISPR/Cas9によるInsulin1-Cre KIマウスの作製

## Insulin1 遺伝子 (19番染色体)



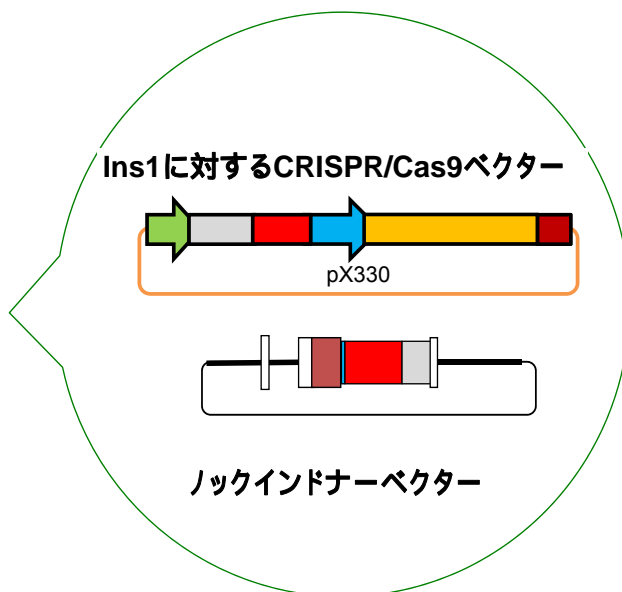
CRISPR ノックインベクター

# CRISPR/Cas9によるInsulin1-Cre KIマウスの作製



	Wt	KI
Cre probe	-	6,789 bp

# CRISPR/Cas9によるInsulin1-Cre KIマウスの作製



受精卵にIns1遺伝子に対する環状のCRISPR ベクターとノックインドナーベクターをインジェクションする

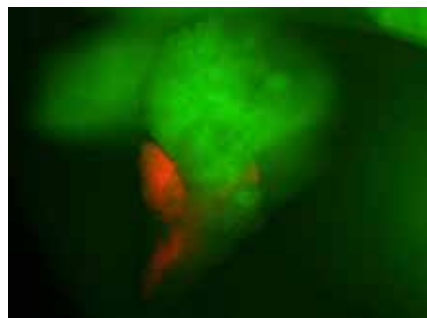
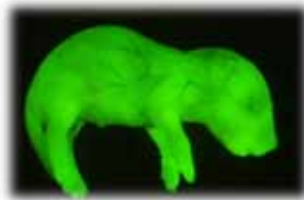
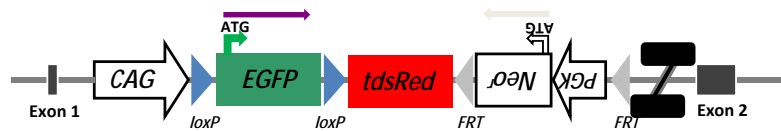
## CRISPR/Cas9によるInsulin1-Cre KIマウスの作製

インジェクション卵数 pX330 (5ng/ $\mu$ l) Donor (10ng/ $\mu$ l)	移植卵数	出生数	ノックインマウス数
373	339	84	5

(Hasegawa Y and Sugiyama F, unpublished.)

# CRISPR/Cas9によるInsulin1-Cre KIマウスの作製

Rosa GRR  
reporter mouse



膵臓β細胞特異的な tdsRedの発現

(Hasegawa Y and Sugiyama F, unpublished.)

## 筑波大学生命科学動物資源センターにおける作製実績

2013年5月から2015年8月まで

CRISPR/Cas9による作製のみ

作製方法	作製数	平均インジェクション数	平均出生数	平均変異個体数
完全欠損	37	246	64	15*
変異導入	25	340	83	5*
ノックイン	29	336	72	5
コンディショナルノックアウト (2段階作製)	22	341	77	2

\* 全ての個体は解析せず

## 現時点のゲノム編集技術による遺伝子改変の問題点

1. ゲノム遺伝子の欠失には非常に効率の良い方法ではあるが、塩基置換や挿入の効率はまだ十分ではなく、目的の変異の導入には多くの受精卵または胚が必要である。
1. 現在使用されているガイドRNAが認識するDNA配列は20塩基であるため、特異性はそれほど高くなく、目的としないゲノム配列にも変異が導入される可能性は否定できない。
1. 全ての細胞で改変が起きない個体(モザイク個体)がしばしば観察される。

## ゲノム編集技術における社会的利点および問題点

1. 基礎研究分野では、既に無くてはならない技術となっている。
1. 農林水産業分野では、動物や植物の品種改良技術として使われる可能性が高い。その場合に、原理的には自然突然変異と区別がつかないが、遺伝子組換え食品として扱わないかは、合意が得られていない。
1. 医療分野では、HIVやβサラセミア(地中海貧血)等の疾患に対して有望な治療法となることが期待されており、今後ヒト体細胞に対する治療法として普及すると考えられる。ベンチャー企業が多く参入しており、患者団体からの期待も大きい。
1. 一方ヒト生殖細胞に対するゲノム編集は、技術的に十分でないとともに、解決すべき多くの倫理的な問題がある。またES細胞開発の時と同様の反応が予想される。