

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15775

研究課題名(和文) 深層生成モデルを用いた万能ゲノム編集遺伝型解析法の開発

研究課題名(英文) Development of a universal genome-editing genotyping method using a deep generation model

研究代表者

久野 朗広 (Kuno, Akihiro)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：60830122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまでCRISPR-Casによるゲノム編集によって生じる「アレル数が不明」であり「意図しない変異」を正確かつ迅速に検出する手法は存在しなかった。そこで本研究では、ゲノム編集による「意図しない変異」と「意図した変異」を一網打尽で検出・分類できるDetermine Allele mutations and Judge Intended genotype by Nanopore sequencer (DAJIN)を開発した。DAJINは点変異・エクソン欠失・flox変異誘導などの複数種のゲノム編集において、従来法を上回る正確性で遺伝型解析が可能であることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

意図した遺伝子改変マウス系統を実験に使用するためには、ゲノム編集を施された受精卵から発生した数十匹のマウスから「意図した改変遺伝子」を持つマウスを遺伝子検査で特定する必要がある。本研究で開発した遺伝子検査法(DAJIN)では、約100匹のマウスのそれぞれでどのような遺伝子改変が生じたのか、網羅的かつ正確に、簡便に特定できる。この手法はゲノム編集実験にかかる期間の短縮やその正確性の向上に寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Although CRISPR-Cas revolutionized the efficiency of genome-editing mice's production, there has been no method to accurately and rapidly detect "unintended mutations" caused by genome editing. In this study, we developed Determine Allele mutations and Judge Intended genotypes by Nanopore sequencer (DAJIN), which can detect and classify "unintended mutations" and "intended mutations" caused by genome editing. DAJIN has demonstrated that it is capable of genotyping multiple types of genome editing, including point mutations, exon deletions, and induction of flox mutations, with greater accuracy than conventional methods.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：バイオインフォマティクス ゲノム編集 実験動物学 CRISPR-Cas

1. 研究開始当初の背景

我々は筑波大学・生命科学動物資源センターにて年間約 150 の遺伝子改変マウス系統を開発しており、そのほとんどがマウス受精卵でのゲノム編集により作出されている。これらの作製を実施していくなかで、ゲノム編集の危険性に気がついた。当初、マウス受精卵ゲノム編集で生じる「意図しない変異」は数十塩基対以下の挿入・欠失のみだと見込まれていたが、最近になり 1,000 塩基対を超える大幅な変異が頻繁に生じることが他グループからの報告によって明らかとなった。また、2 細胞期胚以降で生じたゲノム編集によってモザイク個体も頻出し、このモザイクファウンダー個体では「意図する変異」と「意図しない変異」が交じりあった状態となる。なお、オフターゲット効果とは異なり、「意図しない変異」の危険性は技術的に排除することが難しいことから、オンターゲット領域におけるゲノム編集結果の正確な評価法の確率が喫緊の課題であった。

既存の遺伝型解析手法として電気泳動法、サンガーシーケンシング、次世代シーケンシング (NGS) があるが、既法では前述の「意図しない変異」を捉えることができず、またゲノム編集で生じる大小様々な変異をすべて捉えることは原理的に困難を極めていた。まとめると、ゲノム編集結果の質を保証する唯一の解決手段は正確な遺伝型解析の実行であるが、「アレル数が不明」であり「意図しない変異」を正確かつ迅速に検出する手法は存在しなかった。

2. 研究の目的

本研究では、受精卵ゲノム編集で生まれたファウンダーマウスが保持する「意図しない変異」と「意図した変異」を一網打尽で検出・分類できるツールの開発を目指した。

3. 研究の方法

一塩基変異から大型の構造多型を捉えるため、Nanopore ロングリードシーケンサーを用いた。まず PCR で標的ゲノム領域のおよそ 10kb 以内程度までを増幅した。増幅の過程で各サンプルをラベルする DNA バーコードを付与した。PCR アンプリコンを作成した後、Nanopore ロングリードシーケンサーで配列を読み込んだ。その後 Guppy ベースコーラーによって各サンプルごとの FASTQ ファイルを入手し、これを解析の対象とした。

次に異常検知とアレルの分類を行うために、野生型と意図する変異の配列情報をもとに NanoSim にてシミュレーションリードを作成し、これを教師データとした。教師データのシミュレーションリードを用いて畳み込み深層学習モデルを教育し、教育したモデルに対して解析データを入力した。モデルの最下層にある全結合層からの出力を取り出し、これを局所外れ値因子法を用いて「意図しない変異」を同定した。

各サンプルごとにアレルが何種類あるのか、またそのアレルの種類をテーブルおよび棒グラフの形でレポートした (Fig. 1a,b)。また、分類されたアレルに対してどのゲノム領域にどのような変異が導入されたのかを可視化するため、変異部位を色付け (赤: 挿入塩基、青: 欠失塩基、緑: 置換塩基) したコンセンサス配列をレポートする機能を実装した (Fig. 1c)。ならびに、アレルごとにゲノムブラウザで可視化するための BAM ファイルを出力した (Fig. 1d)。

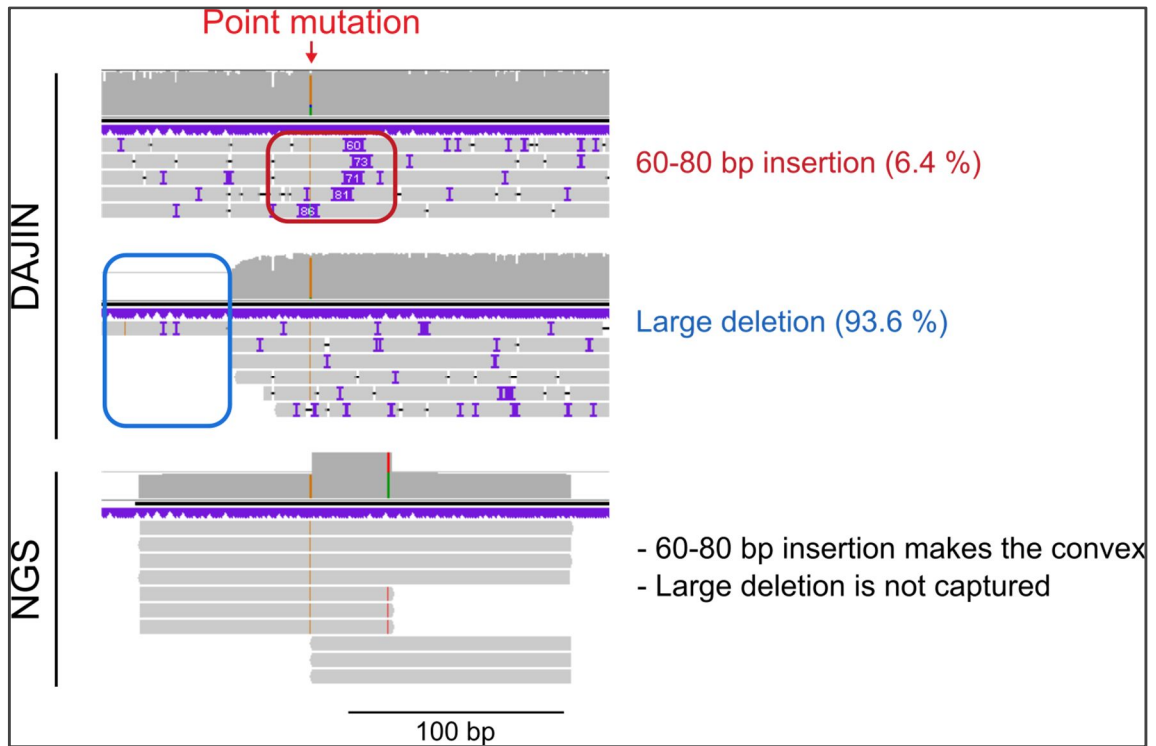


Fig.2: 点変異サンプルにおける DAJIN と NGS の比較

DAJIN はオープンソースソフトウェアとして GitHub 上で公開しており、誰でも無料で利用できる (<https://github.com/akikuno/DAJIN>)。しかしながら、現状はコマンドラインツールとしての使用に限られることや、グラフィックスプロセッシングユニット (GPU) が必要なことからバイオインフォマティクスに精通した研究者がいないと実際の運用は難しいと実感している。DAJIN を今後さらにユーザーが利用しやすいよう開発を進め、ゲノム編集技術にかかわる全研究者が利用可能な形にすることが今後の大きな課題である。最後に、DAJIN は従来の遺伝型解析手法に比べ、拡張性、正確性、解釈性に優れておりゲノム編集結果の質を担保するスタンダードな手法となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuno Akihiro, Ikeda Yoshihisa, Ayabe Shinya, et. al.	4. 巻 20
2. 論文標題 DAJIN enables multiplex genotyping to simultaneously validate intended and unintended target genome editing outcomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pbio.3001507	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久野 朗広
2. 発表標題 DAJIN validates the multiallelic genome-editing outcomes using machine learning-assisted long-read sequencing
3. 学会等名 第10回生命医薬情報学連合大会（IIBMP2021）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------