

筑波大学

博士（医学）学位論文

ロングリードシーケンサーMinION を  
用いたゲノム編集マウス遺伝型  
解析プラットフォームの開発

2022

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

池田 祥久

## 原典論文

この学位論文は以下の論文を原典とする。

\*\*\*\*\*

DAJIN enables multiplex genotyping to simultaneously validate intended and unintended target genome editing outcomes.

Akihiro Kuno<sup>\*</sup>, Yoshihisa Ikeda<sup>\*</sup>, Shinya Ayabe<sup>\*</sup>, Kanako Kato, Kotaro Sakamoto, Sayaka R. Suzuki, Kento Morimoto, Arata Wakimoto, Natsuki Mikami, Miyuki Ishida, Natsumi Iki, Yuko Hamada, Megumi Takemura, Yoko Daitoku, Yoko Tanimoto, Tra Thi Huong Dinh, Kazuya Murata, Michito Hamada, Masafumi Muratani, Atsushi Yoshiki, Fumihiko Sugiyama, Satoru Takahashi, Seiya Mizuno.

PLOS Biology, January 18, 2022; 20(1): e3001507. doi: 10.1371/journal.pbio.3001507

\*: These authors contributed equally to this work

\*\*\*\*\*

原典論文の再利用(Re-use)について

本学位論文では、PLOS Biology, January 18, 2022; 20(1): e3001507.

doi: 10.1371/journal.pbio.3001507 に掲載された論文の内容を、Creative Commons Attribution 4.0 International(CC BY)license にしたがって再利用している。

# 目次

1. 背景.....	6
2. 目的.....	10
3. 方法.....	11
3-1. マウス .....	11
3-2. マウス初期胚のゲノム編集 .....	11
3-3. ナノポアシーケンスのためのライブラリ調製とシーケンス .....	12
3-4. ソフトウェア解析 .....	13
3-5. 従来の遺伝型解析の手法 (PCR、PCR-RFLP、サンガーシーケンス).....	17
3-6. ショートリード NGS .....	18
3-7. TIDER 解析 .....	18
3-8. 免疫染色.....	19
4. 結果.....	20
4-1. ゲノム編集マウス遺伝型解析プラットフォームの考案 .....	20
4-2. ソフトウェア開発 .....	21
4-3. 開発したソフトウェアを用いた検証実験.....	24
4-3-1. flox マウスの遺伝型解析.....	24
4-3-1-1. <i>Cables2</i> flox マウスの遺伝型解析 .....	24
4-3-1-2. <i>Exoc7</i> flox マウスの遺伝型解析 .....	26
4-3-1-3. <i>Usp46</i> flox マウスの遺伝型解析 .....	28

4-3-2. KO マウスの遺伝型解析.....	30
4-3-2-1. <i>Prmd14</i> KO マウスの遺伝型解析.....	30
4-3-2-2. <i>Ddx4</i> KO マウスの遺伝型解析.....	32
4-3-2-3. <i>Stx2</i> KO マウスの遺伝型解析.....	33
4-3-3. PM マウスの遺伝型解析.....	34
5. 考察.....	38
6. 結語.....	44
7. 要約図.....	45
8. 参考文献.....	47
9. 謝辞.....	53
10. 図表.....	54

## 略語表

略語	名称・用語
BC	Barcode
bp	base pair
ds	double strand
Gb	Giga base
gRNA	guide RNA
HDR	Homology-directed repair
Kb	kilo base pair
KO	Knock out
LAR	Large rearrangement
NGS	Next generation sequencing
ONT	Oxford Nanopore Technologie
PM	Point mutation
ss	single strand
UMI	Unique Molecular Identifiers
WT	Wild-type

## 1. 背景

遺伝子改変技術は、細胞や動物の生体内において、特定の遺伝子がどのような機能を有しているかを研究するために利用されており、生命科学や医学の分野においてなくてはならない存在である。細胞や動物の特定の遺伝子を改変する技術として、ES 細胞を介した遺伝子ターゲティング法が長年用いられてきた(1, 2)。遺伝子ターゲティング法は、ES 細胞の標的ゲノム部位(オンターゲットサイト)に、相同組み換えを利用して内在性遺伝子の破壊や外来遺伝子の挿入を誘導する手法である(3, 4, 5, 6)。遺伝子改変が行われた細胞や動物を評価することにより、破壊された遺伝子や挿入された外来遺伝子の機能を明らかにすることが可能である。しかし、この遺伝子改変技術は ES 細胞が必要なため、マウスなどの ES 細胞の樹立が可能な一部の動物種に使用が限定されていた。

近年、遺伝子ターゲティング法に代わる新たな遺伝子改変技術として、CRISPR/Cas などのゲノム編集技術が登場した(7, 8)。ゲノム編集技術は ES 細胞を介さずに特定の遺伝子を改変できることから、あらゆる動物種の遺伝子改変を可能にした(9, 10, 11)。ゲノム編集ではオンターゲットサイトに意図した変異を誘導することができる。現在までに、Cas9 や FokI などのヌクレアーゼと Cas9 に融合したデアミナーゼが、それぞれ DNA 二本鎖切断の導入と塩基編集に使用されている(12, 13, 14)。ゲノム編集による遺伝子改変動物および細胞株の作製は容易となったが、ゲノム編集の根底にある DNA 修復機構は宿主細胞がもつ内因性因子によって制御されている(15)。したがって、意図するゲノム編集変異だけをオンターゲットサイトに誘導することは難しく、逆位・欠損・内因性および外因性の DNA 挿入など、さまざまな意図しないゲノム編集変異も誘導される(16, 17, 18)。つまり、ゲノム編集を施した細胞や動物の集団には、意図する変異アレルや野生型(wild-type、以下 WT)アレルだけでなく、さまざまな意図しない変異アレルも存在する。オンターゲットサイトに誘導される意図しない変異の多くは、数十塩基対 (base pair、以下 bp)の挿入および欠損(insertion and deletion、以下 indel)変異であり(19, 20, 21)、数百 bp 以上の indel 変異が生じるのは非常に

稀だと報告されていた(22, 23, 24)。しかし最近、数千塩基対(kilo base pair、以下 kb)単位の大きな欠損、重複や逆位などの複雑なゲノム構造変化がオンターゲットサイトに生じることが示された(25)。さらに動物初期胚のゲノム編集では、卵割が進んだ発生ステージでもゲノム編集が起こるため、誕生した動物が 3 つ以上の変異アレルを有するモザイク個体であることが少なくない(26)。オンターゲットサイトにおけるゲノム編集結果の正確な評価は、ファウンダー(F0)動物とその子孫の効率的な産出に欠かせない。しかし、これら意図しない変異とモザイク現象は、遺伝型解析を複雑化させ、ゲノム編集結果の正確な評価の障害となりうる。一般的にゲノム編集動物の遺伝型解析は、PCR やサンガーシーケンスなどの解析手法により、ゲノム編集変異配列を決定する。また、3 つ以上の変異アレルを有するモザイク個体の場合、PCR 産物のサブクローニングを行い、各アレルの変異配列を決定する。しかし、PCR 産物のサブクローニングにて各アレルの変異配列を決定することは非常に手間である。また、数百 bp のオンターゲットサイトだけに着目する一般的な手法では、数 kb に及ぶ広範囲のゲノム編集結果を見逃す危険性がある(27, 28)。

ノックアウト(Knock out、以下 KO)マウスは遺伝子機能解析と疾患メカニズム解明に有用である。しかし、多くの遺伝子は胚発生および生命維持に必須なため、それらの KO マウスは致死を示す。この致死を回避するために条件付きノックアウト(conditional KO)戦略が用いられる。この戦略で重要となるモデルが flox マウスである。flox マウスは染色体上から欠損させたい機能的に重要なエクソン(標的エクソンと定義)の上下流のイントロンにそれぞれ LoxP 配列を挿入することにより作出される。flox マウスは Cre リコンビナーゼを発現するドライバーマウスと交配することで、Cre リコンビナーゼが LoxP 配列を認識し、標的エクソンのみを染色体から除去する。この戦略により、Cre リコンビナーゼが発現する細胞でのみ標的遺伝子の機能的不活性化がもたらされるため、致死を回避した in vivo 遺伝子機能評価が可能となる。KO やポイントミューテーション(Point mutation、以下 PM)などの他のモデルと同様に、CRISPR/Cas は flox マウスの作製を容易とした(29, 30, 31, 32, 33)。flox



マウス作製で最も重要なプロセスのひとつは、同一アレル上に 2 つの **LoxP** が挿入された **cis** 型変異アレルを有するマウスを選択することである。**flox** マウスを作製するためのゲノム編集では、意図する変異である **cis** 型変異だけではなく、意図しない変異である **trans** 型変異も誘導される。従来の解析手法では、同一アレル上の 2 箇所に **LoxP** が挿入された **cis** 型変異と、別々のアレル上にそれぞれ 1 つの **LoxP** が挿入された **trans** 型変異を判別することが容易でない(34, 35)。それは、2 つの **LoxP** が標的エクソンを挟む形で数 kb 離れた領域に挿入されるケースが多く、長鎖 1 分子解析が必須なためである。ショートリード次世代シーケンス(**Next Generation Sequencing**、以下 **NGS**)では原理的に **cis/trans** を判別できないため、各個体ごとのサブクローニング等の変に手間のかかる作業が必要であった。この課題は、**flox** アレル特定のための大きな障害となっている。

近年、オックスフォード・ナノポアテクノロジーズ(**Oxford Nanopore Technologies**、以下 **ONT**)社からナノポアシーケンス技術を用いたロングリードシーケンサー、製品名 **MinION** がリリースされ、長鎖 **DNA NGS** 分野に大きな技術革新がもたらされた。**MinION** は 2014 年に初期ユーザーへリリースされた後、2015 年に正式に商品化された(36)。ナノポアシーケンサーは、**DNA** 分子が膜上に配置されたタンパク質微細孔(ナノポア)を通過する際の電流の変化でその塩基情報を決定する。**DNA** 分子そのものから直接塩基配列を決定するため、事実上シーケンスリードの限界長が存在しない。したがって、ナノポアシーケンスは理想的なロングリードシーケンス技術だと言える。ナノポアを含むパーツであるフローセルは日々改良が進められており、開発初期のフローセル\_Ver.R6 のスループット: 約 1 ギガベース (**Giga base**、以下 **Gb**)、平均リード長: 約 1 kb、最大リード長: 約 100 kb、精度: 約 70% に対し、2017 年にリリースされたフローセル\_Ver.R9.4 はスループット: 10~20 Gb、平均リード長: 約 24kb、最大リード長: 約 2,300 kb、精度: 90%以上を達成した(37)。**MinION** は **PacBio** のような従来のロングリードシーケンサーと比較して、非常に小さなデバイスであり、ランニングコストも低いため、多くの施設で容易に導入可能である。更にライブラリ調

製もシンプルで簡易な作業性も特徴の 1 つである。

## 2. 目的

ゲノム編集により作出された F0 マウスの従来の遺伝型解析の手法は、意図しない変異アレルの見逃し・誤った遺伝型の動物の選択・段階的な解析ステップによる作業の煩雑化などの諸問題を抱えている。私はロングリードシーケンスがこれらの課題を克服すると考えた。そこで、低ランニングコストかつ簡易な作業性を特徴とする MinION によるロングリードシーケンス技術を軸とするゲノム編集マウスの新しい遺伝型解析プラットフォームを開発することを目的として本研究を実施した。

### 3. 方法

#### 3-1. マウス

ICR および C57BL/6J マウスは日本チャールス・リバー株式会社から入手した。C57BL/6J-*Tyr<sup>em2Utr</sup>* マウスは、理研バイオリソース研究センターから入手した(#RBRC06459)。マウスは SPF 条件下で室温  $23.5\pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 、および湿度  $52.5\pm 12.5\%$  に維持された部屋で、14 時間の明期: 10 時間の暗期のサイクルでプラスチック製のケージで飼育した。マウスは市販の餌 (MF ダイエット:オリエンタル酵母工業株式会社)とろ過水を与えた。すべての動物実験は、筑波大学動物実験取扱い規程、文部科学省の研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針および実験動物・動物実験に関わる法令やガイドラインに従い実施された。

#### 3-2. マウス初期胚のゲノム編集

PM マウスと KO マウスは、エレクトロポレーション法で作製した(38)。各変異を誘導するための guide RNA(以下、gRNA)標的配列を表 1 に示す。gRNA は、GeneArt Precision gRNA Synthesis Kit(Thermo Fisher Scientific)を使用して合成および精製し、Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific)に溶解した。PM マウスのゲノム編集においては、表 2 に示す 3 つの一本鎖(single strand、以下 ss)DNA ドナーを設計し、点変異を誘導した。これらの ssDNA ドナーは Ultramer DNA オリゴとして、Integrated DNA Technologies にて合成され、Opti-MEM に溶解した。PM マウスのゲノム編集においては、gRNA(5 ng/ $\mu\text{L}$ )と ssDNA(100 ng/ $\mu\text{L}$ )および GeneArt Platinum Cas9ヌクレアーゼ(100 ng/ $\mu\text{L}$ ; Thermo Fisher Scientific)の混合物(以下、gRNA/ssDNA/Cas9 混合物)を調整した。KO マウスのゲノム編集においては、2 つの gRNA(それぞれ 25 ng/ $\mu\text{L}$ )および GeneArt Platinum Cas9ヌクレアーゼ(100 ng/ $\mu\text{L}$ ;

Thermo Fisher Scientific)の混合物(以下、2つの gRNA/Cas9 混合物)を調整した。

雌馬血清ゴナドトロピン PMSG(5 U)とヒト絨毛性ゴナドトロピン hCG (5 U)を 48 時間間隔で C57BL/6J 雌マウスの腹腔内に投与し、過剰排卵を誘導した。次に未受精卵を卵管から採取し、標準的なプロトコルに従って未受精卵と C57BL/6J 雄マウスの精子を用いて体外受精を行った。5 時間後、PM マウスのゲノム編集においては gRNA/ssDNA/Cas9 混合物、KO マウスのゲノム編集においては 2 つの gRNA/Cas9 混合物を使用し、NEPA 21(NepaGene)を用いて、以前に報告された条件(39)でマウス受精卵にエレクトロポレーションした。2 細胞期に発生した胚は偽妊娠 ICR 雌マウスの卵管に移植した。flox マウスは、マイクロインジェクション法で作製した(40)。表 1 に示す各 gRNA 標的配列は、gRNA と Cas9 の両方の発現ユニットを持つ pX330-mC プラスミド(40)のエントリーサイトに挿入した。これらの pX330-mC プラスミドおよび二本鎖(double strand、以下 ds)DNA ドナーは、FastGene プラスミドミニキット(日本ジェネティクス)を使用して精製し、マイクロインジェクション用に MILLEX-GV 0.22  $\mu\text{m}$  フィルターユニット(メルクミリポア)で濾過した。次に、前述の方法を用いて過剰排卵を誘導された C57BL/6J 雌マウスを C57BL/6J 雄マウスと自然交配し、交配した雌マウスの卵管から受精卵を採取した。各遺伝子について、2 つの pX330-mC(各 5 ng/ $\mu\text{L}$ )と dsDNA ドナーDNA(10 ng/ $\mu\text{L}$ )の混合物を受精の前核にマイクロインジェクションした。生存受精卵は偽妊娠した ICR 雌マウスの卵管に移植し、産仔を取得した。産仔が約 3 週齢時に尾をサンプリングし、ゲノム DNA 抽出に使用した。なお、ゲノム編集マウス作製はトランスボーダー研究センターのグループに委託した。

### 3-3. ナノポアシーケンスのためのライブラリ調製とシーケンス

ゲノム DNA 抽出は PI-200(KURABO)を使用し、製造元のプロトコルに従って実行した。

抽出したゲノム DNA を PCR のテンプレートに使用し、KOD multi&Epi(TOYOBO)と表 3 に示すプライマー(ターゲットアンプリコンプライマーと命名)を用いて、オンターゲットサイトのゲノム領域を増幅する 1st PCR を表 4 に示す反応組成液、および反応条件で実施した。得られた PCR 産物を蒸留水で 5 倍希釈したものを Nested PCR のテンプレートに使用し、KOD multi&Epi と表 5 に示すプライマー(バーコードアタッチメントプライマーと命名)を用いて、Nested PCR を表 6 に示す反応組成液、および反応条件で実施した。得られたバーコード付きの Nested PCR 産物を等量混合し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit(日本ジェネティクス)を用いて精製した。精製したバーコード付き混合 PCR 産物を 20~30 ng/ $\mu$ L に調製し、ナノポアシーケンスのためのライブラリ調製に使用した。ライブラリ調製は NEBNext End repair/dA-tailing Module(New EnglandBioLabs)、および Ligation Sequencing 1D キット SQK-LSK108\_109(ONT)を使用し、製造元のプロトコルに従って実行した。調製したシーケンスライブラリは、R9.4 SpotON Flow Cell\_FLO-MIN106(ONT)にロードした。ナノポアシーケンスランは MinKNOW GUI(バージョン 4.0.20)を用いて 24 時間、または 36 時間で実行した。

#### 3-4. ソフトウェア解析

git と conda をインストール済みのパソコンにソフトウェアをダウンロードした(`git clone https://github.com/akikuno/DAJIN.git`)。次に、ソフトウェア解析に必要なディレクトリを作成した。

作成したディレクトリの構成を以下に示す。

```
├── DAJIN
├── input.txt
├── design.fasta
├── fastq
│   ├── barcode01.fastq
│   ├── barcode02.fastq
│   ├── barcode03.fastq
│   └── .....
```

各ディレクトリの詳細を以下に示す。

➤DAJIN

: `git clone` でダウンロードしたディレクトリ。

➤input.txt

以下の形式のテキストファイルを作成。

\*\*\*\*\*

design=DAJIN/example/design.txt

input\_dir=DAJIN/example/demultiplex

control=barcode○

grna=○,○

genome=○

output\_dir=DAJIN\_result

threads=○

filter=on/off

\*\*\*\*\*

Input.txt の各項目について、以下に示す。

- design

: 想定される各アレルタイプの配列を記載した **FASTA** 形式のテキストファイルを作成する。解析を実行するためには、**WT** アレルの配列を記載した **>wt** ファイルと意図する変異アレルの配列を記載した **>target** の 2 つのテキストファイルは必ず作成する。なお、意図しない変異アレルの配列を記載したテキストファイルを加えることができる。

- input\_dir

: **FASTA/FASTQ** ファイルを含むディレクトリを作成する。



- control

: WT コントロールの barcode 番号を記載する。

- grna

: gRNA 配列を記載する。なお、gRNA が 2 つ以上の場合は各配列を,で区切る。

- genome

: 参照ゲノム(mm10, hg38 など)を記載する。

- output\_dir

: 結果を保存するディレクトリの名前を記載する。デフォルトは DAJIN\_results。

- Threads

: 解析に使用する CPU スレッド数を記載する。デフォルトは利用可能な CPU スレッド数の 3 分の 2 を使用。

- filter (on/off)

: フィルターの on/off を記載する。on の場合、マイナーアレル(意図する変異アレルが 1%以下、その他のアレルが 3%以下)を解析結果から除く。デフォルトは on。

なお、design, input\_dir, control, grna の 4 つは必須項目とする。

➤ design.fasta

Multi-FASTA 形式のテキストファイルを作成する。WT アレルの配列である>wt と意図する変異アレルの配列である>target の 2 つは必ず記載する。なお、意図しない変異アレルの配列を加えることができる。

>target

意図する変異アレルの塩基配列情報を記載

>wt

WT アレルの塩基配列情報を記載

>fastq

ナノポアシーケンスランにより取得した生データファイル。1 つのサンプルにつき 1 つの fastq ファイルをディレクトリ内に格納する。

各ディレクトリを作成したのち、ソフトウェア解析を実行した(./DAJIN/DAJIN.sh -i design.txt)。

### 3-5. 従来の遺伝型解析の手法(PCR、PCR-RFLP、サンガーシーケンス)

PM マウスおよび KO マウスの遺伝型解析では、AmpliTaq Gold 360 DNA ポリメラーゼ (Thermo Fisher Scientific)、および表 7 に示すプライマーを使用して PCR を行った。その後、PCR 産物のサイズを確認するためにアガロースゲル電気泳動を行った。flox マウスの遺伝型解析では、PCR 産物を制限酵素で切断し、断片のサイズを確認する手法(以下、PCR-RFLP)を行った。KOD FX(TOYOBO)、および表 7 に示すプライマーを使用して PCR を行い、得られた PCR 産物を制限酵素 *Ascl*(New England Biolabs)と *EcoRV*(New England Biolabs)で 2 時間消化した。その後、断片のサイズを確認するためにアガロースゲル電気泳動を行った。一部の PCR 産物は FastGene Gel/PCR Extraction Kit(日本ジェネティクス)を用いて精製した。その後、PCR 産物を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Thermo Fisher Scientific)で処理し、3500 Genetic Analyzer(Thermo Fisher Scientific)を使用してサン

ガーシーケンス解析を行った。

### 3-6. ショートリード NGS

ゲノム PCR は、AmpliTaq Gold 360 DNA ポリメラーゼ(Thermo Fisher Scientific)と、表 8 に示すバーコード配列が 5'末端に追加されたプライマーを使用して行い、PCR 産物を取得した。取得した PCR 産物は FastGene Gel/PCR Extraction Kit を用いて精製した。これらの精製 PCR 産物を使用して、つくば i-Laboratory LLP において MiSeq(イルミナ)を使用して、ペアエンドシーケンス(2×151 塩基)を行った。ペアエンドリードは、デフォルト設定(41)で STAR(バージョン 2.7.0a)を使用して、マウスゲノムアセンブリ mm10 に対してマッピングした。マッピングされた塩基配列リード情報(以下、リード情報)は、IGV(バージョン 2.9.4)を使用して視覚化した(42)。10%を超える頻度で意図する点変異を有するサンプルをポジティブと判定した。

### 3-7. TIDER 解析

Brikman らの開発した Web ツール(43)を使用し、PM マウスの点変異の有無を確認した。TIDER の Web サイト「TIDER: Easy quantification of template-directed CRISPR/Cas9 editing」(<http://shinyapps.datacurators.nl/tider/>)へアクセスし、①Guide sequence (gRNA 配列情報)、②Control Chromatogram(WT のサンガーシーケンスデータ)、③Reference Chromatogram(PM のサンガーシーケンスデータ)をアップロードし、TIDER のアウトプットを確認した。Homology-directed repair(HDR) positive と判定された個体を PM positive 個体と判断した。

### 3-8. 免疫染色

KO マウスの表現型解析では、マウス精巣の免疫染色を行った。安楽死させたマウスから精巣を摘出し、白膜を除去したあとに 10%中性緩衝ホルムアルデヒド液(ナカライテスク株式会社)にて 4°Cで一晩浸漬固定した。固定した精巣を 70%エタノールに一晩浸漬したのち、パラフィン包埋した。その後、6  $\mu\text{m}$  の厚みになるようにマイクロトームで薄切し、パラフィン切片を作製した。パラフィン切片はキシレン、エタノール、超純水を用いて、脱パラフィン処理を行った。その後、0.25% TritonX-100/PBS 溶液を組織が隠れる程度のせ、室温で 20 分間静置して膜透過処理を行った。PBS で 5 分間×2 回洗浄したのち、Target Retrieval Solution(Dako)の入った染色壺にスライドを移し、オートクレーブで 121°C、10 分間、抗原賦活化処理を行った。その後、PBS で 5 分間×2 回洗浄し、blocking buffer(10% goat serum/0.01% tween-20/0.1%BSA/PBS)で室温、60 分間ブロッキングした。その後、4°Cで一晩、一次抗体液と反応させた。PBS で 5 分間×2 回洗浄したのち、遮光しながら室温で 60 分間、二次抗体と反応させた。その後、PBS で 5 分間×2 回洗浄し、遮光しながら室温で 5 分間、4', 6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)で核を染色した。PBS で洗浄し、prolong gold antifade reagent with DAPI(Thremo Fisher Scientific)で封入した。観察はオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X710(KEYENCE)を使用した。使用した抗体とその希釈条件等は表 9 に示した。

## 4. 結果

### 4-1. ゲノム編集マウスの遺伝型解析プラットフォームの考案

目的を達成するために、図 1 に示す解析プラットフォームを考案した。この解析プラットフォームの実現化のために、次の 2 つの戦略を考えた。

1 つめの戦略(以下、戦略①)は、低ランニングコストかつ簡易な作業性を可能にするための戦略である。共通配列およびバーコード(Barcode、以下 BC)配列の利用により、多数のサンプルをナノポアシーケンス 1 ランで同時に処理する戦略①を考えた。この戦略①により、1 匹の WT コントロールマウスおよび最大 95 匹 /1 系統のゲノム編集マウスが持つ意図する変異と意図しない変異を含む生データを、低ランニングコストかつ簡易な作業で得ることが可能だと考えた。

2 つめの戦略(以下、戦略②)は、正確な遺伝型解析を実行するための戦略である。ナノポアロングリードシーケンサーはシーケンスエラー率が高いことが弱点である。正確な遺伝型解析を実行するためには、シーケンスエラーを補正するツールが必要である。また、戦略①により得られた生データに含まれる、それぞれのゲノム編集マウスが持つ意図する変異と意図しない変異を識別、分類するツールが必要である。これらの理由から、シーケンスエラーの自動補正機能、および意図する変異と意図しない変異を自動で識別、分類する機能を持つ高度な解析ソフトウェアの開発が必要であると考えた。

考案した解析プラットフォームの実現化のためには、戦略②を遂行する解析ソフトウェアの開発が最重要課題であった。ソフトウェア開発のためには、ナノポアシーケンスランや従来手法の遺伝型解析などの **wet** 実験と、ソフトウェアのプログラミングなどの **dry** 実験の両者が必須である。そこで、この学際的研究を遂行するために、**wet** 実験を行うチームと **dry** 実験を行うチームを組んだ。このチームにおいて、私は **wet** 実験を担当した。

## 4-2. ソフトウェア開発

ソフトウェア開発において、まず始めにソフトウェアの仕様を決めるための知見を得ることを目的とした実験(以下、ソフトウェア開発の実験)を行った。ソフトウェア開発の実験の概要を図 2 に示す。ソフトウェアの解析結果を評価するために、実験では変異(意図する変異/意図しない変異)とアレル数が既知のサンプルを用意することにした。まず、既知の **flox** 変異配列を作製するために、プラスミドを使用することにした。**flox** アレルについて、染色体上から欠損させたい機能的に重要なエクソンを標的エクソンと定義し、標的エクソンの上流のイントロンに挿入する **LoxP** を **Left LoxP**、下流のイントロンに挿入する **LoxP** を **Right LoxP** と定義する。この実験では、**Cables2** 遺伝子の第 5 エクソンを標的エクソンとする **flox** アレルとして 6 種類のプラスミドを作製した。

- 1) **Intended flox**: 変異が導入されていない 2 つの **LoxP** が含まれたプラスミド
- 2) **1 bp-Insersion**: **Left LoxP** 内に 1 塩基の挿入変異が導入されたプラスミド
- 3) **1 bp Deletion**: **Right LoxP** 内に 1 塩基の欠損変異が導入されたプラスミド
- 4) **1 bp Left Sub**: **Left LoxP** 内に 1 塩基の置換変異が導入されたプラスミド
- 5) **1 bp Right Sub**: **Right LoxP** 内に 1 塩基の置換変異が導入されたプラスミド
- 6) **2 bp Sub**: **Left LoxP** 内に 1 塩基の置換、**Right LoxP** 内に 1 塩基の置換変異が導入されたプラスミド

なお、既知の意図する変異として、1)のプラスミドを **Intended flox** アレルと定義する。また、既知の意図しない変異として、2)から 6)の **LoxP** 内に任意の変異が導入されたプラスミドを **Mutated flox** アレルと定義する。さらに、それぞれのプラスミド DNA と **C57BL/6J** マウスのゲノム DNA を混ぜ、それぞれの変異アレルと **WT** アレルを有するヘテロ型の既知のサンプルを作製した。作製したそれぞれの既知のヘテロ型のサンプルをテンプレートにした **PCR** を行い、ナノポアシーケンス生データを取得した。また、**WT** のコントロールサンプル

として、C57BL/6J マウスのゲノム DNA をテンプレートにした PCR を行い、同様にナノポアシーケンス生データを取得した。ソフトウェアのプログラムを構築したのち、ナノポアシーケンス生データをソフトウェアで処理し、遺伝型解析を実行した。なお、ソフトウェアのプログラミングは筑波大学 発生学解剖学研究室 久野朗広助教の dry 実験を行うチームが担当した。

解析結果を図 3 に示す。ソフトウェアは意図する変異の **Intended flox** アレルと意図しない変異の **Mutated flox** アレル、および **WT** アレルを自動で識別、分類して報告する。なお **WT** アレルは、1 塩基の変異も含まれないアレルが **Intact WT**、小さな挿入変異や欠損変異(以下、**indel** 変異)を含むアレルが **mutated WT** として分類される。そして、これらすべてに分類されないアレルは **Large rearrangement** (以下、**LAR**)として分類される。大きな挿入変異や欠損変異を含むアレルも **LAR** として分類される。解析の結果、ソフトウェアは期待どおりコントロールを含むすべてのサンプルから **Intact WT** を報告した。一方、**Intended flox** と **Mutated flox** は正確に分類することができず、期待する結果を得ることができなかった。問題点として、次の 3 つの点が挙げられた。1 つめは、**Intended flox** /**WT** のヘテロ型サンプルから、**Intended flox** と **Intact WT** だけでなく、**Mutated flox** も報告された点であった。2 つめは、**Mutated flox** /**WT** のヘテロ型サンプルからは、**Mutated flox** と **Intact WT** だけでなく、**Intended flox** も報告された点であった。3 つめは、1 つのサンプルから 2 種類の **Mutated flox** が報告された点であった。これらの問題点から、ソフトウェアのプログラムの変更が必要であると判断した。ソフトウェアの解析結果の精査により、シーケンスエラーの補正プログラムに課題があることが疑われた。そこで、シーケンスエラーの補正プログラムについて、次の(1)~(3)へ変更することにした。

(1)**WT** コントロールに含まれる変異は、シーケンスエラーによって生じた実際に存在しない変異(以下、**みせかけの変異**)であると考えた。そこで、解析対象のサンプルに含まれる変異から**みせかけの変異**を無視することにより、**真の変異のみ**を抽出するプログラムに変更し

た。

(2)みせかけの変異には、プラス鎖(遺伝子の向きの方にシーケンスが行われた配列と定義)、またはマイナス鎖(遺伝子の向きと逆の方にシーケンスが行われた配列と定義)に極端に偏りがあるものが存在していた。このようなプラス鎖とマイナス鎖のどちらか一方に 95%以上存在するみせかけの変異を偏りのある変異と定義し、偏りのある変異を無視するプログラムに変更した。

(3)みせかけの変異には、特定の箇所において複数の変異がほぼ同じ割合で現れているものが存在していた。このような複数の変異がほぼ同じ割合で現れているみせかけの変異をばらつきの大きい変異と定義し、ばらつきの大きい変異を無視するプログラムに変更した。

次に、シーケンスエラー補正プログラムを変更したソフトウェアを用いて、遺伝型の再解析を実行した。再解析の結果を図 4 に示す。再解析の結果、**Intended flox /WT** のヘテロ型サンプルから、**Intended flox** と **Intact WT** だけが正しく報告された。また、**Mutated flox/WT** のヘテロ型サンプルから、**Mutated flox** と **Intact WT** だけが正しく報告された。さらに、1つのサンプルから 2 種類の **Mutated flox** は報告されず、各サンプルの既知の **Mutated flox** のみが報告された。これらの結果から、シーケンスエラー補正プログラムを変更したソフトウェアが、初回の遺伝型解析の問題点を改善し、**Intended flox** と **Mutated flox** を正確に分類できることが示された。

ソフトウェアは **Intended flox** や **Mutated flox** などの各アレルタイプを報告するだけでなく、各アレルタイプのシーケンス領域の塩基配列(以下、コンセンサス配列)も報告することができる。ソフトウェアが報告したコンセンサス配列では、2)から 6)のサンプルの **LoxP** 内に導入されたそれぞれの任意の変異配列が確認された(図 5)。この結果から、ソフトウェアは意図する変異と意図しない変異を 1 bp の解像度で自動的に識別、分類できることが示された。



遺伝型の再解析の結果により、ソフトウェアの仕様を決定し、シーケンスエラーの自動補正機能、および意図する変異と意図しない変異を自動で識別、分類する機能を持つ解析ソフトウェアが完成したと判断した。

#### 4-3. 開発したソフトウェアを用いた検証実験

前述のソフトウェア開発の実験により、ソフトウェアが完成した。次に、実際にゲノム編集マウスを作製し、完成したソフトウェアを用いてゲノム編集マウスの遺伝型解析を実行する検証実験を行った。この検証実験により、ソフトウェアの遺伝型解析結果の信頼性を確かめることにした。

ゲノム編集マウスの遺伝型解析において、解析するサンプルは変異アレルタイプもアレル数も不明であり、ソフトウェア開発の実験のように既知のサンプルを用いた検証を行うことができない。そこで、従来手法による遺伝型解析結果を真の遺伝型とし、ソフトウェアによる遺伝型解析結果と比較することにより、ソフトウェアの遺伝型解析結果の信頼性を確かめることにした。なお、ソフトウェアの解析対象の汎用性を確認するために、**flox** マウスだけでなく、**KO** マウスと **PM** マウスの遺伝型解析も実行することにした。

##### 4-3-1. **flox** マウスの遺伝型解析

###### 4-3-1-1. **Cables2 flox** マウスの遺伝型解析

まず始めに、**flox** マウスの遺伝型解析を実行した。実際にゲノム編集で作製した **Cables2 flox** マウスを使用してソフトウェアの遺伝型解析結果の信頼性を確かめることにした。

**Cables2** 遺伝子の第 5 エクソンを標的エクソンとし、CRISPR/Cas9 システムによってイントロン 5 と 6 を同時に切断し、ds DNA ドナーを使用した相同組み換えによって 2 つの **LoxP** をノックインするデザインを採用した(図 6)。このデザインのゲノム編集により、**WT(Wild-type)** のアレルと定義)、**Intended flox**(標的エクソンの上流と下流それぞれのイントロンに 1 つずつ **LoxP** を含むアレルと定義)、**Left LoxP**(標的エクソンの上流のイントロンのみに **LoxP** を含むアレルと定義)、**Right LoxP**(標的エクソンの下流のイントロンのみに **LoxP** を含むアレルと定義)、**Inversion**(標的エクソンの反転したアレルと定義)、**Deletion**(標的エクソンの欠損したアレルと定義)の 6 種類のアレルタイプが誘導される可能性がある(図 6)。ソフトウェアは、これらのアレルタイプを自動で識別、分類して報告する。なお **WT** アレルは、1 塩基の変異も含まれないアレルが **Intact WT**、indel 変異を含むアレルが **mutated WT** として分類される。そして、これらすべてに分類されないアレルは **LAR** として分類される。大きな挿入変異や欠損変異を含むアレルも **LAR** として分類される。

ソフトウェアの解析結果を図 7 に示す。20 匹の **F0** マウス(**BC01–BC20**)、およびコントロールとして **WT** マウス(**BC42**)、合計 21 匹の解析を行い、ソフトウェアは 9 匹のマウス(**BC06**、**BC10**、**BC11**、**BC12**、**BC13**、**BC14**、**BC17**、**BC18**、**BC20**)で **Intended flox** が含まれ、11 匹のマウス(**BC01**、**BC05**、**BC06**、**BC09**、**BC11**、**BC12**、**BC13**、**BC17**、**BC18**、**BC19**、**BC20**)で **Deletion** が含まれていることを報告した。ソフトウェアの結果を検証するために、従来の解析手法の 1 つである **PCR-RFLP** を行い、ソフトウェアの結果と比較した。**Ascl** または **EcoRV** 制限酵素認識配列は **LoxP** 配列の近傍に設計されているため、**Ascl** または **EcoRV** による **PCR** 産物の切断を確認することにより、**LoxP** 挿入の有無を推定することができる(図 8)。比較の結果、**PCR-RFLP** とソフトウェアの結果は一致していた(図 7 および図 8)。また、**Deletion** を検出する **PCR** との比較の結果、**PCR** とソフトウェアの結果は一致していた(図 7 および図 9)。さらにソフトウェアが報告した **BC14** のコンセンサス配列は、2 つの **LoxP** を含む **2724 bp** の配列がリファレンス配列どおりであった(図 10)。検証のために

行った **BC14** のサンガーシーケンスにおいて、ソフトウェアのコンセンサス配列に対応して 2 つの **LoxP** がリファレンス配列どおりであることが明らかとなった(図 11)。これらの結果は、ソフトウェアが意図する変異を有する **flox** マウスを正しく特定したことを示している。

次世代においてソフトウェアが報告した変異が遺伝することを確認するために、**Intended flox** を含む **BC11**、**BC12**、**BC13**、**BC14**、**BC18** のマウスを **C57BL/6J** マウスと交配させた(図 12)。**BC14** 由来の 2 匹の **F1** マウスの遺伝型解析において、2 匹ともにヘテロ型 **flox/WT** であることが確認された。さらに、**BC11**、**BC12**、**BC13**、**BC18** 由来の **F1** マウスの遺伝型解析において、ヘテロ型 **flox/WT** の **F1** マウスであることが確認された。これらの結果は、ソフトウェアが報告した変異が次世代へ遺伝したことを示し、ソフトウェアが **F0** マウスの遺伝型を正確に判定したとことを示している。

ソフトウェアは、5 匹のマウス(**BC02**、**BC05**、**BC07**、**BC10**、**BC16**)に **Inversion** が含まれていることを報告した(図 7)。**Inversion** を検証するために、**Inversion** を検出する **PCR** を行った。その結果、ソフトウェアが **Inversion** を含むと報告した 5 匹のマウスから **Inversion** の存在を示すバンドが検出された(図 13)。さらにソフトウェアが報告した **BC02** のコンセンサス配列は、**Inversion** の接合部位において **1 bp** の置換があることを示した。検証のために行ったサンガーシーケンスでも同じ **1 bp** の置換があることが示された(図 14)。これらの結果は、ソフトウェアが **1 bp** 置換を含む **Inversion** のような複雑な変異アレルタイプを正確に判別したことを示している。

#### 4-3-1-2. **Exoc7 flox** マウスの遺伝型解析

ソフトウェアが他の遺伝子座の **flox** マウスの遺伝型解析でも使用できることを確認するために、**Exoc7 flox** マウスを作製し、ソフトウェアの遺伝型解析結果の信頼性を確かめる

ことにした。

*Exoc7 flox* マウスは *Exoc7* 遺伝子の第 8-11 エクソンを標的エクソンとし、CRISPR/Cas9 システムによってイントロン 8 と 12 を同時に切断し、dsDNA ドナーを使用した相同組み換えによって 2 つの *LoxP* をノックインするデザインを採用した(図 15)。

ソフトウェアの解析結果を図 16 に示す。40 匹の F0 マウス(BC01-40)、およびコントロールとして WT マウス(BC41)、合計 41 匹の解析を行い、ソフトウェアは 11 匹のマウス(BC14、BC15、BC16、BC17、BC18、BC20、BC23、BC24、BC27、BC31、BC40)で *Intended flox* が含まれ、7 匹のマウス(BC20、BC23、BC24、BC27、BC31、BC34、BC40)で *Left LoxP*、16 匹のマウス(BC12、BC13、BC14、BC15、BC16、BC17、BC18、BC20、BC24、BC25、BC26、BC27、BC28、BC31、BC37、BC39)で *Right LoxP* が含まれていることを報告した。また、5 匹のマウス(BC09、BC13、BC22、BC32、BC39)で *Deletion* が含まれていることを報告した。ソフトウェアの結果を検証するために、PCR-RFLP と PCR を行い、ソフトウェアの結果と比較した。PCR-RFLP の結果、ソフトウェアによって *Left LoxP* が含まれないことが報告された BC13 と BC32 を除いて、ソフトウェアの結果と一致した(図 16 および図 17)。結果が一致しなかった BC13 および BC32 のリード情報の大部分は *Deletion* であるため(図 16)、*Deletion* に由来する PCR 産物が優位に増幅され、*Left LoxP* に由来する PCR 産物の増幅が抑制される PCR 増幅バイアスにより、*Left LoxP* のリード数が減少した可能性があり、結果としてソフトウェアが *Left LoxP* を報告できなかったと考えられる。*Deletion* を検出する PCR との比較の結果、PCR とソフトウェアの結果は一致していた(図 16 および図 18)。

次世代においてソフトウェアが報告した変異が遺伝することを確認するために、*Intended flox* と *Right LoxP* を含む BC14 マウスを C57BL/6J マウスと交配させた(図 19)。BC14 由来の 11 匹の F1 マウスの遺伝型解析において、5 匹はヘテロ型 *flox/WT* であり、6 匹はヘテロ型 *Right LoxP/WT* であることが確認された。これらの結果は、ソフトウェアが

報告した変異が次世代へ遺伝したことを示し、ソフトウェアが F0 マウスの遺伝型を正確に判定したことを示している。

#### 4-3-1-3. *Usp46 flox* マウスの遺伝型解析

ソフトウェアが他の遺伝子座の *flox* マウスの遺伝型解析でも使用できることをさらに確認するために、*Usp46 flox* マウスを作製し、ソフトウェアの遺伝型解析結果の信頼性を確かめることにした。

*Usp46 flox* マウスは *Usp46* 遺伝子の第 4 エクソンを標的エクソンとし、CRISPR/Cas9 システムによってイントロン 4 と 5 を同時に切断し、ds DNA ドナーを使用した相同組み換えによって 2 つの *LoxP* をノックインするデザインを採用した(図 20)。

ソフトウェアの解析結果を図 21 に示す。34 匹の F0 マウス(BC01-34)、およびコントロールとして WT マウス(BC35)、合計 35 匹の解析を行い、ソフトウェアは 5 匹のマウス(BC04、BC09、BC10、BC11、BC15)で *Intended flox* が含まれ、2 匹のマウス(BC04、BC21)で *Left LoxP*、2 匹のマウス(BC03、BC04)で *Right LoxP* が含まれていることを報告した。また、21 匹のマウス(BC06、BC07、BC09、BC10、BC11、BC12、BC13、BC15、BC16、BC17、BC18、BC19、BC22、BC23、BC27、BC28、BC29、BC30、BC32、BC33、BC34)で *Deletion* が含まれていることを報告した。ソフトウェアの結果を検証するために、PCR-RFLP と PCR を行い、ソフトウェアの結果と比較した。比較において、ソフトウェアと PCR-RFLP の結果が一致しないマウスがみられた(図 21 および図 22)。まず、BC23 と BC33 の PCR-RFLP の結果において、*Left LoxP* および *Right LoxP* が検出され、*flox* マウスの可能性があることを示したが、ソフトウェアは *Intended flox* を報告しなかった。次に、BC13 および BC27 の PCR-RFLP の結果において、*Left LoxP* が検出されたが、ソフトウェアは *Left*

LoxP を報告しなかった。これらのソフトウェアと PCR-RFLP の結果が一致しなかったマウスのリード情報の大部分は Deletion であるため(図 21)、PCR 増幅バイアスが結果の不一致の原因である可能性が考えられる。また、ソフトウェアは BC21 で Left LoxP を報告したが、PCR-RFLP の結果において Left LoxP は検出されなかった。そこで、ゲノム DNA テンプレートの希釈率を調整して再度 PCR-RFLP を行ったところ、Left LoxP バンドが検出され(図 22)、PCR-RFLP とソフトウェアの結果が一致した。Right LoxP と Deletion などの他のアレルタイプにおいては、ソフトウェアと PCR-RFLP、PCR の結果は一致していた(図 21 および図 22、図 23)。また、6 匹のマウス(BC07、BC12、BC17、BC23、BC30、BC33)において PCR は Deletion バンドを検出したが、ソフトウェアはそれらを LAR として報告した。IGV によるリード情報を視覚化した図(以下、可視化図)により、これらの Deletion 接合部位において約 30~200 bp の indel 変異が含まれていることが明らかとなった(図 24)。この結果は、PCR 産物のバンドサイズで判別することが困難なアレルタイプを、ソフトウェアは正確に判別したことを示している。

次世代においてソフトウェアが報告した変異が遺伝することを確認するために、Intended flox および Deletion を含む BC10、BC13 マウスを C57BL/6J マウスと交配させた(図 25)。BC10 および BC13 由来の F1 マウスの遺伝型解析において、ヘテロ型 flox/WT、およびヘテロ型 Deletion/WT であることが確認された。これらの結果は、ソフトウェアが報告した変異が次世代へ遺伝したことを示し、ソフトウェアが F0 マウスの遺伝型を正確に判定したことを示している。さらに、Intended flox、Left LoxP、Right LoxP を含む BC04 マウスを C57BL/6J マウスと交配させた(図 25)。BC04 由来の F1 マウスの遺伝型解析において、ヘテロ型 Left LoxP/WT、およびヘテロ型 Right LoxP/WT であることが確認され、ヘテロ型 flox/WT は確認されなかった。この結果から、BC04 に Intended flox が含まれていなかった可能性を疑った。BC04 に Left LoxP と Right LoxP が含まれていたことから、この 2 つのアレルから PCR リコンビネーションによって実際に存在しない flox(以下、疑似 flox)が産生さ

れたと仮定した。PCR リコンビネーションは、PCR サイクルの伸長段階における不完全なプライマー伸長に起因するとされており、複数の関連する配列がテンプレートとして PCR 反応中に存在する場合、不完全に伸長したプライマーが後続のサイクルで異なるテンプレートにアニーリングすることで起こると考えられている(44)。PCR リコンビネーションによる実際に存在しないアレルが産生される現象を検証するために、ソフトウェア開発の実験で得られた解析結果の再検証を行った。ソフトウェアが報告した LAR を詳細に解析したところ、実際に存在しない Left LoxP と Right LoxP(以下、疑似 LoxP)が含まれていることがわかった。一例として Intended flox#1 の可視化図を示す(図 26)。LAR に含まれる Left LoxP と Right LoxP は、Intended flox と WT の PCR 増幅時に起きた PCR リコンビネーションによって産生された疑似 LoxP であると考えられる。以上のことから、PCR リコンビネーションによる実際に存在しない疑似アレルの産生は起こりうると考えられる。

結論として、ゲノム編集で作製した 3 系統の flox マウスの遺伝型解析を実行する検証実験の結果、ソフトウェアの遺伝型解析結果の信頼性は高いことが示され、ソフトウェアが flox マウスの多様な変異を正確かつ包括的に解析できることが証明された。

## 4-3-2. KO マウスの遺伝型解析

### 4-3-2-1. *Prdm14* KO マウスの遺伝型解析

次に、KO マウスの遺伝型解析を実行した。実際にゲノム編集で作製した *Prdm14* KO マウスを使用してソフトウェアの遺伝型解析結果の信頼性を確かめることにした。CRISPR/Cas9、および CRISPR/Cas12a システムを用いた 2cut 戦略によって *Prdm14* の第 6 エクソンを標的エクソンとして欠損させるデザインを採用した(図 27)。予測される Deletion サイズは 1043bp の長さである。このデザインのゲノム編集により、WT、Deletion(標

的エクソンを欠損したアレルと定義)、**Inversion**(標的エクソンの反転したアレルと定義)の3種類のアレルタイプが誘導される可能性がある(図 27)。ソフトウェアは、これらのアレルタイプを自動で識別、分類して報告する。なお **Deletion** は、**Intended Del**(標的エクソンを欠損し、かつ予測される **Deletion** サイズどおりの欠損を含むアレルと定義)と **Mutated Del**(標的エクソンを欠損し、かつ予測される **Deletion** サイズと±50 bp 程度の違いを含むアレルと定義)として分類される。WT アレルは、1塩基の変異も含まれないアレルが **Intact WT**、indel変異を含むアレルが **mutated WT** として分類される。そして、これらすべてに分類されないアレルは **LAR** として分類される。大きな挿入変異や欠損変異を含むアレルも **LAR** として分類される。

ソフトウェアの解析結果を図 28 に示す。25 匹の F0 マウス(BC01-25)、およびコントロールとして WT マウス(BC26)、合計 26 匹の解析を行い、ソフトウェアは 9 匹(BC10、BC11、BC12、BC13、BC16、BC18、BC20、BC23、BC24)で **Mutated Del** が含まれていることを報告した。ソフトウェアの結果を検証するため、数百 bp のゲノム領域を増幅する PCR を行い、ソフトウェアの結果と比較した。比較において、PCR とソフトウェアの結果は一致していた(図 28 および図 29)。

次に、ソフトウェアが **Mutated Del** を含むことを報告した BC18 と BC23 を検証した。可視化図により、ソフトウェアは **Intended Del** よりも 100~200 bp 大きい欠損を **Deletion** の接合部位に持つ **LAR** を判別したことが示された(図 30)。さらにソフトウェアが報告した **Mutated Del** のコンセンサス配列は、BC18 において **Deletion** の接合部位に 1 bp の欠損があり、BC23 において **Deletion** の接合部位に 7 bp の挿入と 1 bp の置換があることを示した。検証のために行ったサンガーシーケンスでも、BC18 において **Deletion** の接合部位に同じ 1 bp の欠損があり、BC23 において **Deletion** の接合部位に同じ 7 bp の挿入と 1 bp の置換があることが示された(図 31)。これらの結果は、ソフトウェアが 1 bp の解像度で正確にアレルタイプを判別したことを示している。



次に、BC18 および BC23 マウスの表現型を検証した。*Prdm14* 遺伝子の消失は、始原生殖細胞の分化を阻害し、成体の雌および雄のマウスの生殖細胞を完全に枯渇させる(36)。PLZF1(精原細胞マーカー)と Vimentin(セルトリ細胞マーカー)を使用して、精巣切片の免疫染色を行った。その結果、精原細胞は BC18 および BC23 マウスでは検出されなかった(図 32)。この結果から、BC18 および BC23 マウスの *Prdm14* 遺伝子の消失が示された。

#### 4-3-2-2. *Ddx4* KO マウスの遺伝型解析

ソフトウェアが他の遺伝子座および異なる欠損サイズの KO マウスの遺伝型解析でも使用できることを確認するため、*Ddx4* KO マウスを作製し、ソフトウェアの遺伝型解析結果の信頼性を確かめることにした。

*Ddx4* KO マウスでは、CRISPR/Cas9、および CRISPR/Cas12a システムを用いた 2cut 戦略によって *Ddx4* の第 11-15 エクソンを標的エクソンとして欠損させるデザインを採用した(図 33)。

ソフトウェアの解析結果を図 34 に示す。21 匹の F0 マウス(BC27-47)、およびコントロールとして WT マウス(BC48)、合計 22 匹の解析を行い、ソフトウェアは 5 匹(BC27、BC36、BC39、BC44、BC46)で Mutated Del が含まれていることを報告した。ソフトウェアの結果を検証するため、数百 bp のゲノム領域を増幅する PCR を行い、ソフトウェアの結果と比較した。比較において、PCR とソフトウェアの結果は一致していた(図 34 および図 35)。

#### 4-3-2-3. *Stx4* KO マウスの遺伝型解析

ソフトウェアが他の遺伝子座および異なる欠損サイズの KO マウスの遺伝型解析でも使用できることをさらに確認するために、すでに大澤らの論文(45)で報告している *Stx2* KO マウスのゲノム DNA を用いて、ソフトウェアによる詳細解析を行った。

*Stx2* KO マウスでは、CRISPR/Cas9 システムを用いた 2cut 戦略によって *Stx2* の第 5 エクソンを標的エクソンとして欠損させるデザインを採用した(図 36)。

ソフトウェアの解析結果を図 37 に示す。29 匹の F0 マウス(BC01-29)、およびコントロールとして WT マウス(BC30)、合計 30 匹の解析を行い、ソフトウェアは 13 匹(BC01、BC03、BC04、BC05、BC07、BC09、BC14、BC15、BC20、BC21、BC22、BC23、BC24)で Intended Del、Mutated Del が含まれていることを報告した。ソフトウェアの結果を検証するため、数百 bp のゲノム領域を増幅する PCR を行い、ソフトウェアの結果と比較した。比較において、PCR とソフトウェアの結果は一致していた(図 37 および図 38)。

次に、ソフトウェアが Inversion を含むと報告した 3 匹のマウス(BC08、BC16、BC17)を検証した。Inversion を検証するために、Inversion を検出する PCR を行った。その結果、ソフトウェアが Inversion を含むと報告した 3 匹のマウスから Inversion の存在を示すバンドが検出された(図 39)。さらにソフトウェアが報告した BC17 のコンセンサス配列は、Inversion の接合部位に 1 bp の挿入があることを示した。検証のために行ったサンガーシーケンスでも、BC17 において Inversion の接合部位に 1 bp の挿入があることが示された(図 40)。この結果は、ソフトウェアが 1 bp の解像度で正確にアレルタイプを判別したことを示している。

次に、ソフトウェアが 3 つの LAR を含むと報告した BC25 を検証した(図 41)。検証のため、ソフトウェアが報告した欠損領域近傍を増幅する PCR を行った。その結果、3 つの異なるサイズの PCR 産物を検出した(図 42)。BC25 の Deletion の接合部位において、ソフ

トウェアの報告したコンセンサス配列は、LAR アレル 1 に 986 bp の欠損、LAR アレル 2 に 2477 bp の欠失と 1 bp の置換、LAR アレル 3 に 1345 bp の欠損があることを示した。検証のために行ったサンガーシーケンスでも、LAR アレル 1 に 986 bp の欠損、LAR アレル 2 に 2477 bp の欠失と 1 bp の置換、LAR アレル 3 に 1345 bp の欠損があることが示された(図 43)。この結果は、ソフトウェアが 1 bp の解像度で正確にアレルタイプを判別したことを示している。

結論として、ゲノム編集で作製した 3 系統の KO マウスの遺伝型解析を実行する検証実験の結果、ソフトウェアの遺伝型解析結果の信頼性は高いことが示され、ソフトウェアが KO マウスの多様な変異を正確かつ包括的に解析できることが証明された。

#### 4-3-3. PM マウスの遺伝型解析

最後に、PM マウスの遺伝型解析を実行した。実際にゲノム編集で作製した *Tyr*PM マウスを使用してソフトウェアの遺伝型解析結果の信頼性を確かめることにした。CRISPR/Cas9 システムによって *Tyr* の第 1 エクソンを切断し、ssDNA ドナーを使用した相同組み換えによって 1 bp の塩基置換を導入するデザインを採用し、c.140 の G を C に置換した c.140G>C マウス、c.316 の G を C に置換した c.316G>C、c.308 の G を C に置換した c.308G>C マウスの 3 系統を作製した(図 44)。このデザインのゲノム編集により、WT、PM(意図する塩基置換を含むアレルと定義)の 2 種類のアレルタイプが誘導される可能性がある(図 44)。ソフトウェアは、これらのアレルタイプを自動で識別、分類して報告する。なお PM は、Intended PM(意図する塩基置換のみを含むアレルと定義)と Mutated PM(意図する塩基置換とともに indel 変異などの予期しない変異を含むアレルと定義)として分類される。WT アレルは、1 塩基の変異も含まれないアレルが Intact WT、indel 変異を

含むアレルが **mutated WT** として分類される。そして、これらすべてに分類されないアレルは **LAR** として分類される。大きな挿入変異や欠損変異を含むアレルも **LAR** として分類される。

ソフトウェアの解析結果を図 45 に示す。 **Tyr c.140G>C** マウスでは、13 匹の F0 マウス(BC01–BC13)、およびコントロールとして WT マウス(BC32)、合計 14 匹の解析を行い、ソフトウェアは 2 匹のマウス(BC08、BC12)で **Intended PM** が含まれていることを報告した。また、ソフトウェアは **Mutated PM** のコントロールである **C57BL/6J-Tyrem2Utr(BC31)** において、**Tyr c.230G>T** を正しく報告した(図 45 および図 46)。また可視化図により、BC08 および BC12 で **c.140G>C** の意図する塩基置換があることが示された(図 47)。ソフトウェアが報告した BC12 のコンセンサス配列は **c.140G>C** の意図する塩基置換があることを示した。検証のために行ったサンガーシーケンスでも、BC12 において **c.140G>C** の意図する塩基置換があることが示された(図 48)。さらにソフトウェアが報告した BC08 のコンセンサス配列は、**c.140G>C** の意図する塩基置換の 23 bp 下流で予期しない 2 bp 挿入があることを示した。検証のために行ったサンガーシーケンスでも、BC08 において **c.140G>C** の意図する塩基置換の 23 bp 下流で予期しない 2 bp 挿入があることが示された(図 49)。これらの結果は、ソフトウェアが 1 bp の解像度で正確にアレルタイプを判別したことを示している。

**Tyr c.316G>C** マウスでは、6 匹の F0 マウス(BC14-19)、およびコントロールとして WT マウス(BC32)、合計 7 匹の解析を行い、ソフトウェアは 1 匹のマウス(BC18)で **Intended PM** が含まれていることを報告した(図 45)。

**Tyr c.306G>C** マウスでは、11 匹の F0 マウス(BC20-30)、およびコントロールとして WT マウス(BC32)、合計 12 匹の解析を行い、ソフトウェアは 9 匹のマウス(BC20、BC21、BC22、BC23、BC24、BC26、BC27、BC29、BC30)で **Intended PM** が含まれていることを報告した(図 45)。ソフトウェアが報告した BC21 のコンセンサス配列は **c.306G>C** の意図

する塩基置換があることを示した。検証のために行ったサンガーシーケンスでも、BC21において c.306G>C の意図する塩基置換があることが示された(図 50)。この結果は、ソフトウェアが 1 bp の解像度で正確にアレルタイプを判別したことを示している。

ソフトウェアの結果のさらなる検証のため、TIDER 解析を実行し、ソフトウェアの結果と比較した。数百 bp のゲノム領域を増幅する PCR の結果(図 51)、PM が含まれないと判定した 4 匹のマウス(BC2、BC5、BC10、BC25)、および PM のリファレンスデータ(リファレンスクロマトグラフ)として使用する 3 匹のマウス(BC12, 18, 21)を除いた 23 匹のマウスの TIDER 解析を行い、ソフトウェアの結果と比較した。比較の結果、PM Positive/Negative の判定において、ソフトウェアと TIDER の結果は一致した(表 10)。結果の一例として、Tyr c.140G>C の TIDER 解析結果を示す(図 52)。この結果は、ソフトウェアが 1 bp の解像度で正確にアレルタイプを判別したことを示している。

次に、ショートリード NGS を使用して PM マウスの遺伝型解析を実行し、ソフトウェアの結果と比較した。ショートリード NGS は、合計 16 匹のマウス(c.140G>C の BC06、BC08、BC12; c.316G>C の BC14、BC15、BC18; c.306G>C の BC20、BC21、BC22、BC23、BC24、BC25、BC26、BC27、BC29、BC30)で Intended PM を検出した(図 45)。このショートリード NGS の結果は、BC25 を除いてソフトウェアの結果と一致した(BC25 の不一致については後述する)。一方、ショートリード NGS は LAR が含まれるマウスにおいて、遺伝型の誤判定を招く可能性があることが示された。例として、BC20、BC25、BC26 の結果を示す。ソフトウェアは BC20 が複数のアレルタイプを含むモザイク個体であることを報告した。ソフトウェアは BC20 が含むアレルタイプが 2 つの LAR、1 つの Intended PM、1 つの Mutated WT であることを報告した(図 53)。これらのアレルタイプは、サンガーシーケンスを用いた検証によって、4 つすべて存在することが明らかとなった(図 54)。一方、ショートリード NGS は LAR を検出することができないため、Intended PM および Mutated PM のみ検出した(図 53)。さらにソフトウェアは BC20 と同様に、BC26 が複数のアレルタイプを

含むモザイク個体であることを報告した。ソフトウェアは **BC26** が含むアレルタイプが 2 つの **LAR**、1 つの **Intended PM**、1 つの **Mutated WT** であることを報告した(図 55)。一方、ショートリード **NGS** は **LAR** を検出することができないため、**Intended PM** および **Mutated PM** のみ検出した(図 55)。次に、ソフトウェアは **BC25** が含む 2 つのアレルタイプが 2 つの **LAR** であることを報告した。可視化図により、1 つの **LAR** は意図する塩基置換とともに予期しない約 70 bp の挿入があり、もう 1 の **LAR** は大きな欠損があることが示された(図 56)。一方、ショートリード **NGS** は 1 つの **Intended PM** のみ検出した(図 56)。ショートリード **NGS** が検出した **Intended PM** は、実際は意図する塩基置換とともに予期しない約 70 bp の挿入がある **LAR** であり、**LAR** を検出することができないショートリード **NGS** がアレルタイプの誤判定を招いたと考えられる。したがって、前述の **BC25** におけるソフトウェアとショートリード **NGS** の結果の不一致の原因が明らかとなった。これらの結果は、ショートリード **NGS** では検出することができない **LAR** を見逃すことなく検出することができるロングリードシーケンスの利点を示している。

結論として、ゲノム編集で作製した 3 系統の **PM** マウスの遺伝型解析を実行する検証実験の結果、ソフトウェアの遺伝型解析結果の信頼性は高いことが示され、ソフトウェアが **PM** マウスの多様な変異を正確かつ包括的に解析できることが証明された。

## 5. 考察

まず始めに、ゲノム編集マウスを使用してソフトウェアの遺伝型解析結果の信頼性を確かめる検証実験の堅牢性について考察した。この検証実験は、従来手法による遺伝型解析結果を真の遺伝型として、ソフトウェアの遺伝型解析結果と比較している。したがって、従来手法の遺伝型解析結果を真の遺伝型とすることの妥当性を示すことは、この検証実験の堅牢性を保証するために必須である。そこで、従来手法どうしの遺伝型解析結果を比較することにした。比較した結果、**flox** マウスにおいて、**PCR-RFLP** とサンガーシーケンスの結果は一致していた(図 8、図 9、図 11、図 13、図 14)。また **KO** マウスにおいて、**PCR** とサンガーシーケンスの結果は一致していた(図 29、図 31、図 39、図 40、図 42、図 43)。PM マウスにおいて、ショート **NGS** と **TIDER** 解析、およびサンガーシーケンスの結果は一致していた(図 45、図 48、図 49、図 50、図 51、図 52、図 54 および表 10)。以上のことから、従来手法による遺伝型解析結果を真の遺伝型とし、ソフトウェアの遺伝型解析結果の信頼性を確かめることは妥当であり、この検証実験の堅牢性は高いと考えられる。

次に、考案した解析プラットフォーム(以下、本解析プラットフォーム)に搭載するソフトウェアの遺伝型解析結果の信頼性について考察した。本研究において、ゲノム編集により 3 系統の **flox** マウス、3 系統の **KO** マウス、および 3 系統の **PM** マウスを作製し、本解析プラットフォームに搭載するソフトウェアにより **F0** マウスの遺伝型解析を実行した。そして、ソフトウェアの結果と、**PCR**、**PCR-RFLP**、サンガーシーケンス、ショートリード **NGS** など従来の解析手法の結果を比較し、ソフトウェアの遺伝型解析結果の信頼性を確かめた。本解析プラットフォームにより、各 3 系統のすべての **F0** マウスのナノポアシーケンスデータを得ることが可能であった。そしてほとんどの場合、ソフトウェアの遺伝型解析の結果は、従来の解析手法の結果と一致していた。**KO** マウスにおいて、ソフトウェアと **PCR** の

Deletion(Intended Del および Mutated Del)の結果は完全に一致していた(図 28 および図 29、図 34 および図 35、図 37 および図 38)。PM マウスにおいて、ソフトウェアと TIDER 解析の PM の結果は完全に一致していた(図 45 および表 10)。flox マウスにおいて、ほとんどの場合、ソフトウェアは意図する変異である Intended flox を正しく報告した(図 7 および図 8、図 16 および図 17、図 21 および図 22)。ただし、PCR 増幅バイアスによって引き起こされたと考えられる 3 つの偽陰性のサンプルがみられた(PCR 増幅バイアスについては後述する)。以上のことから、ソフトウェアは解析対象の F0 マウスにおいて、PCR 増幅バイアスによって引き起こされる遺伝型の誤判定を除いて、すべての個体の正確な遺伝型解析を示したと考えられる。

次に、本解析プラットフォームの優位性について考察した。本解析プラットフォームの利点として次の 3 つの点が挙げられる。1 つめは、本研究で開発したソフトウェアによる包括的なアレル解析が可能な点である。flox アレルを誘導するゲノム編集を実施した場合、意図する変異である 2 つの LoxP が挿入された Intended flox アレルだけではなく、1 つの LoxP のみ挿入された Left / Right LoxP アレル、Deletion アレル、Inversion アレルなどが誘導される可能性がある。従来解析手法は意図する変異を検出することを目的とした解析手法のみが行われるため、意図する変異以外のアレルタイプを検出するためには、それぞれのアレルタイプ特異的な解析を個別に実施して検出する必要がある。さらに Kb スケールの大規模な欠損は予測が困難であり、数百 bp のゲノム領域を増幅する PCR では見落とされるケースがある。本解析プラットフォームはソフトウェアによる包括的なアレル解析により、1 個体が有する意図する変異および意図しない変異を含む様々なアレルタイプを 1 回の解析でほぼ全て検出、ロングリードシーケンスによるオンターゲットサイトの広範囲な配列同定により見落としの少ない解析が可能である。特にモザイク個体は 3 つ以上の変異アレルを有す



る可能性があり、それぞれのアレルタイプ特異的な解析を個別に実施する従来の解析手法は手間がかかる。本解析プラットフォームは各個体が有するほぼ全てのアレルタイプを 1 回の解析で検出できるため、3 つ以上の変異アレルを有するモザイク個体の特定が容易である。以上のことから、本解析プラットフォームはモザイク個体の解析において強力な解析手法になると考えられる。2 つめは、ロングリードシーケンス技術による正確な遺伝型解析が可能な点である。オンターゲットサイトの数百 bp のゲノム領域を増幅、配列を同定する PCR とサンガーシーケンス、およびショートリード NGS では、オンターゲットサイトに生じる大規模なゲノム編集結果を特定することができないため、ソフトウェアの結果と異なる遺伝型解析の結果を示すサンプルがいくつかみられた。PM マウスにおいて、ソフトウェアはショートリード NGS では検出されなかった LAR を見落とすことなく報告した(図 53、図 54、図 55)。また、ショートリード NGS において、LAR を Intended PM と誤判定したケースがみられた(図 56)。意図しない変異を意図する変異と誤判定することは、系統化の失敗、および誤った実験結果を誘発する要因となりうる。flox マウスおよび KO マウスにおいて、ソフトウェアは意図しない変異である Inversion を見落とすことなく報告した(図 7 および図 13、図 37 および図 39)。以上のことから、本解析プラットフォームは意図する変異だけではなく、ゲノム DNA の大規模欠損に代表される予測が困難な変異、意図しない変異を同時に識別・分類することにより、正しくゲノム編集結果を評価するとともに、正確な遺伝型判定を実行する有用な手法であると考えられる。3 つめは、多検体処理による低ランニングコストかつ簡易な作業性が挙げられる。本解析プラットフォームは、共通配列および BC 配列の利用により、約 100 サンプルをナノポアシーケンス 1 ランで処理する能力があると考えている。実際に本研究において、*Usp46* flox マウスの BC01-35、*Prdm14* KO マウスの BC01-26 および *Ddx4* KO マウスの BC27-35 において、同じ BC を共有し、3 つの異なるマウス系統を含む 83 サンプルのナノポアシーケンスを 1 回のランで実行、解析することが可能であった(図 21、図 28、図 34)。以上のことから、本解析プラットフォームは多検体処理能力に優れており、低ランニングコストかつ簡易な作業性を有していると考えられる。

次に本解析プラットフォームと類似の遺伝型解析プラットフォームとの比較について考察した。本解析プラットフォームと同様に、意図する変異と意図しない変異を自動で識別・分類し、ゲノム編集結果を評価する手法として、**Unique Molecular Identifiers(UMI)**を利用する方法がある(46, 47)。UMI を利用した遺伝型解析の手法は PCR 増幅バイアスを補正し、定量的なアレル解析が可能であることが利点の 1 つであると考えられる。しかし、F0 マウスの選別のような複数のサンプルを同時に処理して解析を実行する場合、すべてのサンプルに PCR 増幅バイアス補正のための UMI を付与するプライマーと、個体識別のための BC を付与するプライマーを用意することは、コストや作業性の点で現実的ではない。UMI を利用した遺伝型解析の手法は、単一サンプル内の各アレルタイプを定量化できるという利点があるが、複数サンプルの包括的なアレル解析には不適切であり、複数の F0 マウスの遺伝型解析の手法として、多検体処理に優れており、低ランニングコストかつ簡易な作業性を有する本解析プラットフォームが適していると考えられる。

次に、本解析プラットフォームの課題について考察した。本解析プラットフォームの現在の課題は、PCR による **Intended flox** 偽陰性の誘導、および疑似 **flox** の産生による遺伝型の誤判定である。PCR は BC 付与とオンターゲットサイトゲノム領域の濃縮を可能にするが、いくつかの問題を引き起こす可能性がある。1 つめは、PCR 産物のサイズの違いによる増幅バイアス、および GC 含量の違いによる増幅バイアスである。長鎖および GC リッチの配列を増幅する場合、PCR の増幅効率が低くなる。GC 増幅バイアスは高品質の DNA ポリメラーゼを使用することにより軽減することが可能であるが、PCR 産物のサイズの違いによる増幅バイアスを軽減することは難しく、ソフトウェアが報告するアレルタイプのパーセンテージの精度に影響を与える。**Exoc7** および **Usp46 flox** において、PCR 産物サイズの小さい **Deletion** が優位に PCR で増幅されたため、PCR 産物サイズの大きい **Intended flox**

の割合が低下し、3つの Intended flox 偽陰性(*Exoc7 flox BC13*、および *Usp46 flox BC23*、*BC33*)が誘導された可能性がある(図 16 および図 21)。2つめは疑似 flox の産生である。本研究において、*Usp46 BC04* に疑似 flox が含まれていることがわかった(図 25)。疑似 flox の含まれるサンプルは除外する必要があるため、疑似 flox が含まれる可能性があるサンプル ID にフラグを立てる機能をソフトウェアに追加した(図 21)。最近開発された手法は、これらの PCR に起因する問題を解決する可能性がある。nCATS は PCR なしでゲノム領域の濃縮を可能にするため、Intended flox 偽陰性の誘導と疑似 flox の産生を回避することが可能である(48)。また IDM-seq は、UMI を使用して PCR 産物を標識するために使用される。これにより PCR 増幅バイアスが補正され、定量的なアレール解析が可能になると考えられる(35)。これらの手法は、単独では多検体処理に不適切であるという課題がある一方、本解析プラットフォームと組み合わせることにより PCR に起因する課題を克服できる可能性がある。

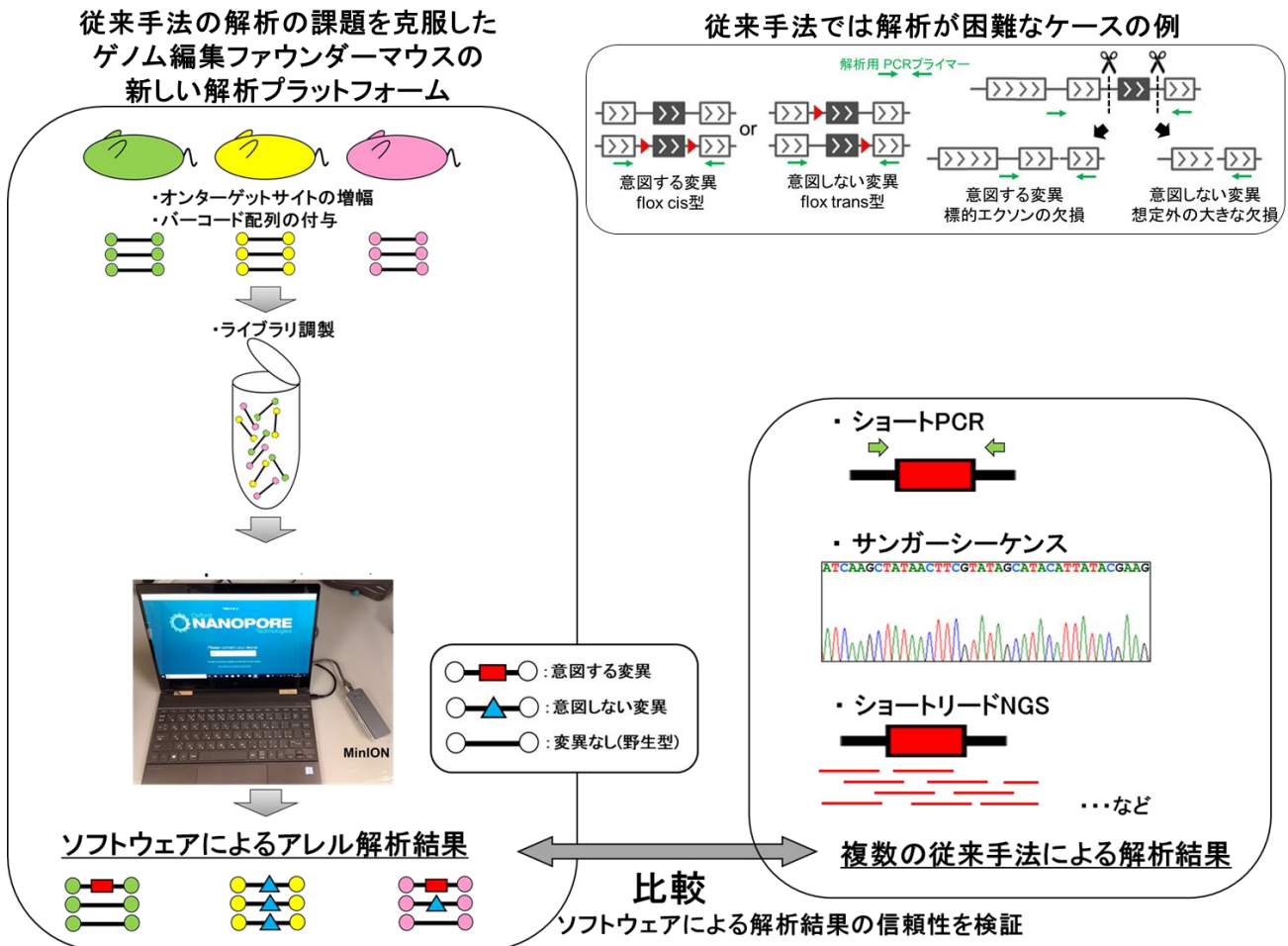
最後に、本解析プラットフォームの展望について考察した。本解析プラットフォームの展望について、2つの点を挙げる。1つめは、本解析プラットフォームのマウス以外の動物への利用拡張である。包括的なアレール解析は、実験用マウスだけでなく、維持費が高い他の実験動物やライフサイクルが長い家畜におけるゲノム編集実験の全体的なコストを削減する可能性がある。本解析プラットフォームは意図する変異と意図しない変異を自動で識別・分類し、包括的なアレール解析が可能であることが特徴の1つである。予測が難しい意図しない変異の見落としは、場合によっては系統化の大きな障害となる。特にライフサイクルの長い家畜での遺伝型の誤判定による系統化の失敗は致命的となる。以上のことから、正確な遺伝型解析を実行する本解析プラットフォームの利用は、維持費が高い実験動物、ライフサイクルが長い家畜のゲノム編集実験の全体的なコスト削減に貢献する可能性がある。また、多検体処理能力に優れる本解析プラットフォームの利用により、複数系統を同時に解析するこ

とを可能とし、さらなる解析ランニングコストの削減と作業効率の改善が期待される。2つめは、ゲノム編集動物の標準的な遺伝型解析手法としての本解析プラットフォームの利用である。本解析プラットフォームで使用する MinION は、PacBio のような従来のロングリードシーケンサーと比較して、安価かつ非常に小さなデバイスであり、ランニングコストも低い。また、ライブラリ調製はシンプルであり、簡易な作業性を有している。以上のことから、MinION を使用する本解析プラットフォームはゲノム編集実験を行う多くのラボで容易に立ち上げることができると考えられ、ゲノム編集動物の標準的な遺伝型解析手法として利用されるかもしれない。また、本解析プラットフォームがゲノム編集マウスを扱う多くのラボで利用されることにより、ゲノム編集結果が正確に評価された信頼性の高い疾患モデルマウスが多く作出されるであろう。そして、信頼性の高い疾患モデル動物の作出は、医学研究の発展に寄与することが期待される。

## 6. 結語

本研究において開発したソフトウェアが、ゲノム編集マウスの遺伝型解析において従来手法の課題を克服し、信頼性の高い遺伝型解析を実行することが示された。開発したソフトウェアを **DAJIN(Determine Allele mutations and Judge Intended genotype by Nanopore sequencer)**と命名し、解析プラットフォームに搭載した。DAJIN を搭載することにより、ゲノム編集マウスの新しい遺伝型解析プラットフォームの開発に成功したと結論づけた。

## 7. 要約図



ゲノム編集ファウンダーマウスにおける従来手法による解析の課題を克服した、MinIONによるロングリードシーケンス技術を軸とする新しい遺伝型解析プラットフォームを開発することを目的として、本研究を実施した。

解析プラットフォームの実現化のために、ゲノム編集マウスが持つ意図する変異と意図しない変異の両方のアレルタイプを、自動で識別・分類する機能を持つ高度な解析ソフトウェアの開発が必要であると考えた。そこでまず始めに、ソフトウェアの仕様を決めるための実験を行った。実験結果から仕様を決定し、ソフトウェアを開発した。

次に、開発したソフトウェアを用いてゲノム編集マウスの遺伝型解析を実行する検証実験を行った。従来手法による解析結果を真の遺伝型とし、ソフトウェアによる解析結果と比較することにより、ソフトウェアの遺伝型解析結果の信頼性を確かめた。この検証実験において、開発したソフトウェアがゲノム編集マウスの遺伝型解析において信頼性の高い遺伝型

解析を実行することが示された。

開発したソフトウェアを **DAJIN** と命名し、解析プラットフォームに搭載した。**DAJIN** を搭載することにより、ゲノム編集マウスの新しい遺伝型解析プラットフォームの開発に成功した。

## 8. 参考文献

1. Meehan, T.F., Conte, N., West, D.B., Jacobsen, J.O., Mason, J., Warren, J., Chen, C-K, Tudose, I., Relac1, M., Matthews, P. et al. (2017) The Disease model discovery from 3,328 gene knockouts by The International Mouse Phenotyping Consortium. *Nat Genet*, 49, 8, 1231-1238
2. Birling, M-C., Yoshiki, A., Adams, D.J., Ayabe, S., Beaudet, A.L., Bottomley, J., Bradley, A., Brown S.DM., Bürger, A., Bushell, W. et al. (2021) Brendan Doe3, Leah Rae Donahue10, A resource of targeted mutant mouse lines for 5,061 genes. *Nat Genet*, 53, 4, 416-419
3. Capecchi, M.R. (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 16, 244, 4910, 1288-92
4. Capecchi, M.R. (1989) The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet*, 5, 3, 70-6
5. Koller, B.H., Marrack, P., Kappler, J.W., Smithies, O. (1990) Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. *Science*, 8, 248, 4960, 1227-30
6. Zijlstra, M., Bix, M., Simister, N.E., Loring, J.M., Raulet, D.H., Jaenisch, R. (1990) Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature*, 19, 344, 6268, 742-6
7. Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X, Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Sciencd*, 15, 339, 6121, 819-23
8. Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F. and Jaenisch, R. (2013) One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 9, 153, 4, 910-8
9. Loubalova, Z., Fulka, H., Horvat, F., Pasulka, J., Malik, R., Hirose, M., Ogura, A., Svoboda P. (2021) Formation of spermatogonia and fertile oocytes in golden hamsters requires piRNAs. *Nat Cell Biol*, ,



10. Tanihara, F., Takemoto, T., Kitagawa, E., Rao, S., Do, L.T., Onishi, A., Yamashita, Y., Kosugi, C., Suzuki, H., Sembon, S. (2016) Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs. *Sci. Adv*, 2, 9, e1600803
11. Tsukiyama, T., Kobayashi, K., Nakaya, M., Iwatani, C., Seita, Y., Tsuchiya, H., Matsushita, J., Kitajima, K., Kawamoto, I., Nakagawa, T. et al. (2019) Monkeys mutant for PKD1 recapitulate human autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Commun*, 11,10, 1, 5517
12. Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F. (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186, 757-761.
13. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337, 816-821.
14. Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A. and Liu, D.R. (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533, 420-424. 4.
15. Yeh, C.D., Richardson, C.D. and Corn, J.E. (2019) Advances in genome editing through control of DNA repair pathways. *Nat Cell Biol*, 21, 1468-1478.
16. Hendel, A., Kildebeck, E.J., Fine, E.J., Clark, J., Punjya, N., Sebastiano, V., Bao, G. and Porteus, M.H. (2014) Quantifying genome-editing outcomes at endogenous loci with SMRT sequencing. *Cell Rep*, 7, 293-305.
17. Kraft, K., Geuer, S., Will, A.J., Chan, W.L., Paliou, C., Borschiwer, M., Harabula, I., Wittler, L., Franke, M., Ibrahim, D.M. et al. (2015) Deletions, Inversions, Duplications: Engineering of structural variations using CRISPR/Cas in Mice. *Cell Rep*, 10, 833-839.

18. Boroviak, K., Fu, B., Yang, F., Doe, B. and Bradley, A. (2017) Revealing hidden complexities of genomic rearrangements generated with Cas9. *Sci Rep*, 7, 12867.
19. Koike-Yusa, H., Li, Y., Tan, E-P., Velasco-Herrera, M.D.C. and Yusa, K. (2014) Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol*, 32, 3.
20. Overbeek, M., Capurso, D., Carter, M.M., Thompson, M.S., Frias, E., Russ, C., Reece-Hoyes, J.S., Nye, C., Gradia, S., Vidal, B. et al. (2016) DNA Repair Profiling Reveals Nonrandom Outcomes at Cas9-Mediated Breaks. *Molecular Cell*, 63, 633–646.
21. Tan, E-P., Li, Y., Velasco-Herrera, M.D.C., Yusa, K. and Bradley, A. (2015) Off-Target Assessment of CRISPR-Cas9 Guiding RNAs in Human iPS and Mouse ES Cells. *Genesis*, 53, 225–236.
22. Hendel, A., Bak, R.O., Clark, J.T., Kennedy, A.B., Ryan, D.E., Roy, S., Steinfeld, I., Lunstad, B.D., Kaiser, R.j., Wilkens, A.B. et al. (2015) Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat Biotechnol*, 33, 9.
23. Ghezraoui, H., Piganeau, M., Renouf, B., Renaud, J-B., Sallmyr, A., Ruis, B., Oh, S., Tomkinson, A.E., Hendrickson, E.A., Giovannangeli, C., Jasin, M. and Brunet, E. (2014) Chromosomal Translocations in Human Cells Are Generated by Canonical Nonhomologous End-Joining. *Molecular Cell*, 55, 829–842.
24. Weinstock, D.M., Elliott, B. and Jasin, M. (2006) A model of oncogenic rearrangements: differences between chromosomal translocation mechanisms and simple double-strand break repair. *Blood*, 15, 107, 2.
25. Kosicki, M., Tomberg, K. and Bradley, A. (2018) Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol*, 36, 765-771.
26. Mizuno, S., Dinh, T.T., Kato, K., Mizuno-Iijima, S., Tanimoto, Y., Daitoku, Y., Hoshino, Y., Ikawa, M.,

- Takahashi, S., Sugiyama, F. et al. (2014) Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system. *Mamm Genome*, 25, 327-334.
27. Simeonov, D.R., Brandt, A.J., Chan, A.Y., Cortez, J.T., Li, Z., Woo, J.M., Lee, Y., Carvalho, C.M.B., Indart, A.C., Roth, T.L. et al. (2019) A large CRISPR-induced bystander mutation causes immune dysregulation. *Commun Biol*, 2, 70.
  28. Brinkman, E.K., Chen, T., Amendola, M. and van Steensel, B. (2014) Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res*, 42, e168.
  29. Horii, T., Morita, S., Kimura, M., Terawaki, N., Shibutani, M. and Hatada, I. (2017) Efficient generation of conditional knockout mice via sequential introduction of lox sites. *Sci Rep*, 7, 7891.
  30. Gurumurthy, C.B., O'Brien, A. R., Quadros, R.M., Adams Jr, J., Alcaide, P., Ayabe, S., Ballard, J., Batra, A.K., Beauchamp, M-C., Becker, K.A. et al. (2019) Reproducibility of CRISPR-Cas9 methods for generation of conditional mouse alleles: a multi-center evaluation. *Genome Biol*, 20, 171.
  31. Miyasaka, Y., Uno, Y., Yoshimi, K., Kunihiro, Y., Yoshimura, T., Tanaka, T., Ishikubo, H., Hiraoka, Y., Takemoto, N., Tanaka, T. et al. (2018) CLICK: one-step generation of conditional knockout mice. *BMC Genomics*. 19, 318.
  32. Quadros, R.M., Miura, H., Harms, D.W., Akatsuka, H., Sato, T., Aida, T., Redder, R., Richardson, R.G., Inagaki, Y., Sakai, D. et al. (2017) Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins. *Genome Biol*, 18, 92.
  33. Nishizono, H., Hayano, Y., Nakahata, Y., Ishigaki, Y. and Yasuda, R. (2021) Rapid generation of conditional knockout mice using the CRISPR-Cas9 system and electroporation for neuroscience research. *Mol Brain*, 14, 148.
  34. Birling, M.C., Schaeffer, L., Andre, P., Lindner, L., Marechal, D., Ayadi, A., Sorg, T., Pavlovic, G. and

- Herault, Y. (2017) Efficient and rapid generation of large genomic variants in rats and mice using CRISMERE. *Sci Rep*, 7, 43331.
35. Lanza, D.G., Gaspero, A., Lorenzo, I., Liao, L., Zheng, P., Wang, Y., Deng, Y., Cheng, C., Zhang, C., Seavitt, J.R. et al. (2018) Comparative analysis of single-stranded DNA donors to generate conditional null mouse alleles. *BMC Biol*, 16, 69.
  36. Jain, M., Olsen, H.E., Paten, B. and Akeson, M. (2016) The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol*, 17, 239.
  37. Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, T. and Au K.F. (2021) Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol*, 39, 1348–1365.
  38. Kaneko, T. and Mashimo, T. (2015) Simple Genome Editing of Rodent Intact Embryos by Electroporation. *PLoS One*, 10, e0142755.
  39. Sato, Y., Tsukaguchi, H., Morita, H., Higasa, K., Tran, M.T.N., Hamada, M., Usui, T., Morito, N., Horita, S., Hayashi, T. et al. (2018) A mutation in transcription factor MAFB causes Focal Segmental Glomerulosclerosis with Duane Retraction Syndrome. *Kidney Int*, 94, 396-407.
  40. Mizuno-Iijima, S., Ayabe, S., Kato, K., Matoba, S., Ikeda, Y., Dinh, T.T.H., Le, H.T., Suzuki, H., Nakashima, K., Hasegawa, Y. et al. (2021) Efficient production of large deletion and gene fragment knock-in mice mediated by genome editing with Cas9-mouse Cdt1 in mouse zygotes. *Methods*, 191, 23-31.
  41. Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, R.T. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29,15-21.
  42. Robinson, J.T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G. and Mesirov, J.P. (2011) Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*, 29, 24-26.
  43. Brinkman, E.K., Kousholt, A.N., Harmsen, T., Leemans, C., Chen, T., Jonkers, J. and Steensel, B.

- (2018) Easy quantification of template-directed CRISPR/Cas9 editing. *Nucleic Acids Research*, 46,10, e58.
44. Judo, M.S.B., Wedel, A.B. and Wilson, C. (1998) Stimulation and suppression of PCR-mediated recombination. *Nucleic Acids Res.* 26:1819–1825.
45. Osawa, Y., Murata, K., Usui, M., Kuba, Y., Le, H.T., Mikami, N., Nakagawa, T., Daitoku, Y., Kato, K., Shawki, H.H. et al. (2020) EXOC1 plays an integral role in spermatogonia pseudopod elongation and spermatocyte stable syncytium formation in mice. *Elife*,10, e59759.
46. Bi, C., Wang, L., Yuan, B., Zhou, X., Li, Y., Wang, S., Pang, Y., Gao, X., Huang, Y. and Li, M. (2020) Long-read individual-molecule sequencing reveals CRISPR-induced genetic heterogeneity in human ESCs. *Genome Biol*, 21, 213.
47. Karst, S.M., Ziels, R.M., Kirkegaard, R.H., Sorensen, E.A., McDonald, D., Zhu, Q., Knight, R. and Albertsen, M. (2021) High-accuracy long-read amplicon sequences using unique molecular identifiers with Nanopore or PacBio sequencing. *Nature Methods*, 18, 165-169 .
48. Gilpatrick, T., Lee, I., Graham, J.E., Raimondeau, E., Bowen, R., Heron, A., Downs, B., Sukumar, S., Sedlazeck, F.J. and Timp, W. (2020) Targeted nanopore sequencing with Cas9-guided adapter ligation. *Nat Biotechnol*, 38, 433-438.

## 9. 謝辞

本論文の作成にあたり、終始適切な助言を賜り、丁寧にご指導いただきました杉山文博教授、水野聖哉准教授、村田知弥助教に感謝申し上げます。

解析ソフトウェアの開発において、多大なるご支援をいただきました久野朗広助教、筑波大学ヒューマンバイオロジー学位プログラム 坂本航太郎さん、鈴木沙耶香さんに心より感謝致します。

投稿論文作成にあたり、細部に渡るご指導、ご助言をいただきました筑波大学解剖学発生学研究室 高橋智先生、理化学研究所バイオリソース研究センター実験動物開発室 吉木淳先生、綾部信哉先生に感謝申し上げます。

遺伝子改変動物の作製において、ご支援をいただきましたトランスボーダー医学研究センターのスタッフのみなさまに感謝致します。

最後に、所属する実験動物学研究室のみなさまには日常の議論を通じて多くの知識や示唆をいただきました。お礼申し上げます。

ありがとうございました。

10. 図表

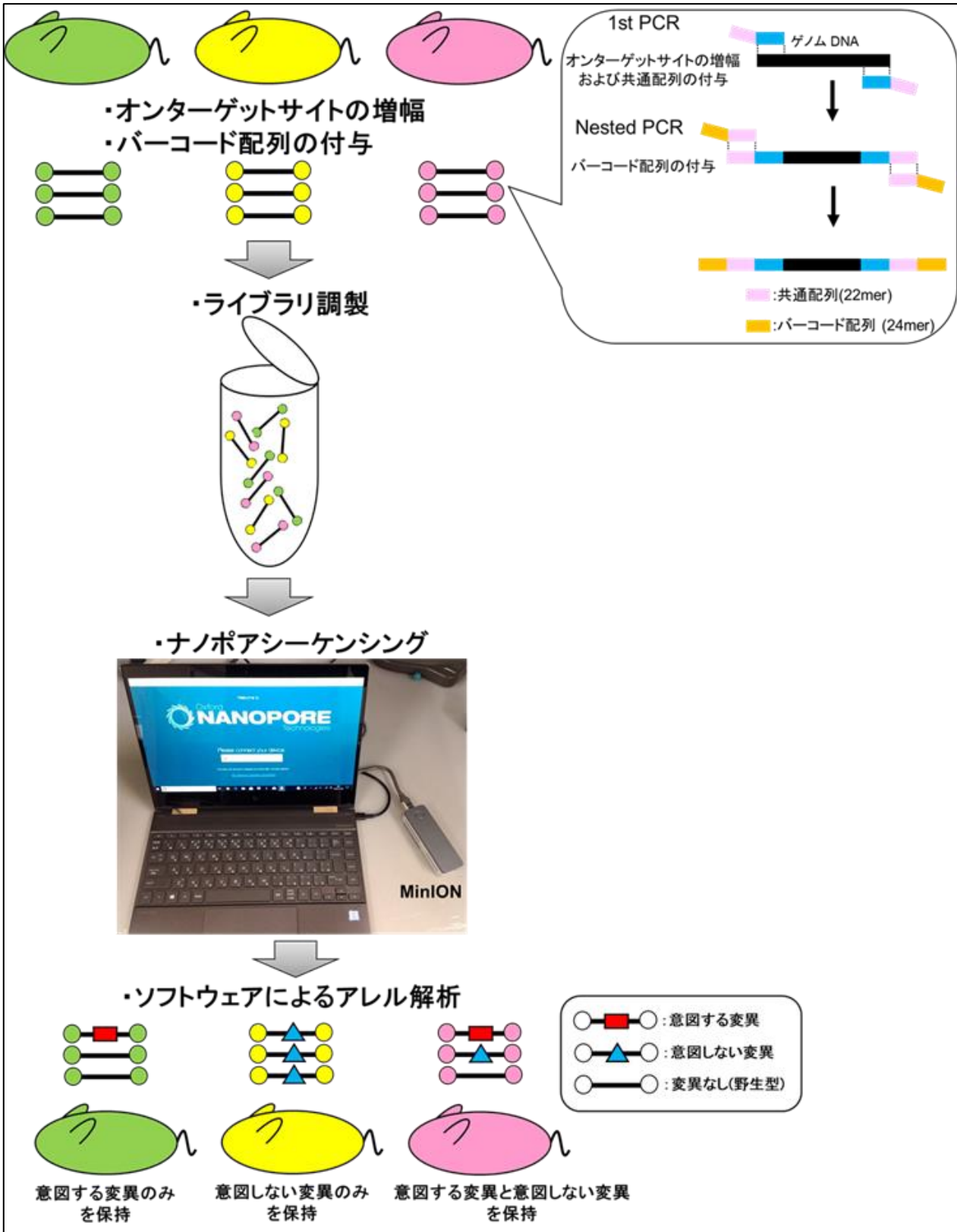


図 1. 考案した解析プラットフォームの概要図

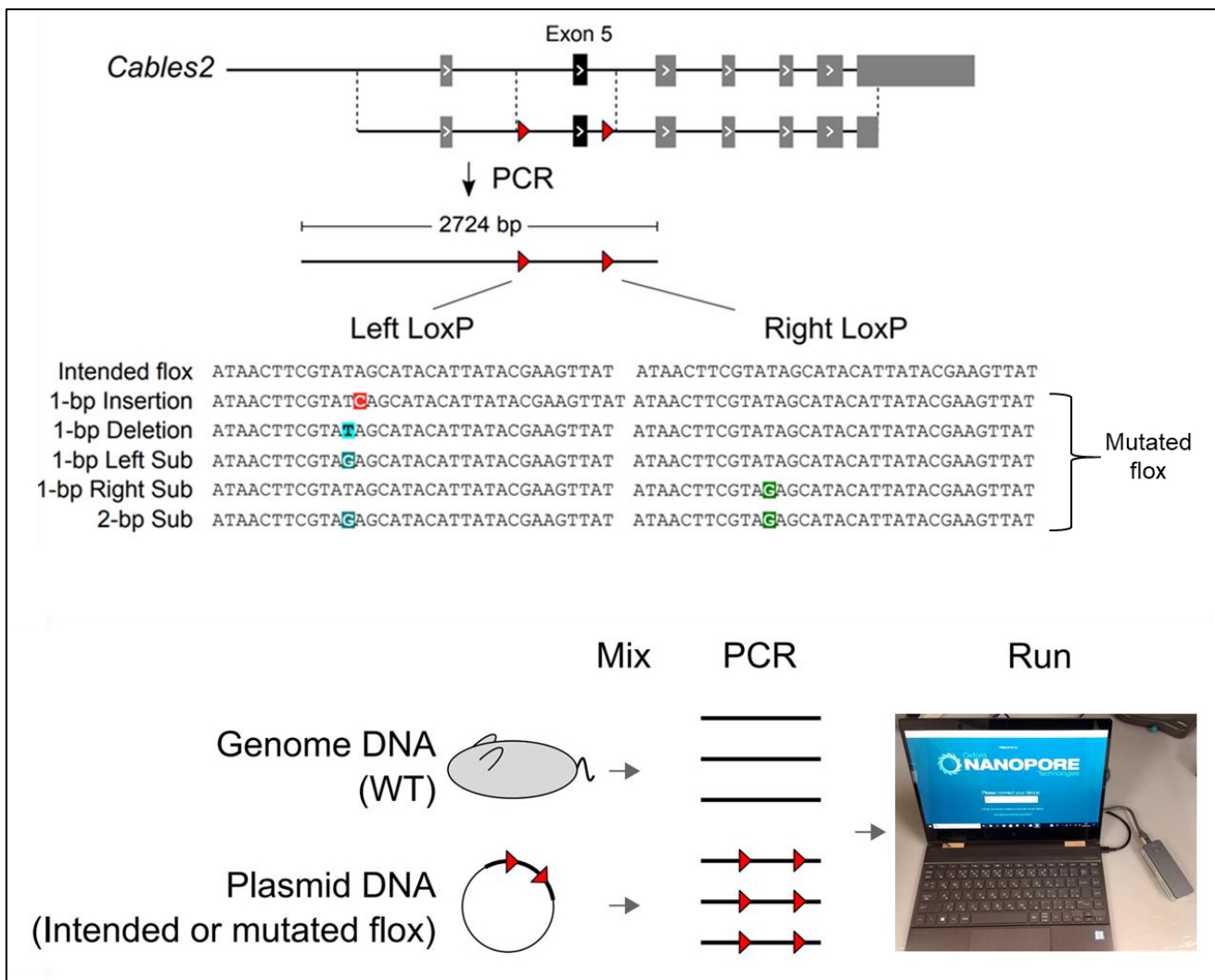


図 2. ソフトウェア開発の実験の概要図

赤の三角は LoxP を示す。

塩基配列は以下の LoxP 配列を持つ 6 種類のプラスミドを示す。

- 1) Intended flox: 変異が導入されていない 2 つの LoxP が含まれたプラスミド
- 2) 1 bp-Insertion: Left LoxP 内に 1 塩基の挿入変異が導入されたプラスミド
- 3) 1 bp Deletion: Left LoxP 内に 1 塩基の欠損変異が導入されたプラスミド
- 4) 1 bp Left Sub: Left LoxP 内に 1 塩基の置換変異が導入されたプラスミド
- 5) 1 bp Right Sub: Right LoxP 内に 1 塩基の置換変異が導入されたプラスミド
- 6) 2 bp Sub: Left LoxP 内に 1 塩基の置換、Right LoxP 内に 1 塩基の置換変異が導入されたプラスミド



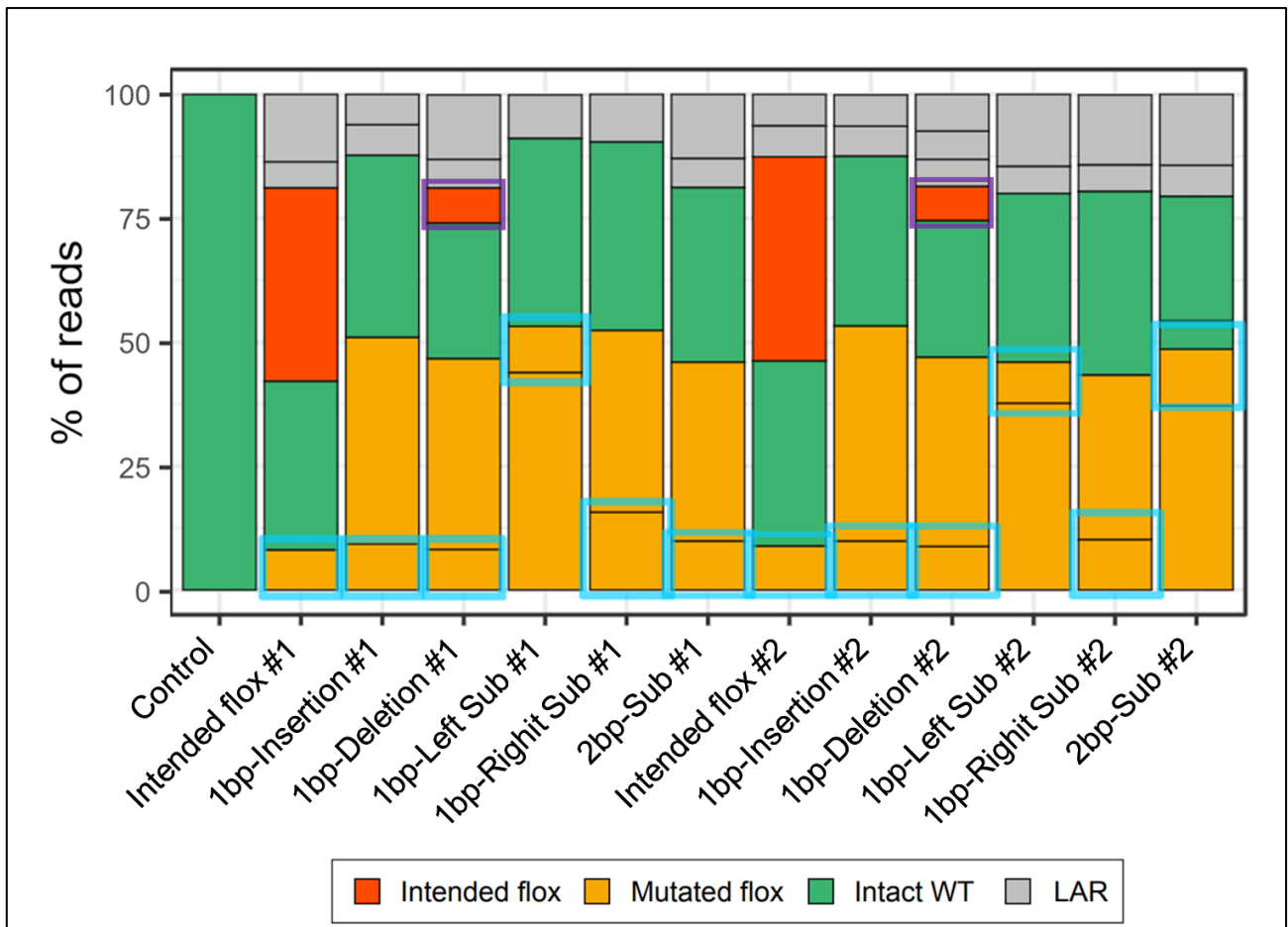


図 3. ソフトウェア開発の実験におけるソフトウェアの初回の解析結果  
(アレルパーセンテージ)

X 軸はサンプルに含まれるプラスミドを示す。実験は  $n=2$ (#1、#2)で実施した。Y 軸はソフトウェアによって報告された各アレルのパーセンテージを示す。Control は WT コントロールを示す。バーの色はソフトウェアが報告した各アレルタイプを示す。紫の枠はソフトウェアが誤って報告した実際に存在しない Intended flox を示す。水色の枠はソフトウェアが誤って報告した実際に存在しない Mutated flox を示す。

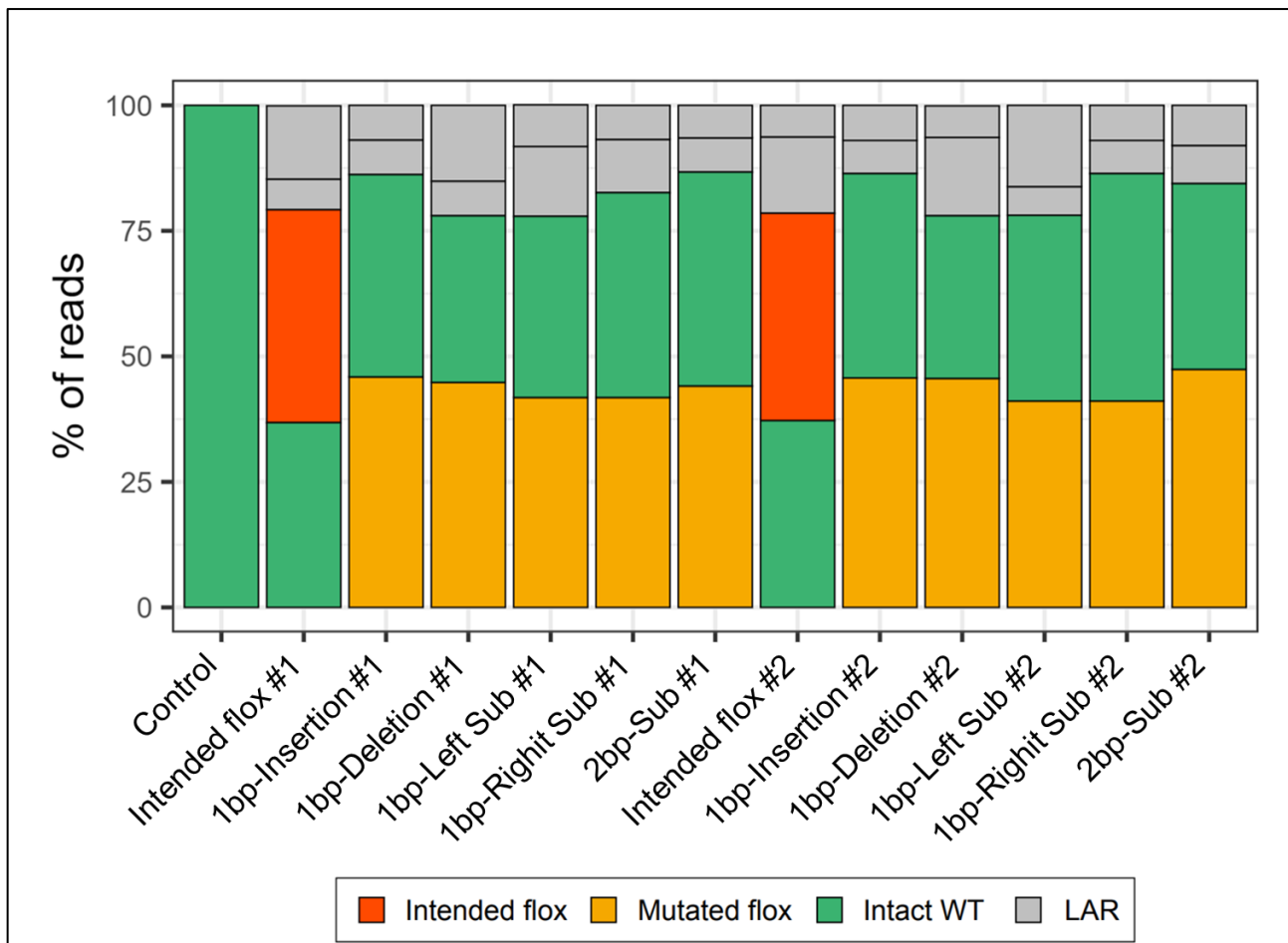


図 4. ソフトウェア開発の実験におけるシーケンス補正プログラム変更後のソフトウェアの再解析結果(アレルパーセンテージ)

X 軸はサンプルに含まれるプラスミドを示す。実験は n=2(#1、#2)で実施した。Y 軸はソフトウェアによって報告された各アレルのパーセンテージを示す。Control は WT コントロールを示す。バーの色はソフトウェアが報告した各アレルタイプを示す。

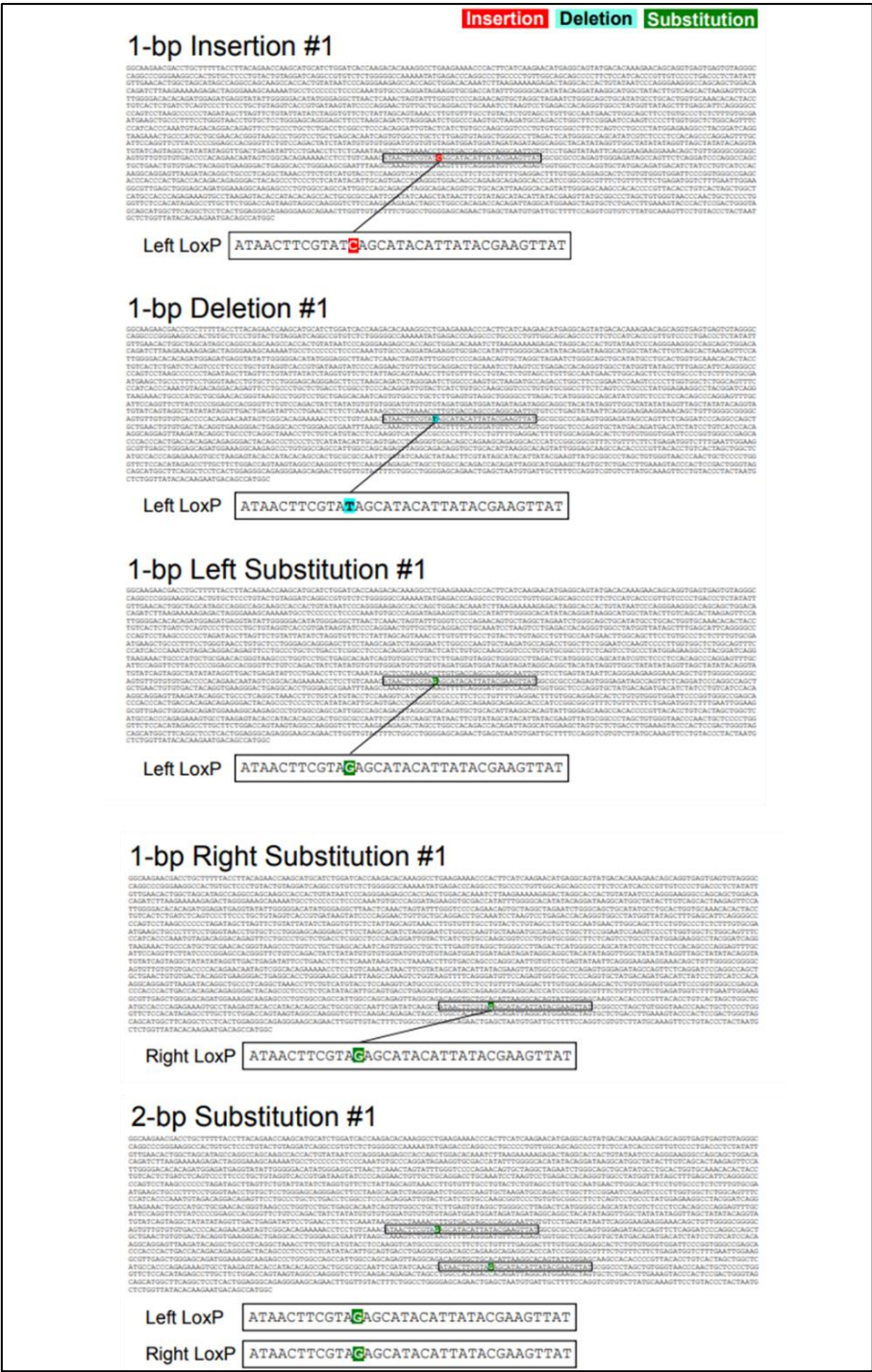


図 5. ソフトウェア開発の実験におけるソフトウェアの解析結果(コンセンサス配列)

各サンプルにおいてソフトウェアが報告したコンセンサス配列を示す。塩基の色は挿入(赤)、欠損(スカイブルー)、置換(緑)などの変異のタイプを示す。黒枠の配列は LoxP を示す。

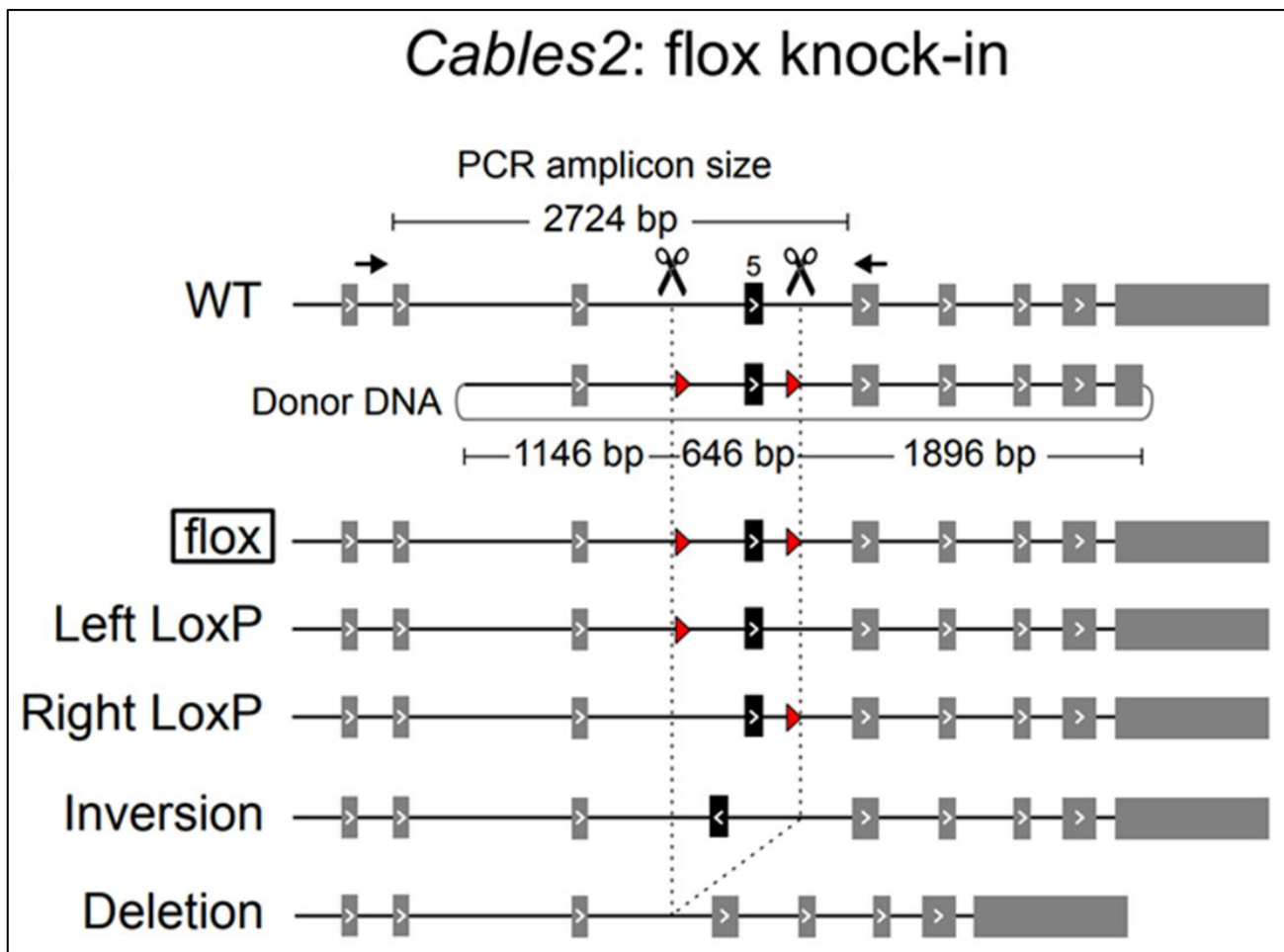


図 6. *Cables2* flox マウスのゲノム編集デザインおよび想定されるアレルタイプ

はさみは Cas9 切断サイトを示す。矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。Donor DNA に記載された塩基長は Left arm、Central arm、Right arm のサイズを示す。赤い三角は LoxP を示す。黒枠は意図する変異である flox アレルを示す。ゲノム編集により誘導される他のアレルタイプとして、Left LoxP、Right LoxP、Inversion、Deletion が想定される。

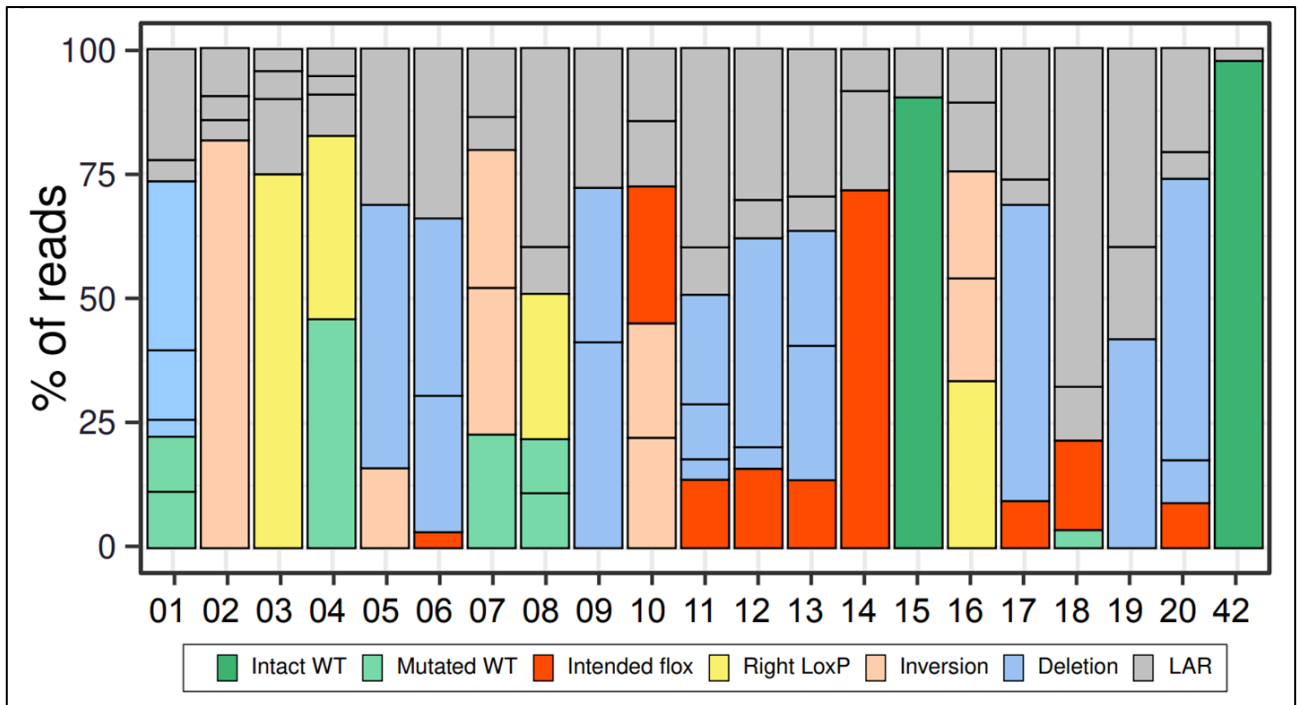


図 7. *Cables2 flox* マウスにおけるソフトウェアの解析結果(アレルパーセンテージ)

X 軸の BC 番号はマウス ID を示す。Y 軸はソフトウェアによって報告された各アレルのパーセンテージを示す。BC42 は WT コントロールを示す。バーの色はソフトウェアが報告した各アレルタイプを示す。

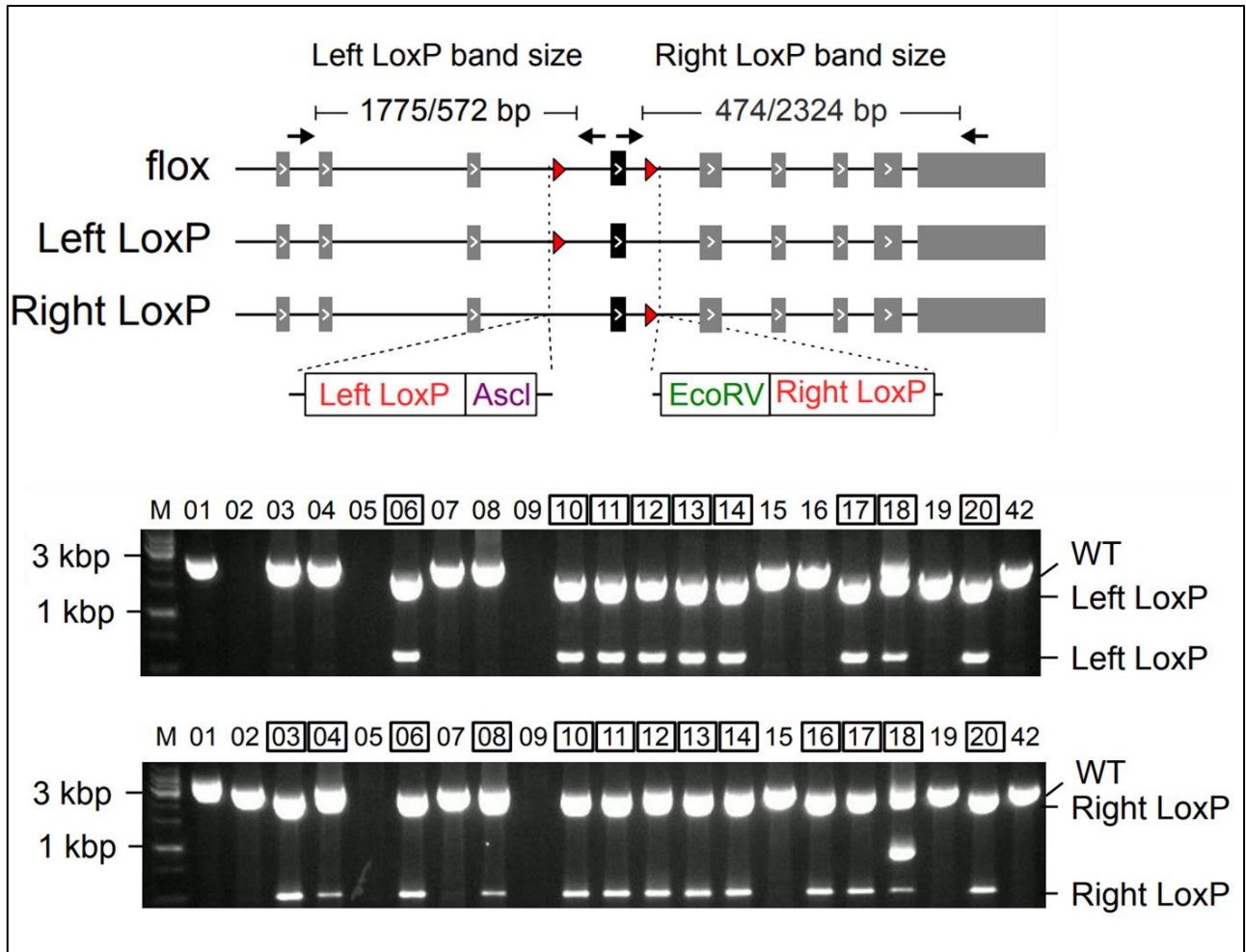


図 8. *Cables2* flox マウスにおける PCR-RFLP 解析による

Left LoxP および Right LoxP の検出

上の図は LoxP 挿入を検証するための PCR-RFLP の解析デザインを示す。Ascl および EcoRV 制限酵素認識配列は、Left LoxP および Right LoxP に隣接している。矢印は制限酵素消化後の切断された PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。赤い三角は LoxP を示す。

下の図は電気泳動図を示す。黒枠の番号は LoxP Positive と判定したマウス ID を示す。

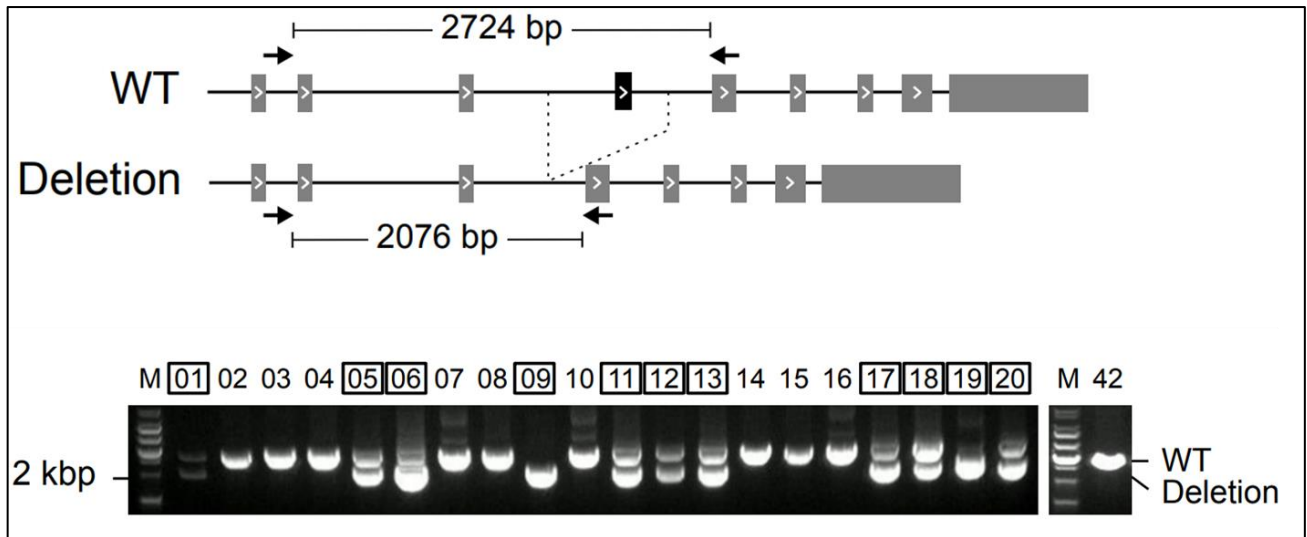


図 9. *Cables2* flox マウスにおける PCR 解析による Deletion の検出

上の図は Deletion を検証するための PCR 解析デザインを示す。矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。

下の図は電気泳動図を示す。黒枠の番号は Deletion positive と判定したマウス ID を示す。

## BC14: コンセンサ配列 (Intended flox)

```
GGCAAGAAGCAGCTGCTTTTACCTTACAGAACCAAGCATGCATCTGGATCACCAAGACACAAGGCCCTGAAGAAAACCCACTTCATCAAGAACATGAGGCAGTATGACACAAAGAAGCAGGTCAGTGAAGTGTAGGGCCAGGCCCGGA
AGGCCACTGTGCTCCCTGTACTGTAGGATCAGGCCGTGTCTCTGGGGCCAAAAATAGAGACCAGGCCCTGCCCTGTTGGCAGCAGCCCTTCCATCACCCGTTGTCCTTGACCTCTATATTGTTGAACACTGGCTAGCATAGC
CAGGCCAGCAAGCCACCCTGTATAATCCAGGGAAGAGCCACAGCTGGACACAATTTAAGAAAAGAGACTAGGCACCCTGTATAATCCAGGGAAGGCCAGCAGCTGGACACAGATTTAAGAAAAAGAGACTAGGGAAAGCAA
AAATGCCTCCCCCTCCCCAATGTGCCAGGATAGAGGTGCGACCATATTTGGGGCAGATACAGGATAAGGCATGGCTATACTGTGAGCCTAAGAGTCCATTGGGGACACACAGATGGAGATGAGGTATATTGGGGACATATG
GGAGCTTAACCTAACTAGTATTTGGTCCCAGACAGTCTAGGCTAGAATCTGGGCAGCTGCATATGCTGCCTGTGTGCAAAACACACTACTGCTCACTCTGATCTCAGTCCCTCCCTGCTGTAGGTACCCTGATAAGTATCCCC
AGGAAGTGTGTCGAGGACCTGCAATCTAAGTCTGAGACCACAGGCTGGCCTATGGTTATAGCTTTGAGCATTGAGGGGCCAGTCCCTAAGCCCCCTAGATAGCTTAGTCTGTATTATATCTAGTGTCTCTATTAGCAGTAA
ACCTTGTGTTGCTGACTCTGAGCTGTGCCAATGAACCTGGCAGCTTCTGTGCCCTCTTTGTGCGAATGAGCTGCCCTTCTGGTAACTGCTGCTCTGGGAGCAGGAGCTTCTAAGCAGATCAGGGAATCTGGCCC
AAGTGTAAAGATGCCAGACTGGTTCGGGAATCCAAGTCCCTTGGTGGCTCTGGCAGTTTCCATCACCAATGTAGACAGGACAGAGTTCCTGCCCTGCTGACCTGGCCTCCACAGGATTTACTCATCTGTGCCAAGCGGTC
CCTGTGTGGCCCTTCTCAGTCTGCCCTATGGAGAAGCCCTACGGATCAGGTAAGAACTGCCATGCTGCAACACGGGTAGCCCTGGTCTGCTGAGCACAATCAGTGTGGCTGCTCTTGTAGTGTAGGCTGGGCCCTAGACTCAT
GGGGCAGCATATGCTCCCTCCACAGCCAGGATTTGCATTCCAGTCTTATCCCGGAGCCACGGTCTGTCCAGACTATCTATATGTGTGGGATGTGTGTAGTGGATGGATAGATAGATAGGACAGGTCACATATAGGTT
GGCTATATAGTGTAGTATATACAGGTATGTATCAGTAGGCTATATAGGTTGACTGAGATATTCCTGAACCTCTCAAATAAGCTCCTAAAACCTTGTACCAGCCAGGCAATGTGTCTGAGTATAATCAGGGAAGAGGAA
ACAGCTGTGGGGCGGGCAGTGTGTGTGACCCACAGAACAAATAGTCGGCACAGAAAAACCTCTGTCAACATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGGCGGCCAGAGTGGGAGATAGCCAGTTCTCAGGATCCCA
GGCAGCTGCTGAACCTGTGACTACAGGTGAAGGACTGAGGCACCTGGGAAGCGAATTAAGCCAAAGTCTGGTAGTTTTAGGGATGTTCCAGAGTGGTGGCTCCAGGTGCTATGACAGATGACATCTATCCTGTATCCACAAG
CAGGATTAAGATACAGCTGCCCTCAGCTAAACCTTCTGTATGTACTCCAAGTCAATGCCCGCCCTTCTCCTGTTTTAGGACTTTTGGCAGGACACTCTGTGTGGTGGATCCCGTGGGCCGAGCACCACCCTGACC
ACAGCAGAGGACTACAGCCCTCCCTCTATATACATTGCAATGACCTGAGGCTGGAAGCCAGAACAGAGGCCACCCATCCGGCCGCTTCTGTTTCTCTGAGATGCTTTGAATTTGAAGCCGCTGAGCTGGGACAGATGGAAA
GGCAAGGCCCTGTGGCCAGCCATTGGCCAGCAGGTAGGCAGACAGTCTGCACATTAAGCCACAGTATTTGGGAGCAAGCCACACCCCGTTACACCTGTCACTAGCTGGCTCATGCCACCAGAGAAGTGCCTAAGATACACCATA
CACAGCTCACTGGCCCAATTTCGATATCAAGTATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGGGCCCTAGCTGGGGTAACCCCAACTGCTCCCTGGGTTCCACATAGAGCCTTGTCTGTGACAGTAAAGTAGGCCAAGGG
TCTTCCAAAGCAGAGACTAGCTGGCCACAGCACAGATTAGGCATGGAAGCTAGTGCTCTGACCTTGAAGTACCACCTCCGACTGGGTAGCAGCATGGCTTCAGGCTCCTCACTGAGGGCCAGAGGGAAGCAGAATTTGTTGACTT
```

Left LoxP site

Left arm LoxP Ascl  
**CCTGTCAAACATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGGCGGCCAG**

Right LoxP site

EcoRV LoxP Right arm  
**CCACTGCGCGCCAATTCGATATCAAGTATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGGCGGCCAGAGTGGGAGATAGCCAGTTCTCAGGATCCCA**

図 10. *Cables2* flox BC14 マウスにおけるソフトウェアの解析結果(コンセンサ配列)

赤および青の枠は Left および Right の LoxP を示す。塩基配列の赤字は LoxP 配列を示す。紫字は Ascl 制限酵素認識配列を示す。緑字は EcoRV 制限酵素認識配列を示す。



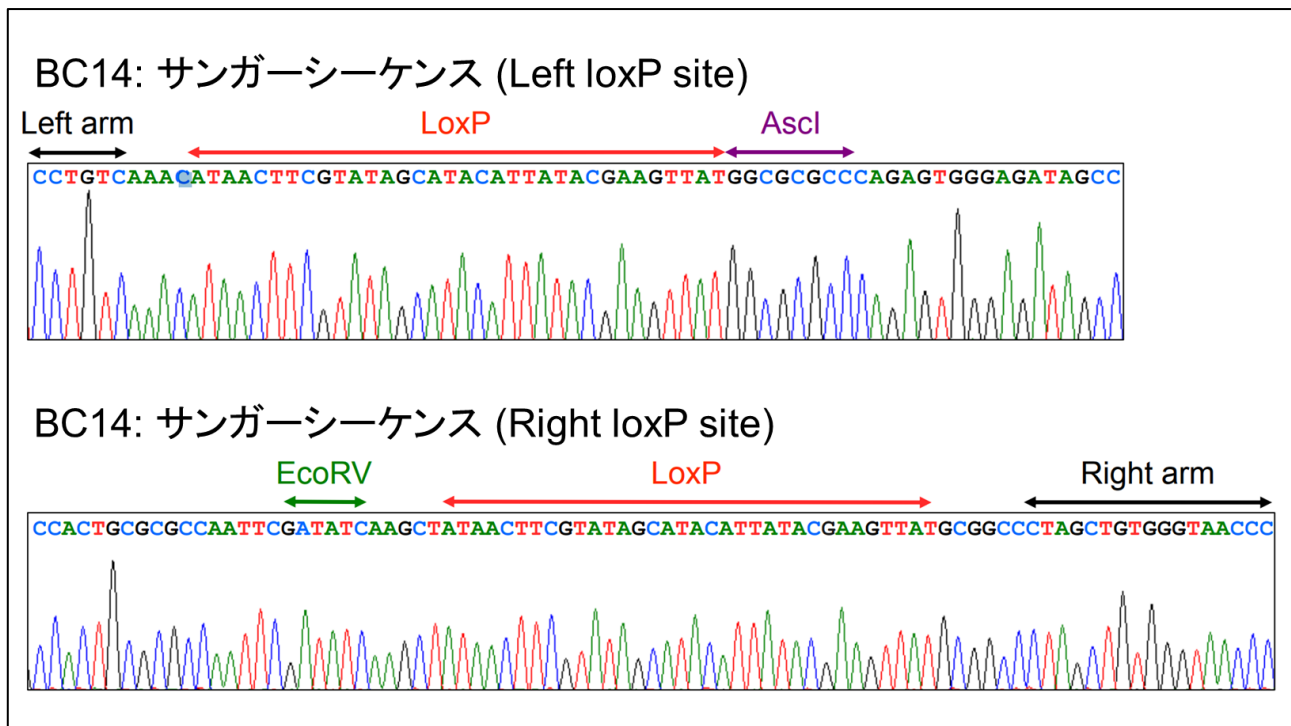


図 11. *Cables2* flox BC14 マウスにおけるサンガーシーケンスによる

Left および Right LoxP 配列の検出

赤の矢印は LoxP 配列を示す。紫の矢印は *Ascl* 制限酵素認識配列を示す。緑の矢印は *EcoRV* 制限酵素認識配列を示す。

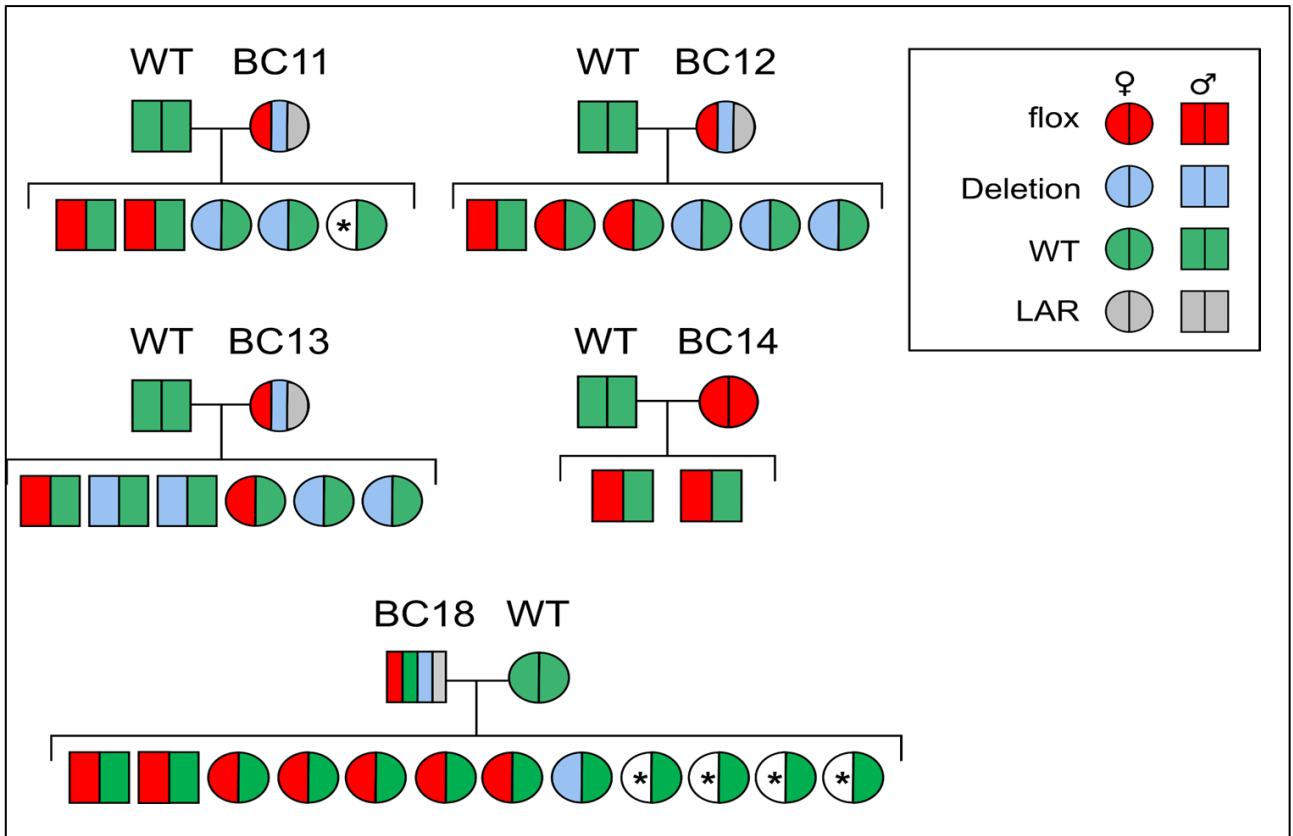


図 12. *Cables2* flox マウスの系統図

BC11、BC12、BC13、BC14、BC18 の系統図を表す。特定できなかったアレルタイプは「\*」で示す。

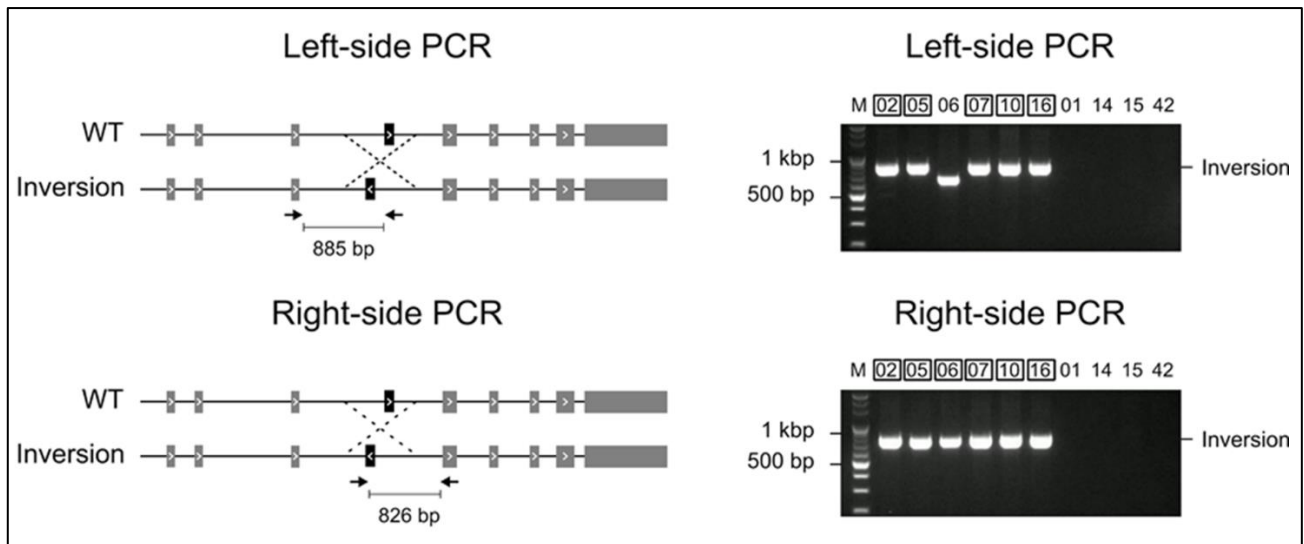


図 13. *Cables2 flox* マウスにおける PCR 解析による Inversion の検出

左の図は Inversion を検証するための PCR 解析デザインを示す。矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。

右の図は電気泳動図を示す。黒枠の番号は Inversion Positive と判定したマウス ID を示す。

**BC02: コンセンサス配列 Mutated Inversion**

```

GGCAAGAAGCACTGCTTTTACCTTACAGAACCAAGCATGCATCTGGATACCAAGACACAAAGGCTGAAGAAAACCCACTTCATCAAGAACATGAGGAGTATGACACAAAGAACAGCAGGTGAGTGAGTGTAGGGCCAGGCCGGGAAGGCCACTGTGCTCCTGACTGTAGG
ATCAGGCCGTGTCTTGGGGCCAAAAATAGACACCAGGCCCTGCCTGTTGGCAGCAGCCCTTCCATCACCCGTTGCCCTGACCTCTATATTGTTGAACCTGGCTAGCATAGCCAGGCCAGCAAGCCACCCTGTATAATCCAGGGAGAGCCACCAGCTGGACAC
AAATCTTAGAAAAAGAGACTAGGCACCCTGTATAATCCAGGGAGGCGCAGCAGCTGGACACAGATCTAAGAAAAAGAGACTAGGGAAGCAAAAAATGCCCTCCCTCCCAATGTGCCAAGATAGAGGTGCGCACATATTTGGGGCACATATACAGGATAAGGCATGGC
TATACTTGCAGCACTAAGAGTTCATTTGGGGACACACAGATGGAGTAGGTATATTGGGGACATATGGGGAGCTTAACCTCAAACTAGTATTTGGGTCCCAGAACAGTCTAGGCTAGAATCTGGGCAGTGATATGCTGCTGCAAAACACACTACTGTCACTGTAT
CTCAGTCCCTCCCTGCTGAGTCACTGATAGTATCCCAGGAACCTGTGCTCAGGACCTGCAAACTCAAGCTCTGAGACCACAGGTTGGCTATGGTTATAGCTTTGAGCATTAGGGGCCAGCTCTAAGCCCTCTAGATAGCTTAGTCTGTATTATATCTAGGTGT
TCTCTATTAGCAGTAAACCTTGTGTTGCTGTACTGTAGCTGTGGCAATGAACCTGGCAGCTTCTGTGCTCCTTTGTGGCAATGAAGCTGCCCTTCTGGGTTAACCTGTGCTCCTGGAGCAGGGAGCTTCTAAGCAGATCTAGGGAATCTGGCCAAAGCTGAAGA
TGCCAGACTGGCTCCGGAATCAAGTCCCTTGGTGGCTCTGGCAGTTCCCATCACCCAAATGATACAGGACAGAGTTCCTGCCCTGCTGACCTGGCCCTCCACAGGATTGACTCATCTGTGCCAAGGGTCCCTGTGTGCGGCCCTCAGTCTGCCCTATGGGAAG
GCCTACGGATCAGGTAAAGAACTGCCCATGCTGGGAACACGGGTAAAGCCTGGCTCTGCTGAGCACAACTAGTGGCTGCTCTTGGTGTAGGCTGGGGCTTACTCATGGGGCCAGCATATGCTCTCCCTCCACAGCCAGGAGTTTGCATCCAGTTCTATCCCGGAGC
CACGGTCTGTCCAGACTATCTATAATGTTGTGGGATGTGTGTAGATGGATGGATAGATAGATAGGCTAGATATAGTTGGCTATATATAGTTAGCTATATACAGGTATGTATCAGTAGGCTATATAGTTGACTGAGATATCTGAACTCTCAATAAAGCTCC
TAAACCTGTGACACAGCCAGCAATGTGCTGGATATAATTACGGGAAGAAGAAACAGCTGTTGGGGCCGGCAGTGTGTGTGACCCCCACAGAACATAGTCGGCACAGAAAACTCCTGCTCCAGTGGCTGTATGGTGTACTCTAGGCATTTCTGTGGGTGCAT
GAGCCAGCTAGTGACAGGTAAACGGGTGCGCTGCTCCCAATCTGTGCTTAATGTGACAGCAGCTGCTGCTACTCTGCTGGCCAAATGCTGGCCAGGCTCTTGCCTTCCATCTGCTCCAGCTCAAGCCTTCCCAATCAAGACCATCTCAGAGAAACAGAAAGC
CCGCGATGGGTGCTGTGCTTGGCTGTCCACCCTCAGCTACTGCAATGTATATGAGAGGGAGGGCTGTAGTCCCTCTGTGTGGTCAAGTGGGTGGTGCCTGGCCACCGGAAATCCACCACAGAGTGTGCTGCCAAAGTCTCAAAACAGGAGAGGGGGGGCC
ATGACTGTGAGGTACTACAGAAAGTTAGCCTGAGGAGCAGCTGTATCTTAACTCTGCTTGTGGTGAAGATAGTGTACTCTGATAGCACTGGGAGCCACCCTCTGGAACATCCCTGAAACTTACCAGACTTGGCTTAAATTCCTCCAGGTGCTCAGTCC
CTTCACTGTAGTCACAGTTCAGCAGCTGGCTGGATCTGAACTGCTGAGCTGGTAGCAGTGGCTCAGCTCCTCAGCTCTGAGGGCAGAGGGAAGCAGAACTGGTTGACTTTCTGGCTGGGAGCAGAACTGAGCTAATGTATTGCTTTCCAGGTGTGTATGCA
AAGTTCCTGACCTTACTAATGCTGTGTTATACAAAGATGACAGCCATGGC
  
```

**Substitution**

A A C T G G C T A T C T C C C A C T C T G T A G C T G T G G G T A A C C C A A C T G C T C C C C T G G G T T C T C C A C A T A G A G C C T T G C T T C T

**BC02: サンガーシーケンス**

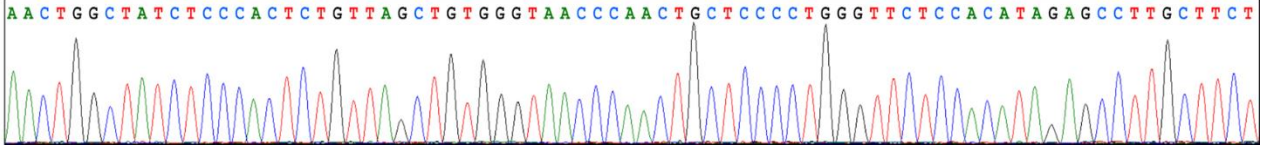


図 14. *Cables2 flox BC02* マウスにおけるソフトウェアの報告したコンセンサス配列とサンガーシーケンスの比較

緑の塩基は置換を示す。点線はソフトウェアの報告したコンセンサス配列とサンガーシーケンスの間の対応する塩基を示す。

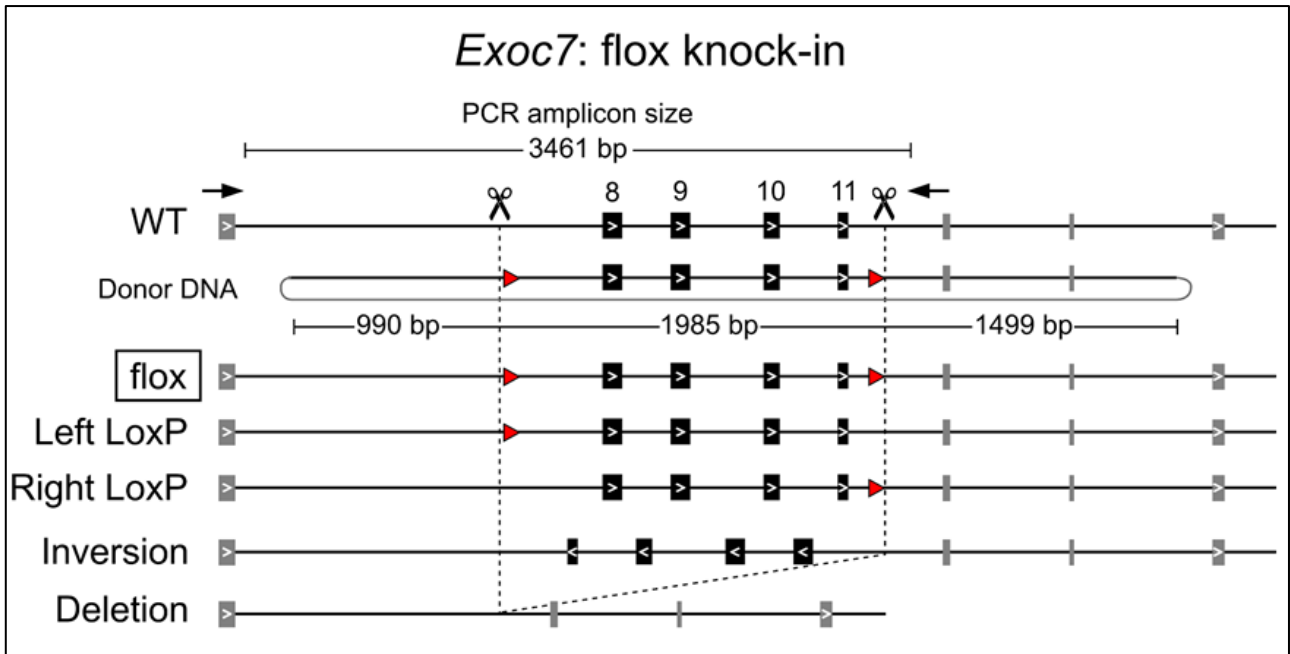


図 15. *Exoc7* flox マウスのゲノム編集デザインおよび想定されるアレルタイプ

はさみは Cas9 切断サイトを示す。矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。Donor DNA に記載された塩基長は Left arm、Central arm、Right arm のサイズを示す。赤い三角は LoxP を示す。黒枠は意図する変異である flox アレルを示す。ゲノム編集により誘導される他のアレルタイプとして、Left LoxP、Right LoxP、Inversion、Deletion が想定される。

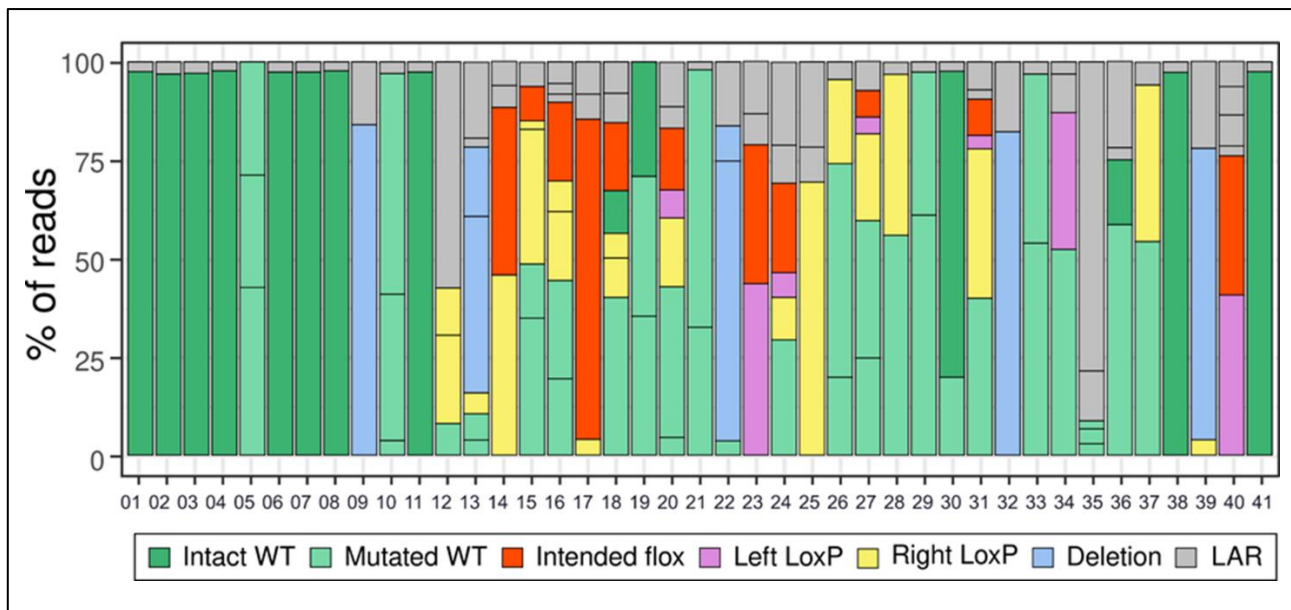


図 16. *Exoc7 flox* マウスにおけるソフトウェアの解析結果(アレルパーセンテージ)

X軸のBC番号はマウスIDを示す。Y軸はソフトウェアによって報告された各アレルのパーセンテージを示す。BC41はWTコントロールを示す。バーの色はソフトウェアが報告した各アレルパターンを示す。

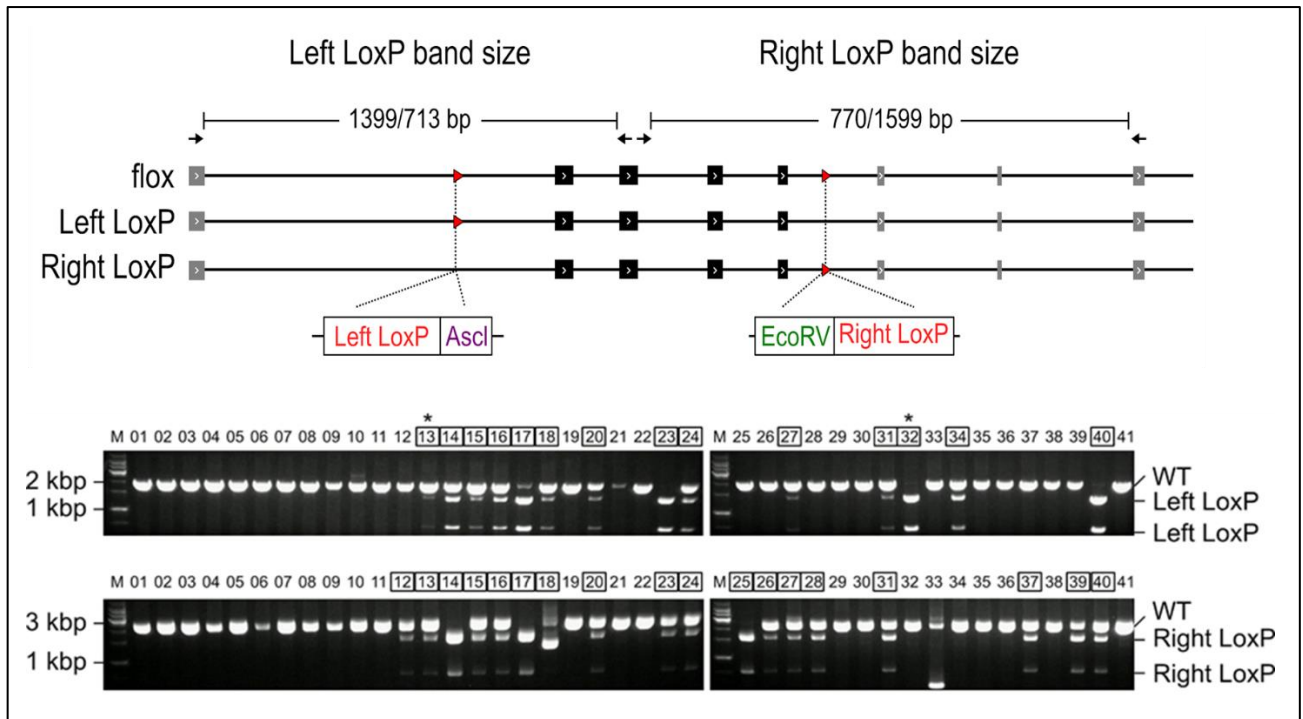


図 17. *Exoc7* flox マウスにおける PCR-RFLP 解析による

#### Left LoxP および Right LoxP の検出

上の図は LoxP 挿入を検証するための PCR-RFLP の解析デザインを示す。Ascl および EcoRV 制限酵素認識配列は、Left LoxP および Right LoxP に隣接している。矢印は制限酵素消化後の切断された PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。赤い三角は LoxP を示す。

下の図は電気泳動図を示す。黒枠の番号は LoxP Positive と判定したマウス ID を示す。

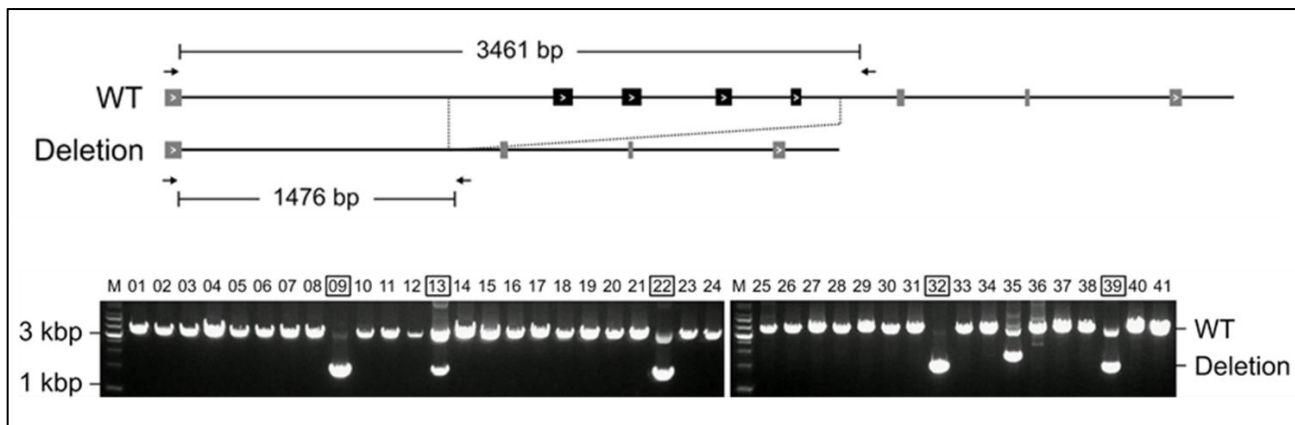


図 18. *Exoc7* flox マウスにおける PCR 解析による Deletion の検出

上の図は Deletion を検証するための PCR 解析デザインを示す。矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。

下の図は電気泳動図を示す。黒枠の番号は Deletion positive と判定したマウス ID を示す。



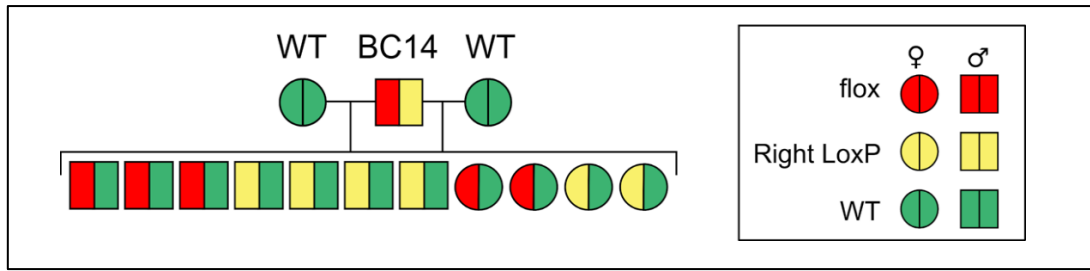


図 19. *Exoc7 flox* マウスの系統図

BC14 の系統図を表す。

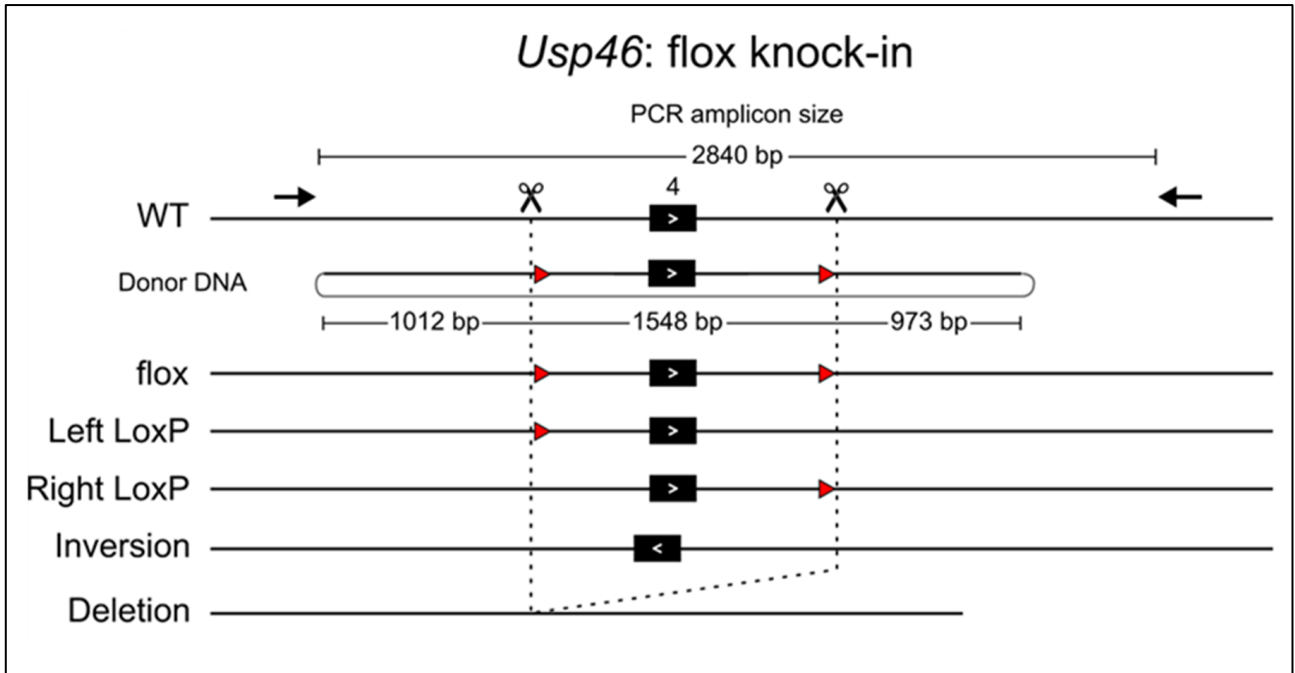


図 20. *Usp46* flox マウスのゲノム編集デザインおよび想定されるアレルタイプ

はさみは Cas9 切断サイトを示す。矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。Donor DNA に記載された塩基長は Left arm、Central arm、Right arm のサイズを示す。赤い三角は LoxP を示す。黒枠は意図する変異である flox アレルを示す。ゲノム編集により誘導される他のアレルタイプとして、Left LoxP、Right LoxP、Inversion、Deletion が想定される。

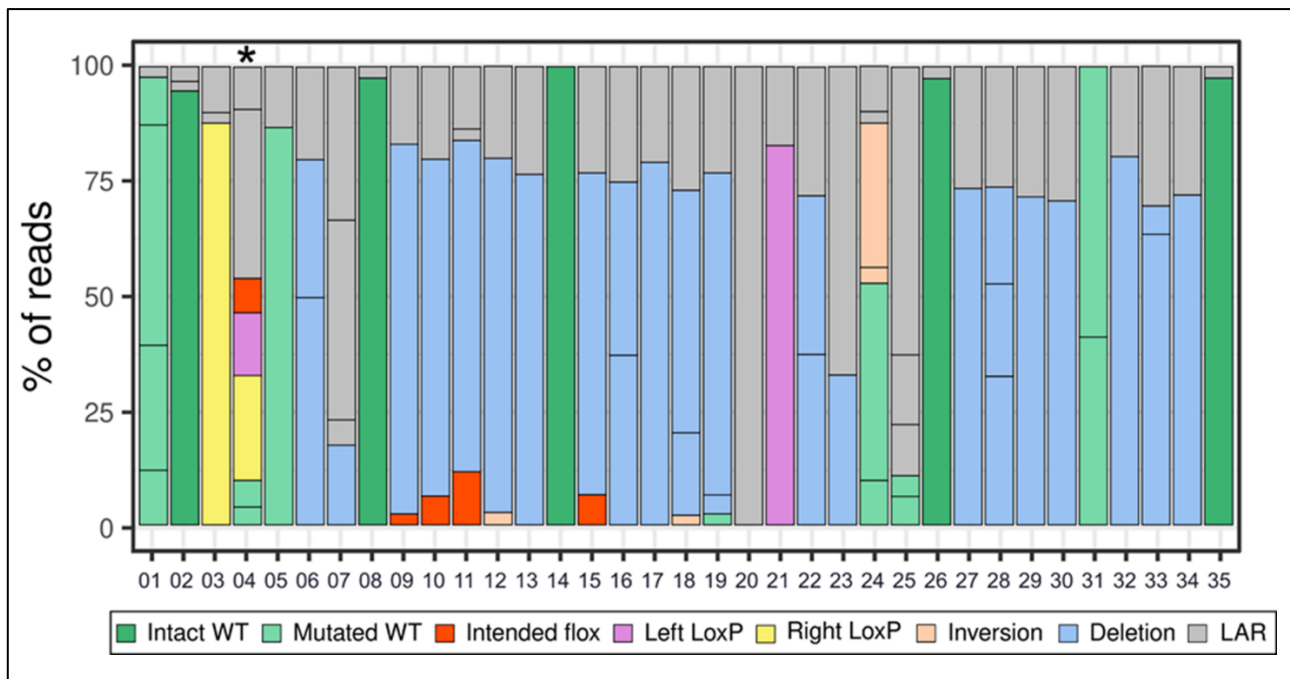


図 21. *Usp46 flox* マウスにおけるソフトウェアの解析結果(アレルパーセンテージ)

X 軸の BC 番号はマウス ID を示す。Y 軸はソフトウェアによって報告された各アレルのパーセンテージを示す。BC35 は WT コントロールを示す。バーの色はソフトウェアが報告した各アレルタイプを示す。\*は疑似 *flox* が疑われるマウス ID を示す。

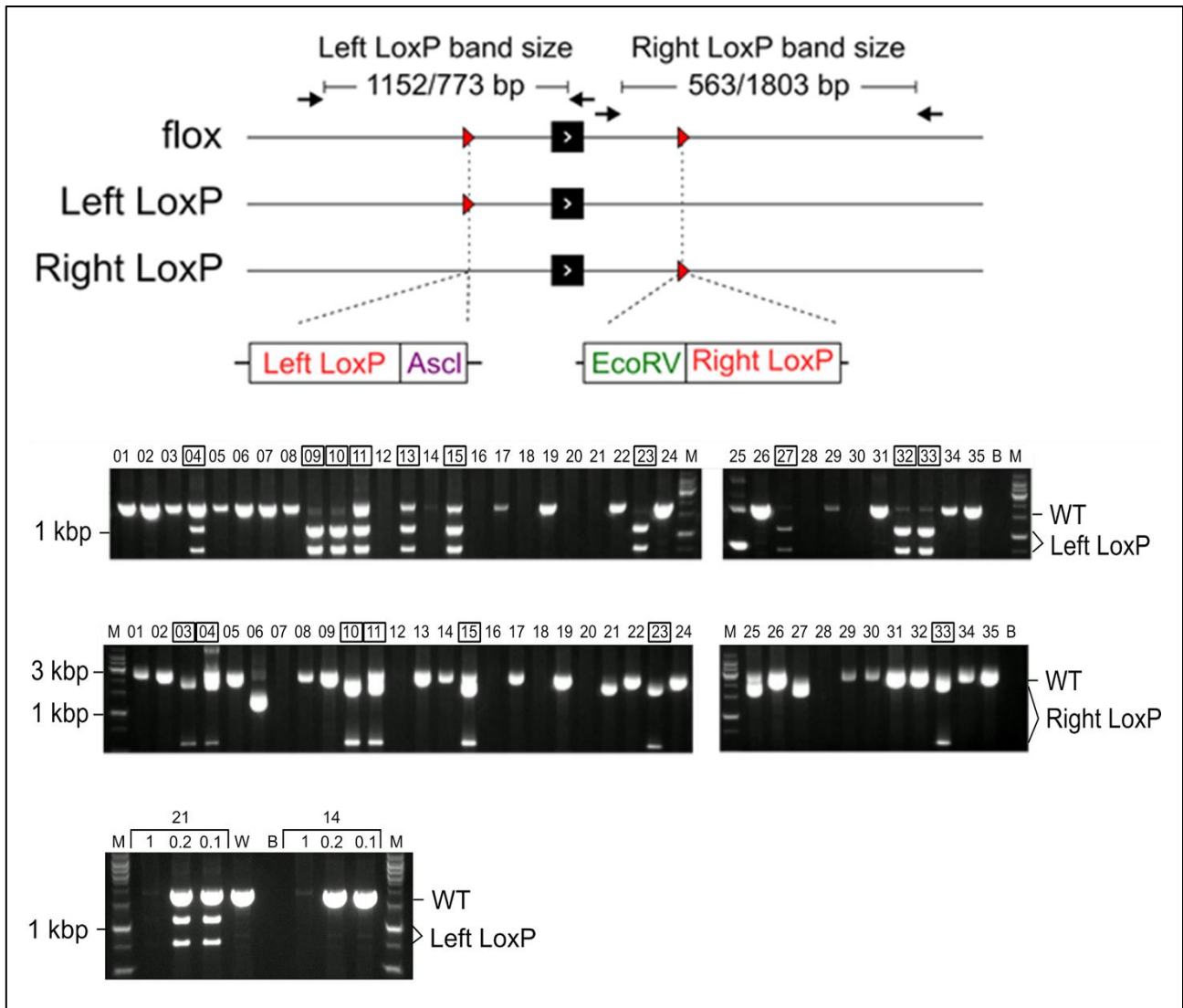


図 22. *Usp46* flox マウスにおける PCR-RFLP 解析による

### Left LoxP および Right LoxP の検出

上の図は LoxP 挿入を検証するための PCR-RFLP の解析デザインを示す。Ascl および EcoRV 制限酵素認識配列は、Left LoxP および Right LoxP に隣接している。矢印は制限酵素消化後の切断された PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。赤い三角は LoxP を示す。

下の図は電気泳動図を示す。黒枠の番号は LoxP Positive と判定したマウス ID を示す。

BC21 および 14 はゲノム DNA テンプレートを希釈し、再度 PCR-RFLP 解析を実施。希釈率は 3 条件(1, 0.2, 0.1)で実施。再解析において、BC21 は Left LoxP positive であることを示す。

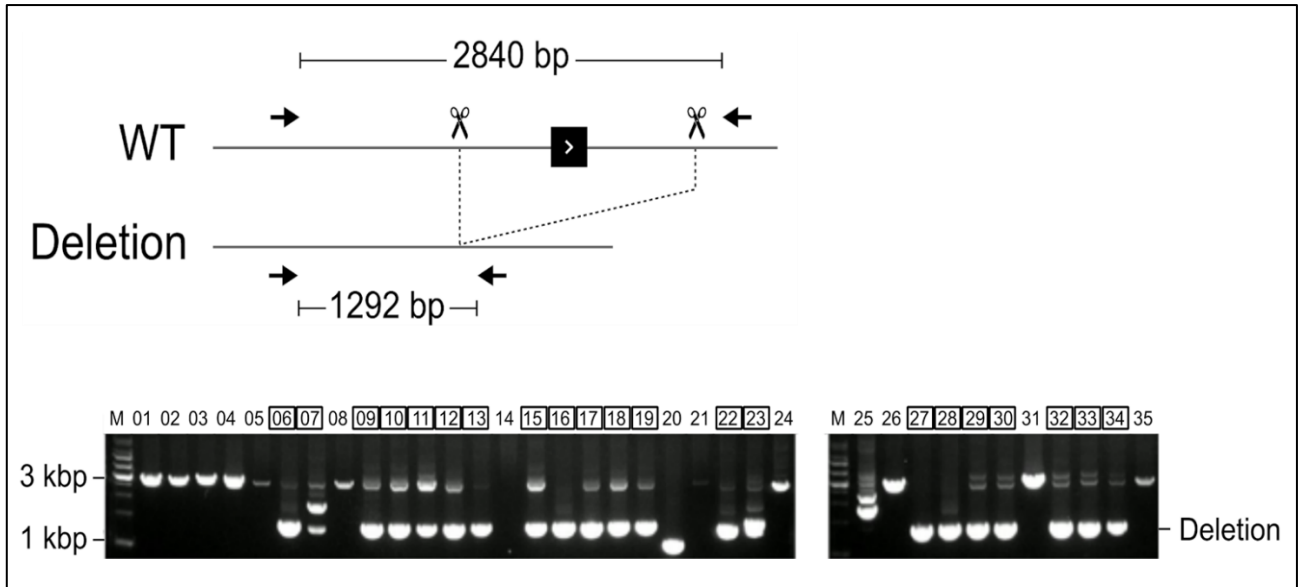


図 23. *Usp46* flox マウスにおける PCR 解析による Deletion の検出

上の図は Deletion を検証するための PCR 解析デザインを示す。矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。

下の図は電気泳動図を示す。黒枠の番号は Deletion positive と判定したマウス ID を示す。

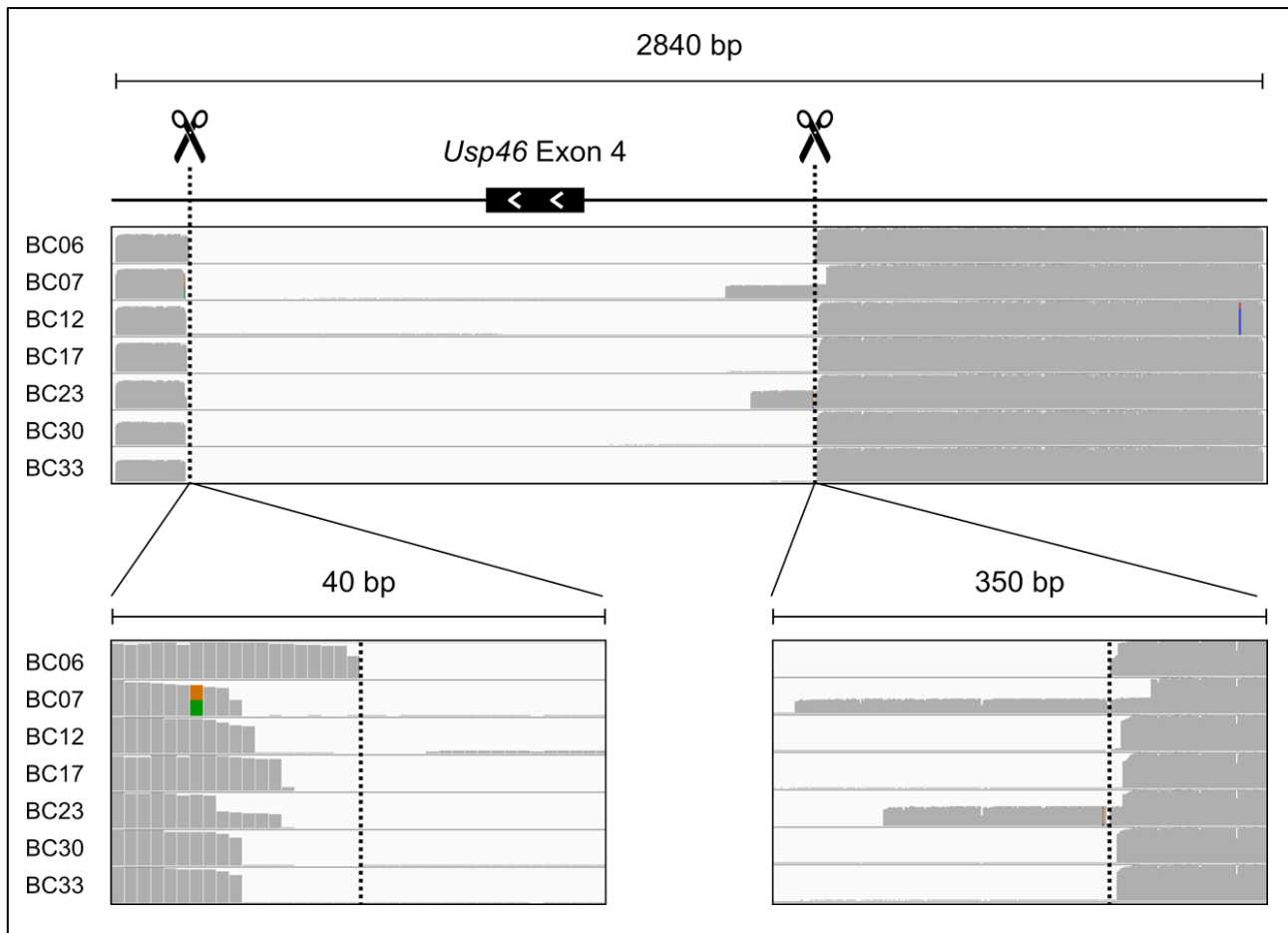


図 24. *Usp46* flox マウスにおけるソフトウェアによる Deletion と LAR の判別

BC07、BC12、BC17、BC23、BC30、BC33 におけるリード情報の可視化図を示す。対象 6 個体は LAR と正しく判定されたことを示す。BC06 は Deletion のコントロールを示す。

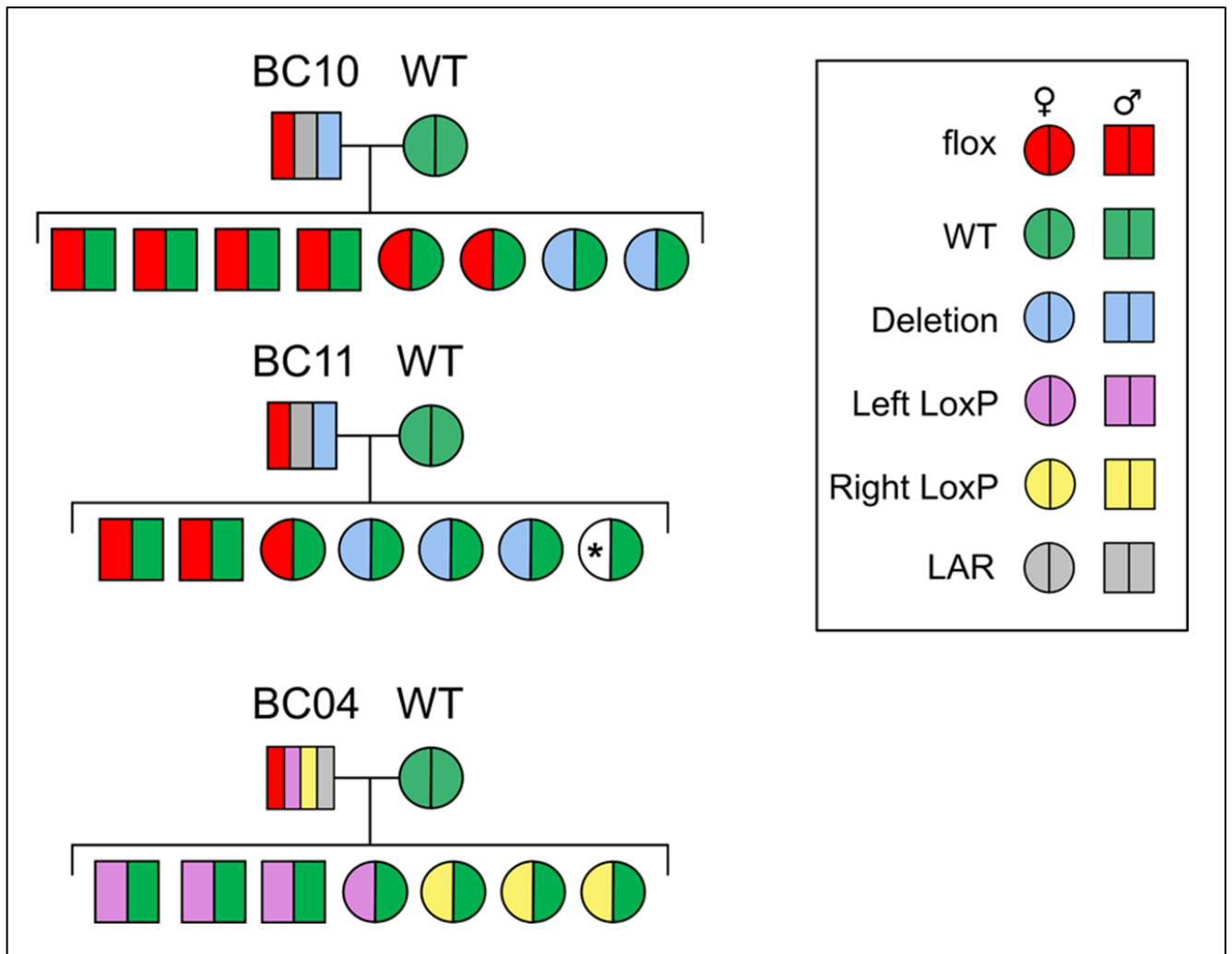
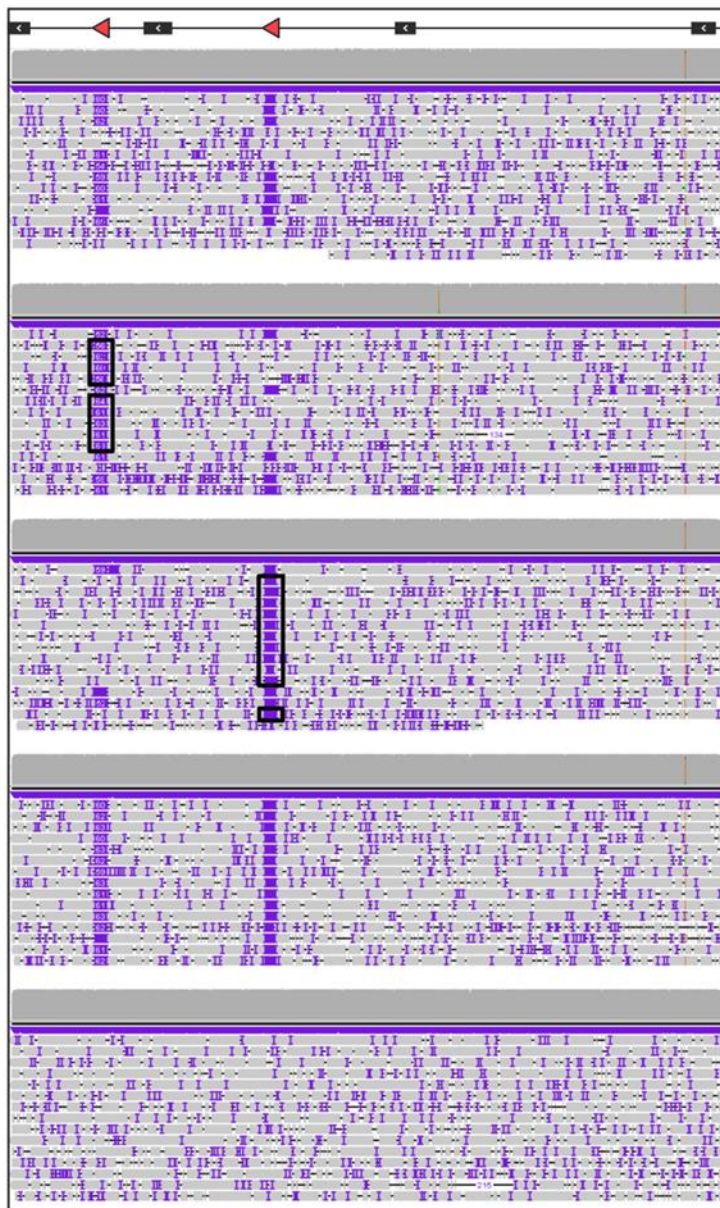


図 25. *Usp46* flox マウスの系統図

BC10、BC11、BC04 の系統図を表す。特定できなかったアレルタイプは「\*」で示す。

## Intended flox #1

(Intended floxプラスミドと野生型genome DNAの混合サンプル)



All alleles

Allele 1  
LAR (5.6 %)

Allele 2  
LAR (14.3 %)

Allele 3  
Intended flox (46.6 %)

Allele 4  
Intact WT (33.5 %)

図 26. ソフトウェア開発の実験における疑似 LoxP の検出

Intended flox サンプル ID #1 におけるリード情報の可視化図を示す。黒枠は疑似 LoxP を示す。



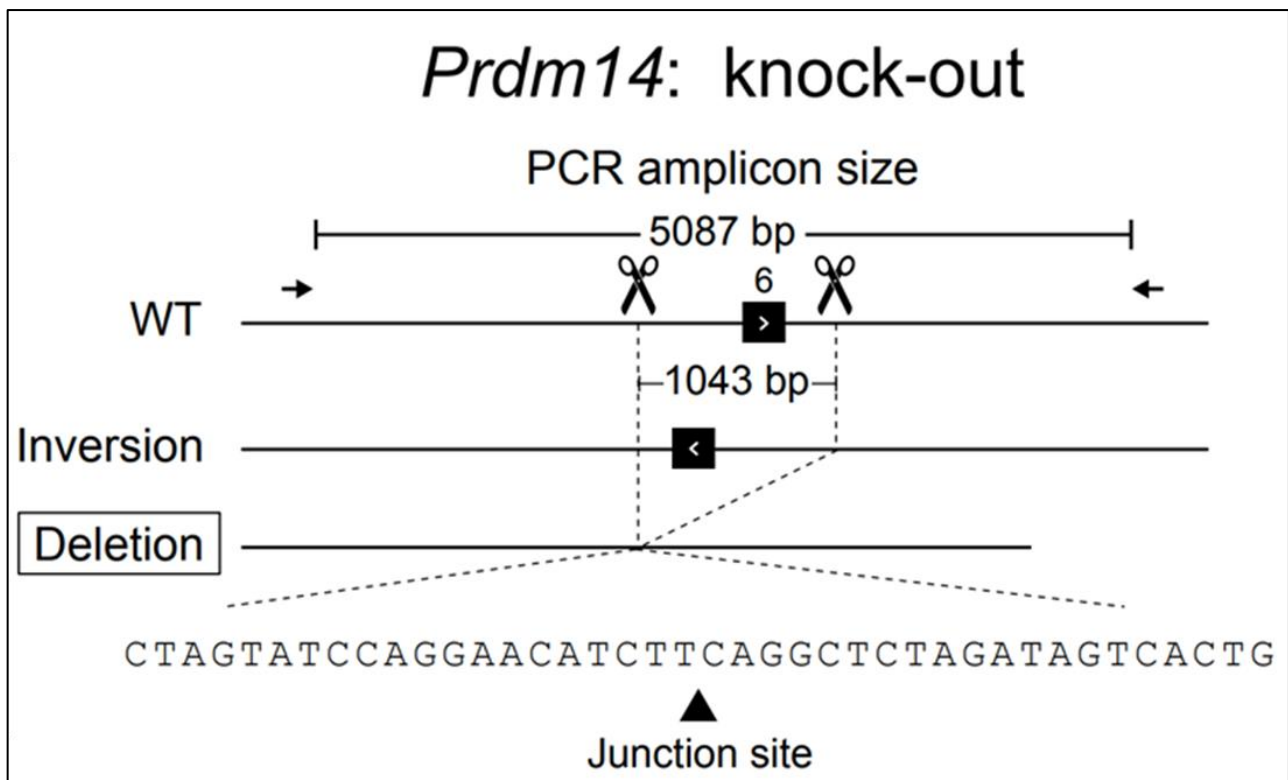


図 27. *Prdm14* KO マウスのゲノム編集デザインおよび想定されるアレルタイプ

はさみは Cas9 切断サイトを示す。矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。黒枠は意図する変異である Deletion アレルを示す。ゲノム編集により誘導される他のアレルタイプとして Inversion が想定される。塩基配列の黒い三角はゲノム DNA の接合部位(Junction site)を示す。

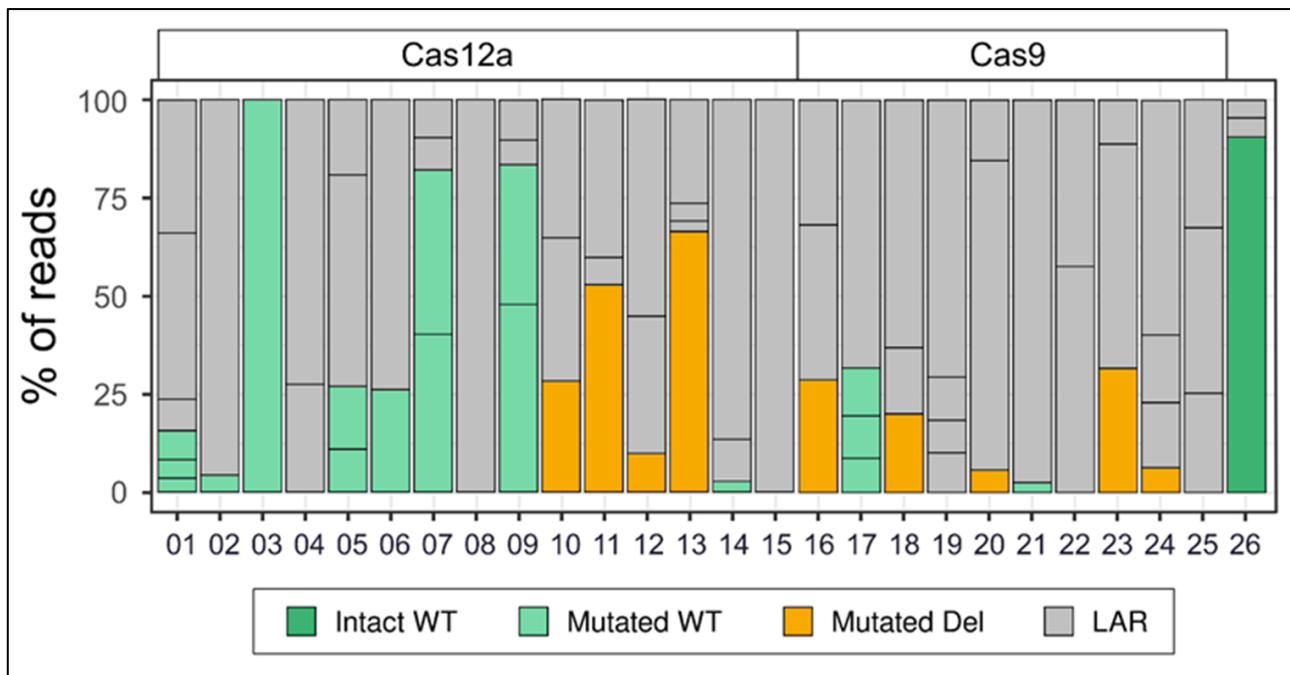


図 28. *Prdm14* KO マウスにおけるソフトウェアの解析結果(アレルパーセンテージ)

X軸の BC 番号はマウス ID を示す。Y 軸はソフトウェアによって報告された各アレルのパーセンテージを示す。BC26 は WT コントロールを示す。バーの色はソフトウェアが報告した各アレルタイプを示す。C01-15 は Cas12a、BC16-25 は Cas9 を用いてゲノム DNA 切断が誘導された。

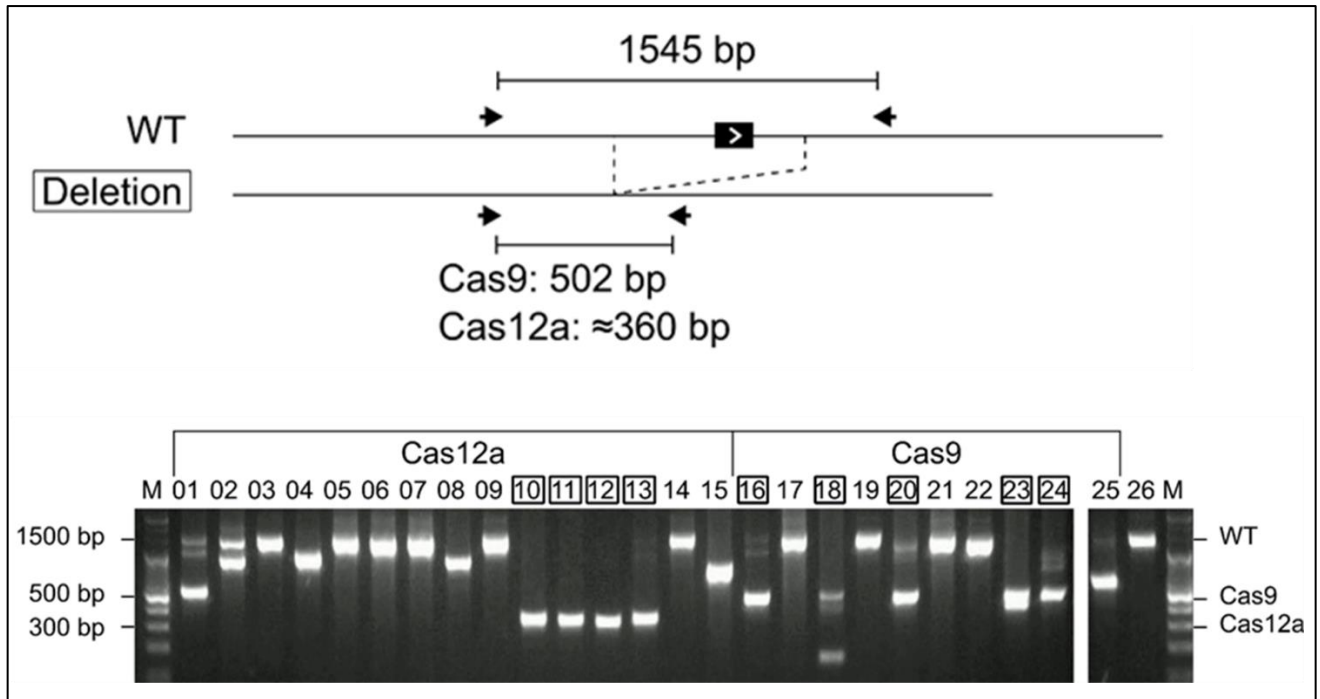


図 29. *Prdm14* KO マウスにおける PCR 解析による Deletion の検出

上の図は Deletion を検証するための PCR 解析デザインを示す。矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。

下の図は電気泳動図を示す。黒枠の番号は Deletion Positive と判定したマウス ID を示す。

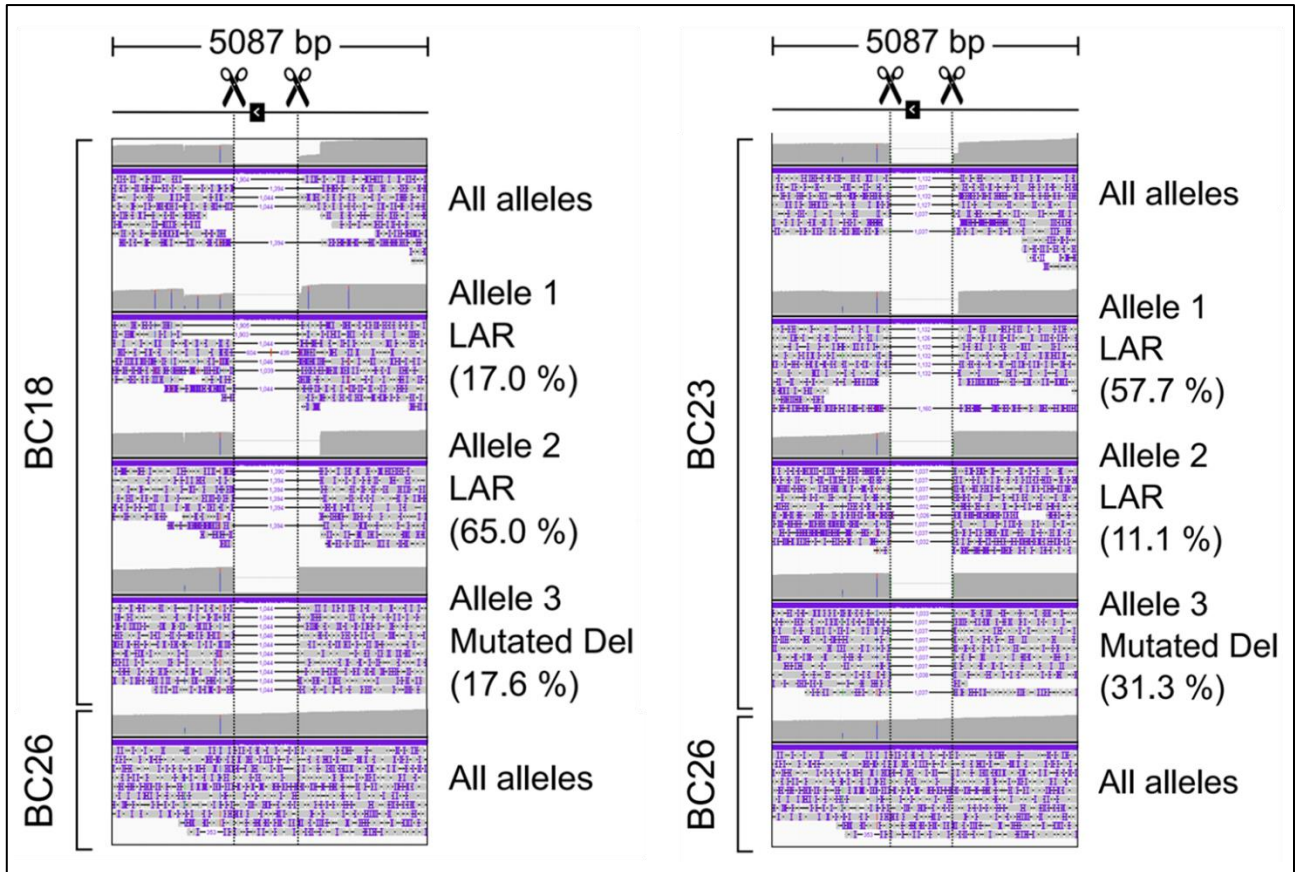


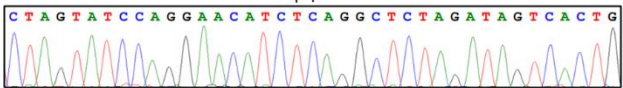
図 30. *Prdm14* KO BC18 および BC23 マウスにおけるソフトウェアによる Deletion と LAR の判別

BC18 および BC23 におけるリード情報の視可視化図を示す。ソフトウェアが報告したすべてのアレルタイプを示す。BC26 は WT コントロールを示す。

### BC18: コンセンサス配列 Allele3 Mutated Del



### BC18: サンガー



### BC23: コンセンサス配列 Allele3 Mutated Del



### BC23: サンガー

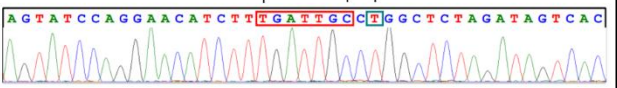


図 31. *Prdm14* KO BC18 および BC23 マウスにおける

ソフトウェアが報告したコンセンサス配列とサンガーシーケンスの比較

塩基の色は挿入(赤)、欠損(スカイブルー)、置換(緑)などの変異のタイプを示す。点線はソフトウェアの報告したコンセンサス配列とサンガーシーケンスの間の対応する塩基を示す。

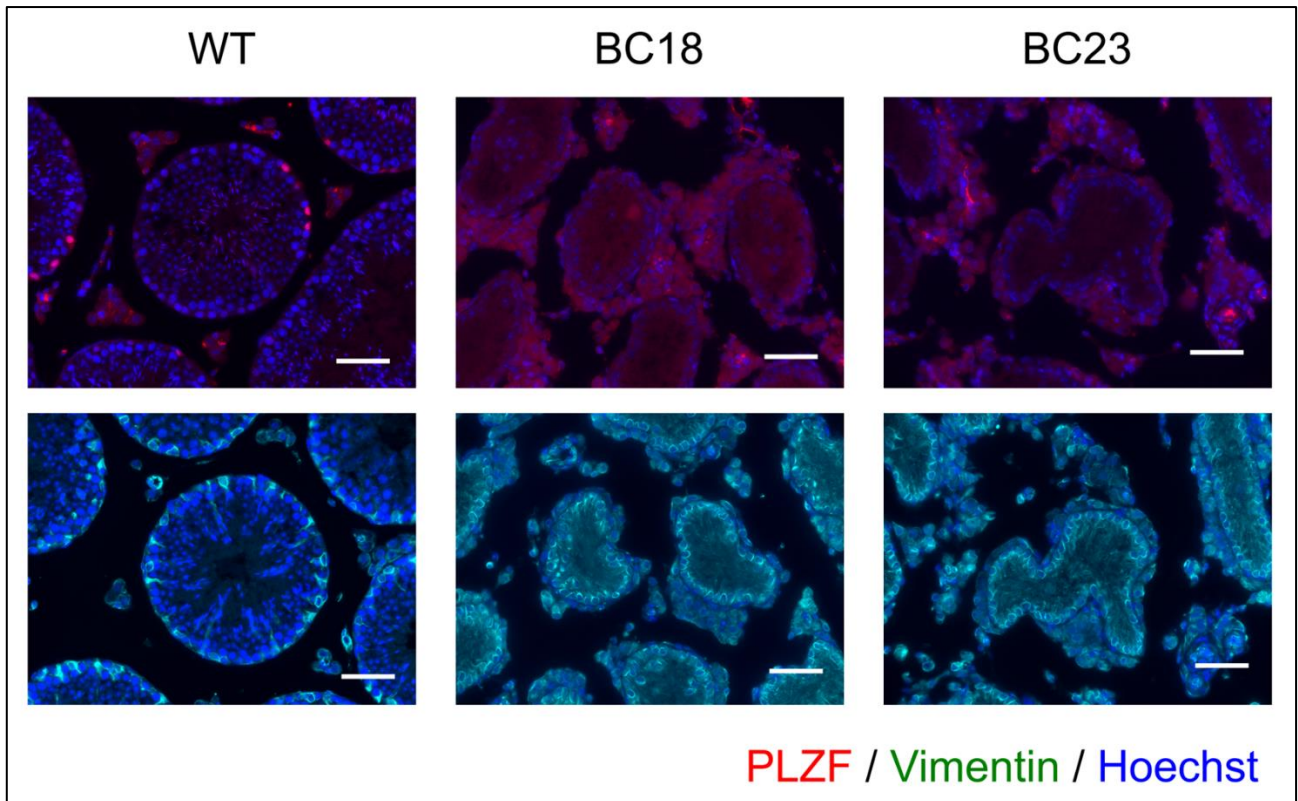


図 32. *Prdm14* KO BC18 および BC23 マウスにおける免疫染色による表現型解析

WT コントロール、BC18、BC23 の精巣組織切片の PLZF(赤)、ビメンチン(緑)、ヘキスト(青)の共染色の結果を示す。PLZF は精細管基底膜に沿った未分化精原細胞、ビメンチンはセルトリ細胞を染色する。スケールバーは 100 $\mu$ m を表す。

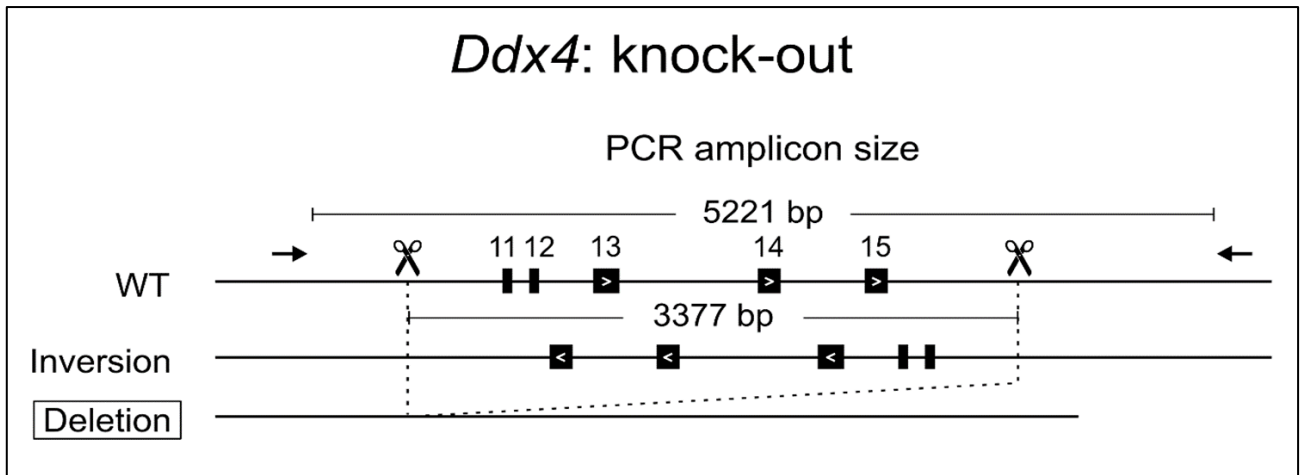


図 33. *Ddx4* KO マウスのゲノム編集デザインおよび想定されるアレルタイプ

はさみは Cas9 切断サイトを示す。矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。黒枠は意図する変異である **Deletion** アレルを示す。ゲノム編集により誘導される他のアレルタイプとして **Inversion** が想定される。

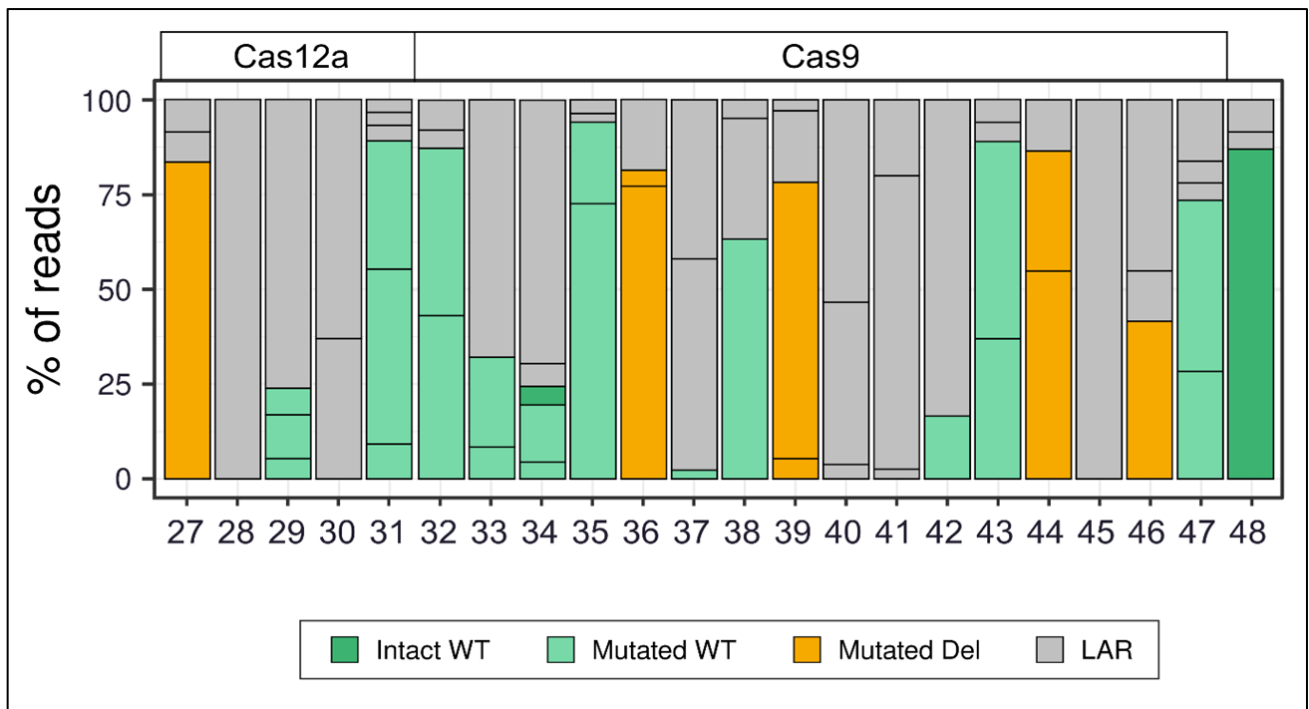


図 34. *Ddx4* KO マウスにおけるソフトウェアの解析結果(アレルパーセンテージ)

X 軸の BC 番号はマウス ID を示す。Y 軸はソフトウェアによって報告された各アレルのパーセンテージを表示す。BC48 は WT コントロールを示す。バーの色はソフトウェアが報告した各アレルタイプを示す。BC27-31 は Cas12a、BC32-47 は Cas9 を用いてゲノム DNA 切断が誘導された。



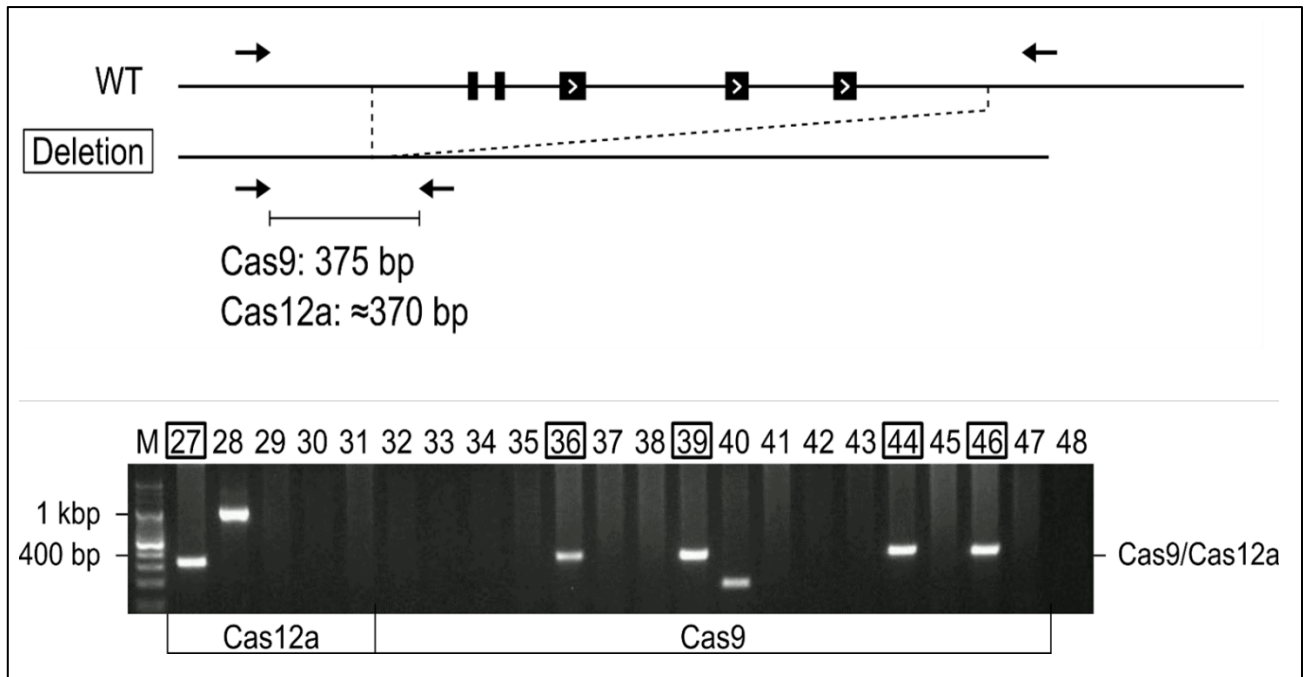


図 35. *Ddx4* KO マウスにおける PCR 解析による Deletion の検出

上の図は Deletion を検証するための PCR 解析デザインを示す。矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。

下の図は電気泳動図を示す。黒枠の番号は Deletion Positive と判定したマウス ID を示す。

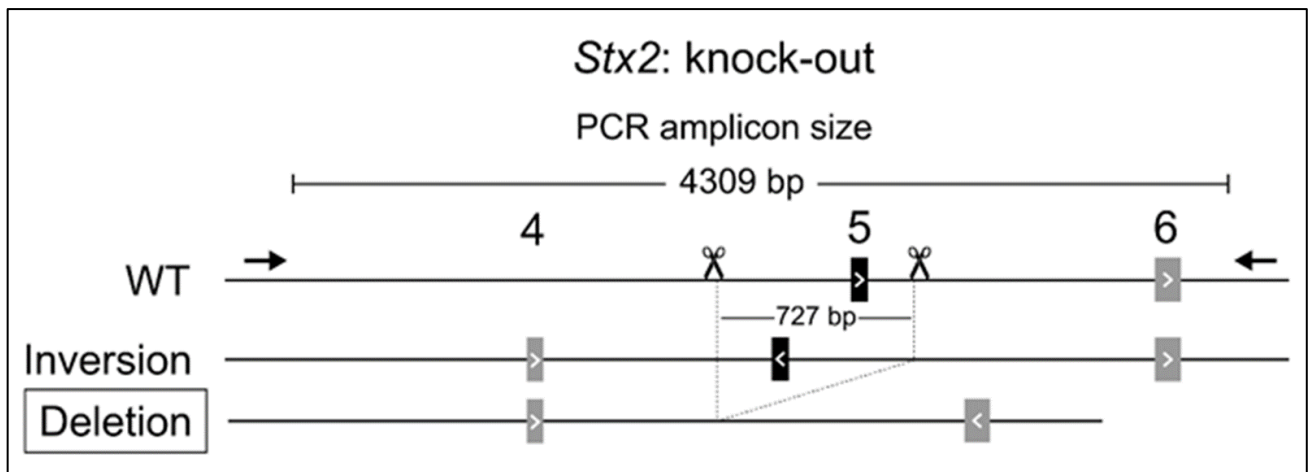


図 36. *Stx2* KO マウスのゲノム編集デザインおよび想定されるアレルタイプ

はさみは Cas9 切断サイトを示す。矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。黒枠は意図する変異である **Deletion** アレルを示す。ゲノム編集により誘導される他のアレルタイプとして **Inversion** が想定される。

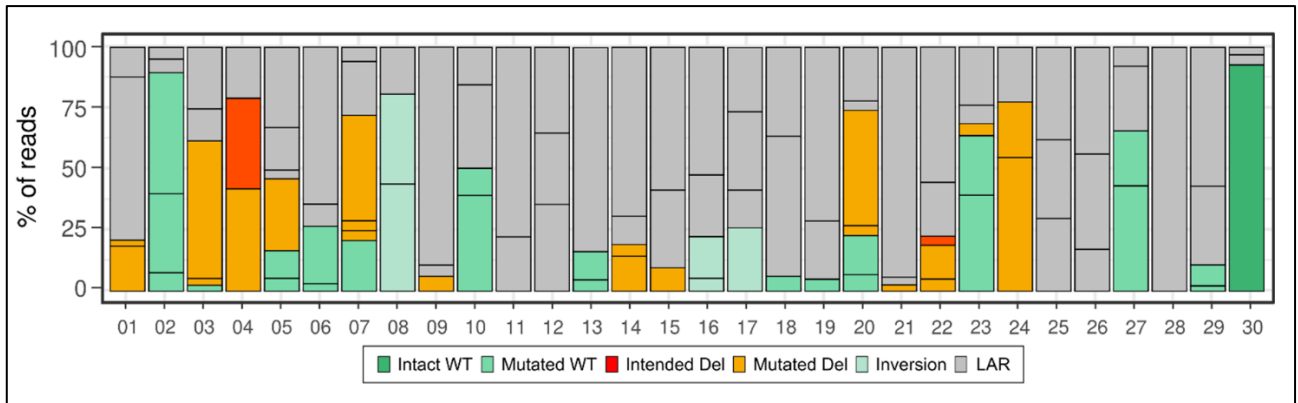


図 37. *Stx2* KO マウスにおけるソフトウェアの解析結果(アレルパーセンテージ)

X 軸の BC 番号はマウス ID を示す。Y 軸はソフトウェアによって報告された各アレルのパーセンテージを示す。BC30 は WT コントロールを示す。バーの色はソフトウェアが報告した各アレルタイプを示す。

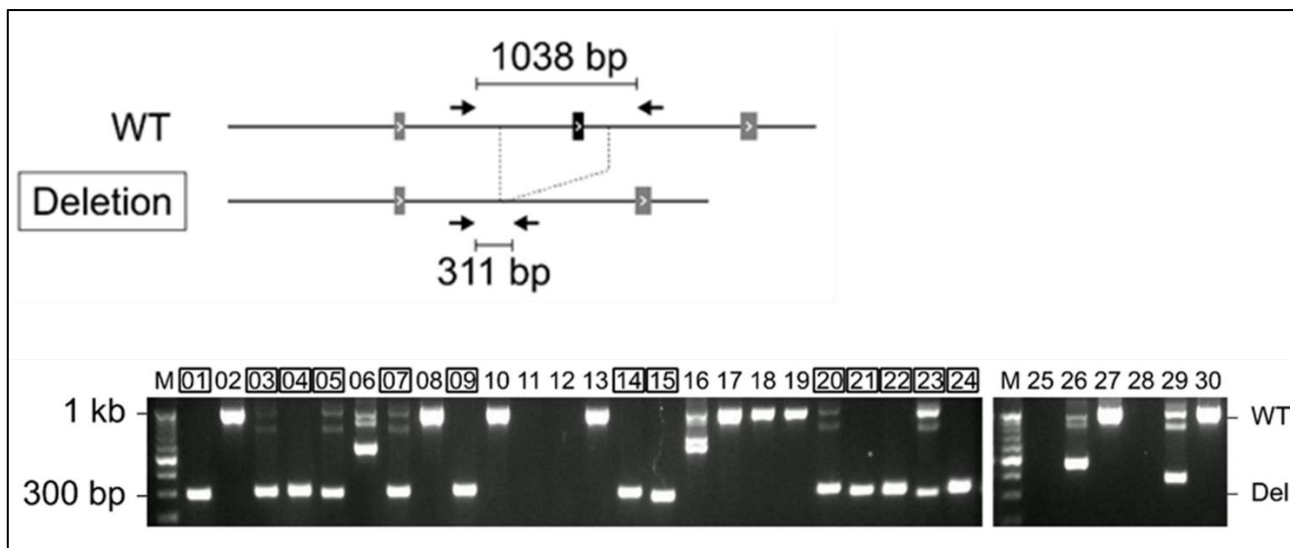


図 38. *Stx2* KO マウスにおける PCR 解析による Deletion の検出

上の図は Deletion を検証するための PCR 解析デザインを示す。矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。

下の図は電気泳動図を示す。黒枠の番号は Deletion Positive と判定したマウス ID を示す。

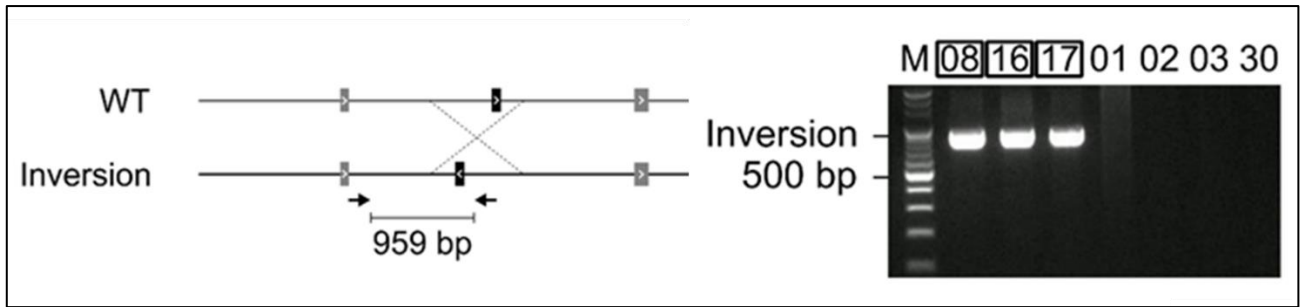


図 39. *Stx2* KO BC17 マウスにおける PCR 解析による Inversion の検出

左の図は Inversion を検証するための PCR 解析デザインを示す。矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。

右の図は電気泳動図を示す。黒枠の番号は Inversion Positive と判定したマウス ID を示す。

### BC17: コンセンサス配列

CCTTAAAAACAGCGTTGTTCCCAAG<sup>A</sup>CTGTGGCTTGGTGACAGAGCCCTTGCTGAGCATG

### BC17: サンガーシーケンス

CCTTAAAAACAGCGTTGTTCCCAAG<sup>A</sup>CTGTGGCTTGGTGACAGAGCCCTTGCTGAGCATG

PAM

Insertion

Inversion

図 40. *Stx2* KO BC17 マウスにおけるソフトウェアが報告した

コンセンサス配列とサンガーシーケンスの比較

赤の塩基は挿入を示す。紫の塩基は反転した塩基配列を示す。

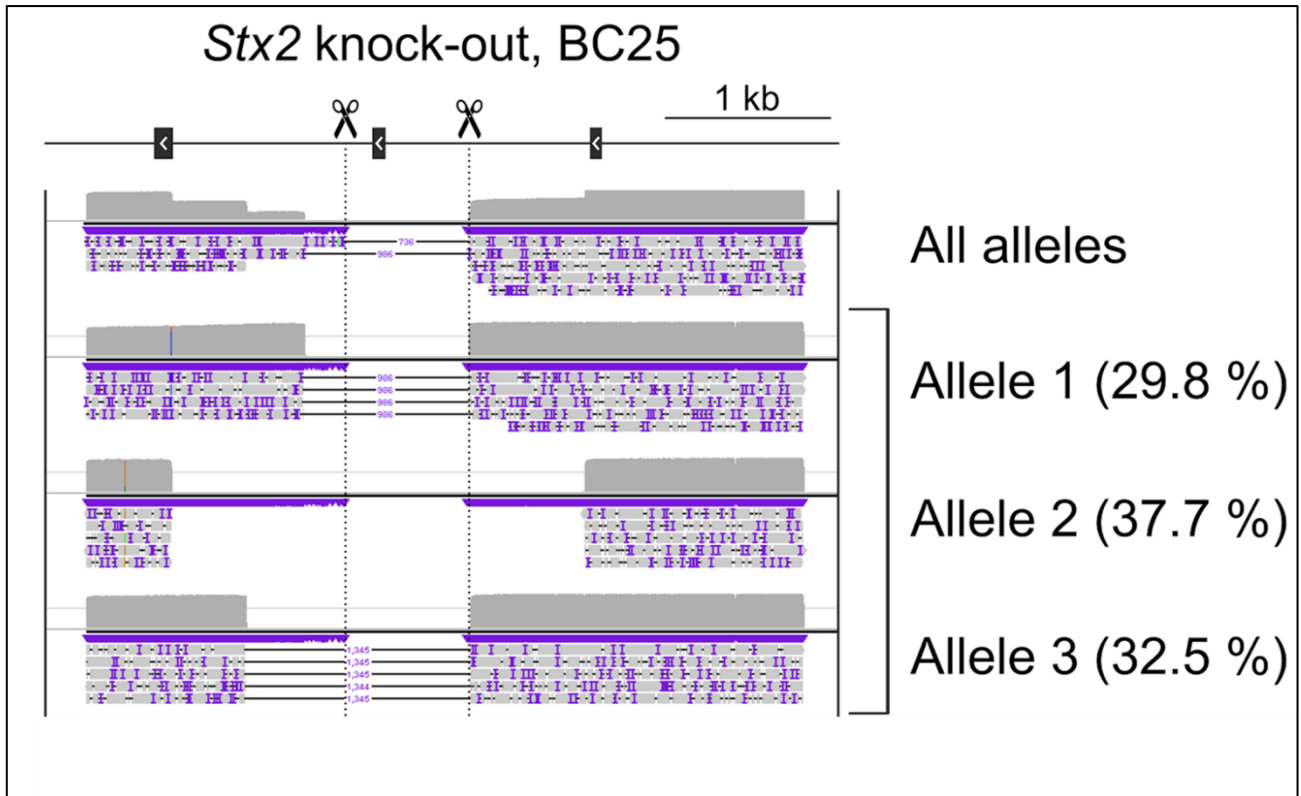


図 41. *Stx2* KO BC25 マウスにおけるソフトウェアによる 3 つのアレルタイプの検出

BC25 におけるリード情報の視覚化図を示す。ソフトウェアが報告したすべてのアレルタイプを示す。

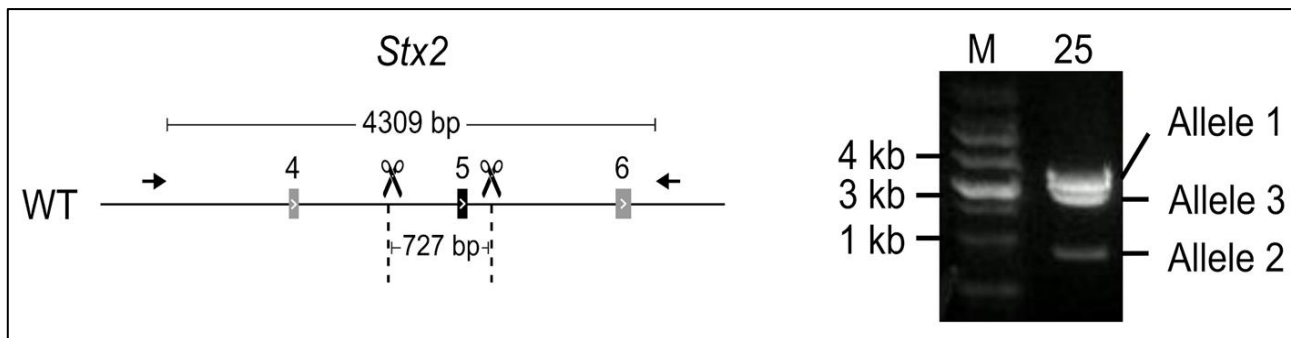


図 42. *Stx2* KO BC25 マウスにおける PCR 解析による 3 つのアレルタイプの検出

左の図は BC25 の 3 つのアレルタイプを検証するための PCR 解析デザインを示す。矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。右の図は電気泳動図を示す。



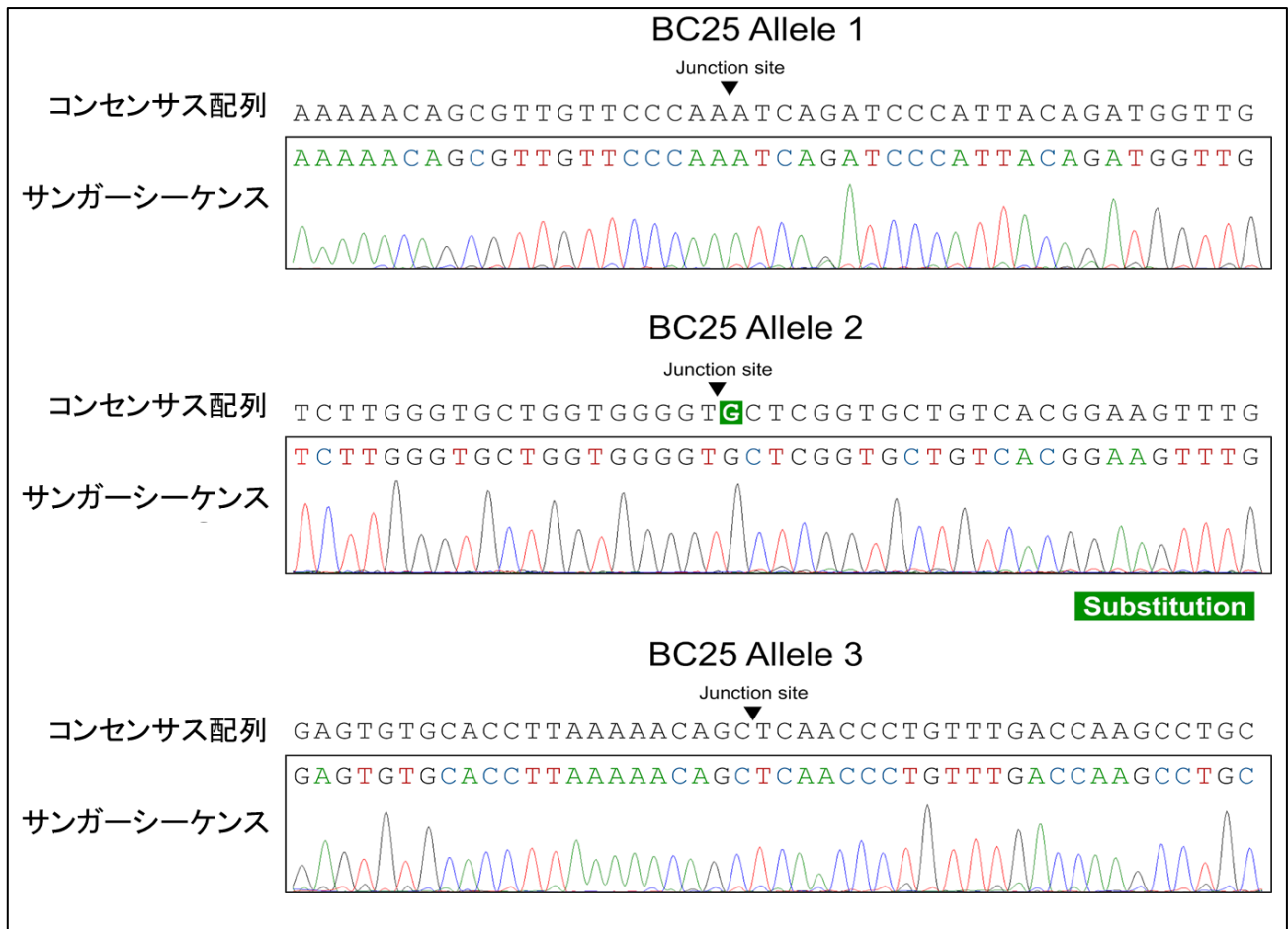


図 43. *Stx2* KO BC25 マウスにおけるソフトウェアが報告した  
 コンセンサス配列とサンガーシーケンスの比較

緑の塩基は置換を示す。塩基配列の黒い三角はゲノム DNA の接合部位(Junction site)を示す。

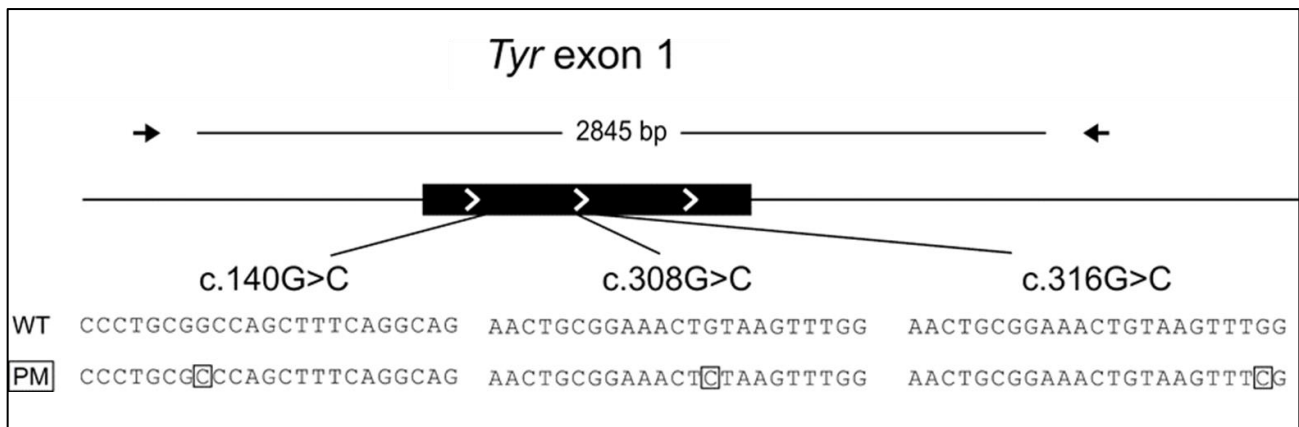


図 44. Tyr c.140G>C、c.316G>C、c.308G>C マウスのゲノム編集デザイン

および想定されるアレルタイプ

矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。黒枠は意図する変異である PM アレルを示す。塩基配列の黒枠の塩基は意図する塩基置換を示す。

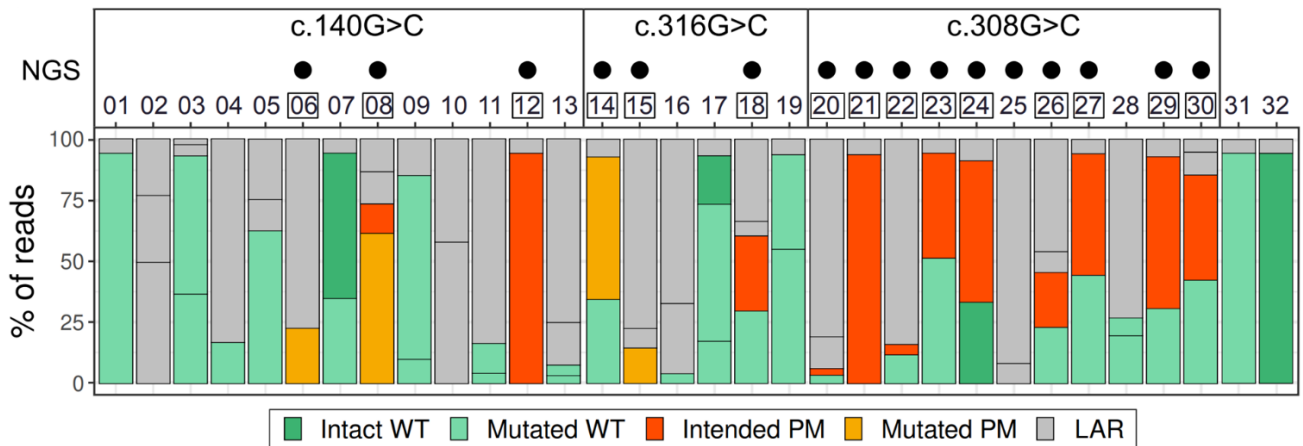


図 45. *Tyr* c.140G>C、c.316G>C、c.308G>C マウスにおける

ソフトウェアの解析結果(アレルパーセンテージ)およびショート NGS の解析結果

X 軸の BC 番号はマウス ID を示す。Y 軸はソフトウェアによって報告された各アレルのパーセンテージを示す。BC32 は WT コントロールを示す。BC31 は *Tyr* c.230G>T\_ Mutated PM のコントロールを示す。バーの色はソフトウェアが報告した各アレルタイプを示す。黒枠の番号はソフトウェアの報告により PM positive と判定したマウス ID を示す。黒丸の番号はショートリード NGS により PM Positive と判定したマウス ID を示す。BC01-13 は c.140G>C マウス群、BC14-19 は c.316G>C マウス群、BC20-30 は c.308G>C マウス群を示す。

BC31: Allele 2 Mutated WT (93.8%)

```
TGCATTGAAGCAGTTCCACAAAATAACAAAAGTAACAAGTAAGATATCTTTGGAATAATCAATTCAAGATAATCAAGGAAAAATGAGAGGCAACTA
TTTTAGACTGATTACTTTTATAAAAATAAATAAGCTCAGCTTAGCCAGATATAAGCAATATCTGAGTTCTGAAGAAAAATTTTGACAAAATGAGT
TCTATAAATGTTATTGTCTACTTATGATCTCTAAATACAACAGGCTTGTATTGAGAATCTAGATGTTTCATGACCTTTATTCATAAGAGATGATGT
ATTCTTGATACTACTTCTCATTGCAAAATCCAATTATTTAATTTTCATATCAATTAGAATAATATATCTTCCTTCAATTTAGTTACCTCACTAT
GGGCTATGTACAAAACCCAAGAAAAAGTTAGTCATGTGCTTTGCAGAAGATAAAAAGCTTAGTGTA AAAACAGGCTGAGAGTATTTGATGTAAGAAGG
GGAGTGGTTATATAGGCTTAGCCAAAACATGTGATAGTCACTCCAGGGGTGCTGGAAAAGAAGTCTGTGACACTCATTAACTATTGGTGCAGA
TTTTGTATGATCTAAAGGAGAAAAATGTTCTTGGCTGTTTTGTATTGCCCTCTGTGGAGTTCCAGATCTCTGATGGCCATTTCCCTCGAGCCTGTG
CCTCCTTAAGAACTTGTGGCAAAAAGAATGCTGCCACCATGGATGGGTGATGGGAGTCCCTGCGGCCAGCTTTGAGGCAGAGGTTCTGCCAGG
ATATCCTTCTGTCCAGTGCACCATCTGGACCTCAGTTCCCTTCAAAGGGGTGGATGACCTGAGTCTGGCCCTCTGTGTTTTATAATAGACCT
GCCAGTGCTCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGCGGAACTGTAAGTTTGGATTGGGGGCCAAAATGTACAGAGAAGCGAGTCTTGATTAGAA
GAAACATTTTTGATTTGAGTGTCTCCGAAAAGAATAAGTCTTTTCTTACCTCACTTTAGCAAAACATACTATCAGCTCAGTCTATGTCATCCCA
CAGGCACCTATGGCCAAATGAACAATGGGTCAACACCATGTTTAATGATATCAACATCTACGACCTCTTTGTATGGATGCATTACTATGTGTCAA
GGGACACACTGCTTGGGGGCTCTGAAATATGGAGGGACATTGATTTGCCCATGAAGCACCAGGGTTTCTGCCTTGGCACAGACTTTCTTGTAT
TGTGGAAACAAGAAATTCGAGAATACTGGGATGAGAATACTACTGTTCCATACTGGGATGGAGAGATGCAGAAAACGTGACATTTGCACAG
ATGAGTACTTTGGGAGGTCGTCACCCTGAAAAATCCTAACTTACTCAGCCAGCATCCTTCTCTCCTGCGCAGGTAAGATGCACATATAGAGAG
AGTTGCAAAAGACTGGTACTTACGACGCCACATTTTCATGCTCTGTGAGCATCTCTGATAATATCTCAGGGCAGAAAATGTGCCTTACTAACAGATG
TTAATGCTTCTTGATTTCTTTTCTCTTTTGGAGAACTCTCAAAGTTGTTATTAACAATAATATCTATGTGCTTATTTGTCTTAATATCTAACAGCT
TAGTTAGATTTCTAAGCTGCTATAACAAGGACTGATTGGTTCCACCATGTATTGTTAGCACCTCCTATGGTATCTGGAATAAACAGTAACTCAGT
TATTTAAGAATGGATGAGAAACCAGATTATCTTAGTTCATGTTTCTGAGTAATATTAATAATTAATTAACAGTAAAATCCATAAGTATGCTACTT
TAAAATATAAATCTCTGGCCAAAACCAAGACTTATTATTCAGGATCTTCAAAGAGAAAGTCTGAGATAATCACTAAGTATCAGAGATGACCTTTA
TTACATGATTGCCTGATAGAAAAATGATTACACACACAAAAAAATCTTCAGTTGCTTAAATTTTAAACGTTGCTGACTCTCAAACAGTTAAGT
AATAAAAGAGTTAAAGCCTGCTGTGTATTTAGAATATGTGAATACCTATTGAAAGAATTTATTGTACAATTAATAAACAGACTTCTATTTTACA
GTCATAAGATACTACTTAATTTGTTAAAAATTTTTTTGATAGCATTGTTGGTAAATAGCAAAGTGATATTTGCTAATGATTACAAGGGCTGTC
TGGCTAACTTACGTTATGTTTCAGGGAGAAGACAGTCCTTTTTAAAGGAATGGGCCTTTCTAACTTTTTTCTCTAGGATGGAGAAAAATAGCCCTT
CTTCCCTACTTTAAAAATGTTAGACATAGAATTAAGGGATTGTTATTTTGAGATTAATTTCTTTTCTCCTATTATTTTCTCATTCTGGAATGG
AAGCAAAAGATGAAGAAAGAAATATATGTTAAATGTTTTCTTTAAATGAACAAAAATGTGAAATATGTTTTCTGCCTATCTTGTAATAATTTTC
TATTGCAACTATTCTGATTACCAGTTCAAATGGGGAAAAAAGACATAGGCTACCCCACTTGAATTTTGAATATGAATGTCTCTGTCTCTG
CTGGTCTAACACTTCCAAAATGGAACCTTTAAAGGGCCACTGTAATTTACAGCTGCTAATTCCTGGTGCCAAATGGTGATAAGTGTTTACTAAACC
TAGTGAGTACTTTATAGCATGGGGCTCTGCTGCGAAGTAACATTGCTGTATATTTTCAGTCATTCTACCTTAATTCATGAACTGCAAAACTCTCAT
CTAGCTTTTTACTTCTTAGCTATTGCTTTAAGTTCTATCAGGCTCAGGTGTGGAATTC
```

Insertion Deletion Substitution

図 46. *Tyr c.230G> T* (BC31)マウスにおけるソフトウェアの報告したコンセンサス配列  
緑の塩基は置換を示す。

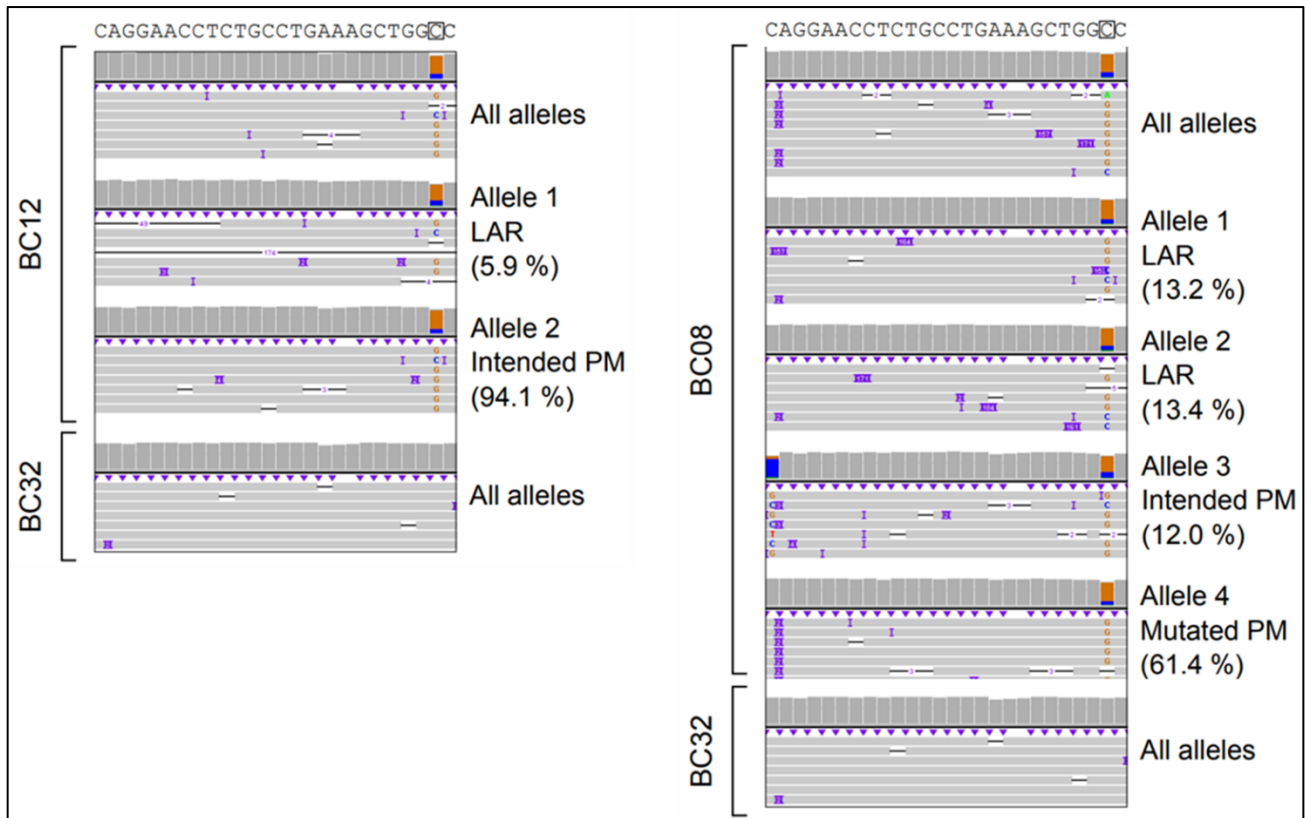


図 47. *Tyr c.140G>C* BC12 および BC08 マウスにおけるソフトウェアによる Intended PM および Mutated PM の検出

BC12 および BC08 におけるリード情報の可視化図を示す。ソフトウェアが報告したすべてのアレルタイプを示す。BC32 は WT コントロールを示す。塩基配列の黒枠の塩基は意図する塩基置換を示す。





BC21: Allele 2 Intended PM (93.6 %)

TGCATTGAAGCAGTTCACCAAAATAACAAAGTAACAAAGTAAGATATCTTTGGAATAATCAATTCAAGATAATCAAGGAAAAATGAGAGGCAACTA  
 TTTTAGACTGATTACTTTTATAAAATAAATAAGCTCAGCTTAGCCAGATATAAGCAATATCTGAGTTCTGAAGAAAAATTTTGACAAAATGAGT  
 TCTATAAATGTTATTGTCTACTTATGATCTCTAAATACAACAGGCTTGTATTCAGAACTAGATGTTTCATGACCTTTATTTCATAAGAGATGATGT  
 ATTCTTGATACTACTTCTCATTGCAAAATCCAATTATTATTAATTTTCATATCAATTAGAATAATATATCTTCCTTCAATTTAGTTACCTCACTAT  
 GGCCTATGTACAAACTCCAAGAAAAAGTTAGTCATGTGCTTGCAGAAAGTAAAGCTTAGTGTAACACAGGCTGAGAGTATTGATGTAAAGAGG  
 GGAGTGGTTATATAGGCTTAGCCAAAACATGTGATAGTCACTCCAGGGGTTGCTGGAAAAGAAAGTCTGTGACACTCATTAACTATTGGTGCAGA  
 TTTTGTATGATCTAAAGGAGAAAAATGTTCTTGGCTGTTTTGTATTGCCCTCTGTGGAGTTCCAGATCTCTGATGGCCATTTTCCTCGAGCCTGTG  
 CCTCCTTAAGAACTTGTGGCAAAGAATGCTGCCACCATGGATGGGTGATGGGAGTCCCTGCGGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCCCTGCCAGG  
 ATATCCTTCTGTCCAGTGCACCATCTGGACCTCAGTTCCCTTCAAAGGGGTGGATGACCGTGAGTCTGGCCCTCTGTGTTTTATAATAGGACCT  
 GCCAGTCTCAGGCAACTTCATGGTTTTCAACTGCGGAAACTCTAAGTTTTGGATTTGGGGCCCAAAATGTACAGAGAAGCGAGTCTTGATTAGAA  
 GAAACATTTTGTATTGAGTGTCTCCGAAAAGAATAAGTTCTATTCTTACCTCCTTTAGCAAAAACATACTATCAGCTCAGTCTATGTATCCCCA  
 CAGGCACCTATGGCCAAATGAACAATGGGTCAACACCCATGTTTAAATGATATCAACATCTACGACCTCTTGTATGGATGCATTAATATGTGTCAA  
 GGGACACACTGCTTGGGGGCTCTGAAATATGGAGGGACATTGATTTGCCCATGAAGCACCAGGGTTCTGCCTTGGCACAGACTTTTCTTGTAT  
 TGTGGGAACAAGAAATTCGAGAATAACTGGGGATGAGAAGTCTCCTGTTCCATCTGGGATGGAGAGATGCAGAAAAGTGTGACATTTGCACAG  
 ATGAGTACTTGGGAGGTCGTCACCCTGAAAATCCTAACTTACTCAGCCAGCATCCTTCTTCTCCTTGGCAGGTAAGATGCACATATATAGAGAG  
 AGTTGCAAAGACTGGTACTTACAGCCACATTTTCATGTCTGTGAGCATCTCTGATAAATATCTCAGGGCAGAAAATGTGCCTACTAACAGATG  
 TTAATGCTTCTTGATTTCTTTTCTCTTTTGGAGAAGTCTTCAAAGTTGTTATTAACAAAATATCTATGTGCTTATTTGCTTAATATCTAACAGCT  
 TAGTTAGATTTCTAAGCTGCTATAAAACAAGGACTGATTGGTTCACCCCTGTATTGTTAGCACCTCCTATGGTATCTGGAATAAACAGTAACTCAGT  
 GCGGAACTCTAAAATATAAATCTCTGGCCAAAACCAAGACTTATTTTTCAGGATCTTCAAGAGAAAGTGTGAGATAATTTACTAAGTATCAGAG  
 ATGACCTTTATTACATGATTGCCTGATAGAAAAATGATTACACACACAAAAAAATCTTCAGTTGCTTAAATTTTAAACGTTGCTGACTCTCAA  
 ACAGTTAAGTAATAAAGAGTTAAAGCCTGCTGTGATTTAGAATATCTGAATACCTATTGAAAGAATTTATGTACAAATTAATATAAACAGACTT  
 CTATTTTACAGTCATAAGATACTACTTAAATTTGTTAAAAATATTTTGGATAGCATTGTTGGTAAATAGCAAAGGTGATTTTGCTAATGATTAC  
 AAGGGCTGTCTGGCTAACTTACGTTATGTTTCAAGGAGAAGACAGTCTTTTAAAGGAATGGGCACCTTCTAACTTTTTTCTCTAGGATGGAGAAA  
 AATTAGCCTTCTCCTACTTTAAAATGTAGACATAGAATTAAGGGATGTTATTTTGGATTAATTTTCTTTTCTCCTATTTATTTTCTCCTAT  
 TCTGGAATGGAAGCAAAAGATGAAGAAAGAAATATATGTTAAATGTTTTCTTTAAATGAACACAAAATGTGAAATATGTTTTCTGCCTATCTTG  
 TAAAATTTTCTATTGCAACTATTCTGATTACCAGTTCAAATGGGGAAAAAGAACATAGGCTACCCACACTGAAAATTTTGAATATGAATGTCC  
 TCTGTCTCTGCTGGTCTAACACTTCCAAAATGGAACCTTTAAAGGGCCACTGTAAATTACAGCTGCTAATTCCTGGTGCCAAATGGTGATAAGTGT  
 TTAATAAACCTAGTGAAGTACTTTATAGCATGGGGCTCTGCTGCGAAGTAACATTGCTGTATATTTTCAGTCTTCTACCTTAATTCATGAAGTGA  
 AAACCTCATCTAGCTTTTACTTCTCTAGCTATTGCTTTAAGTTCTATCAGGCTCAGGTGTGGAATTCTC

Insertion Deletion Substitution

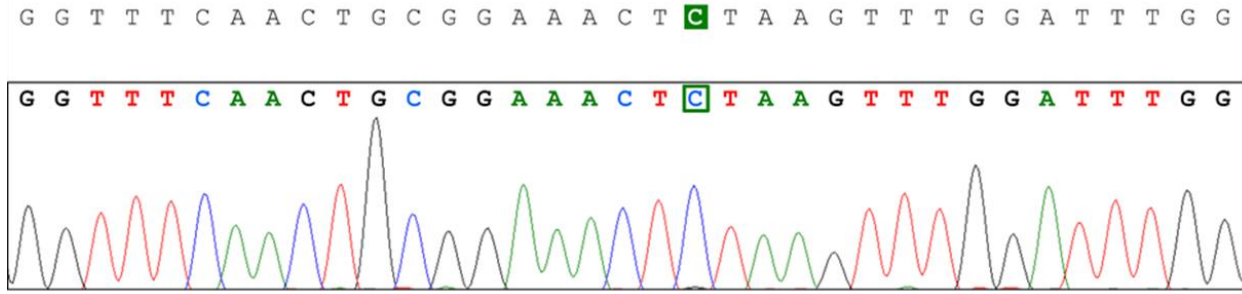


図 50. Tyr c.316G>C BC21 マウスにおけるソフトウェアが報告したコンセンサス配列とサンガーシーケンスの比較

黒枠はソフトウェアが報告したコンセンサス配列とサンガーシーケンスの間の対応する塩基を示す。コンセンサス配列の緑の塩基およびサンガーシーケンスの緑枠の塩基は意図する塩基置換を示す。



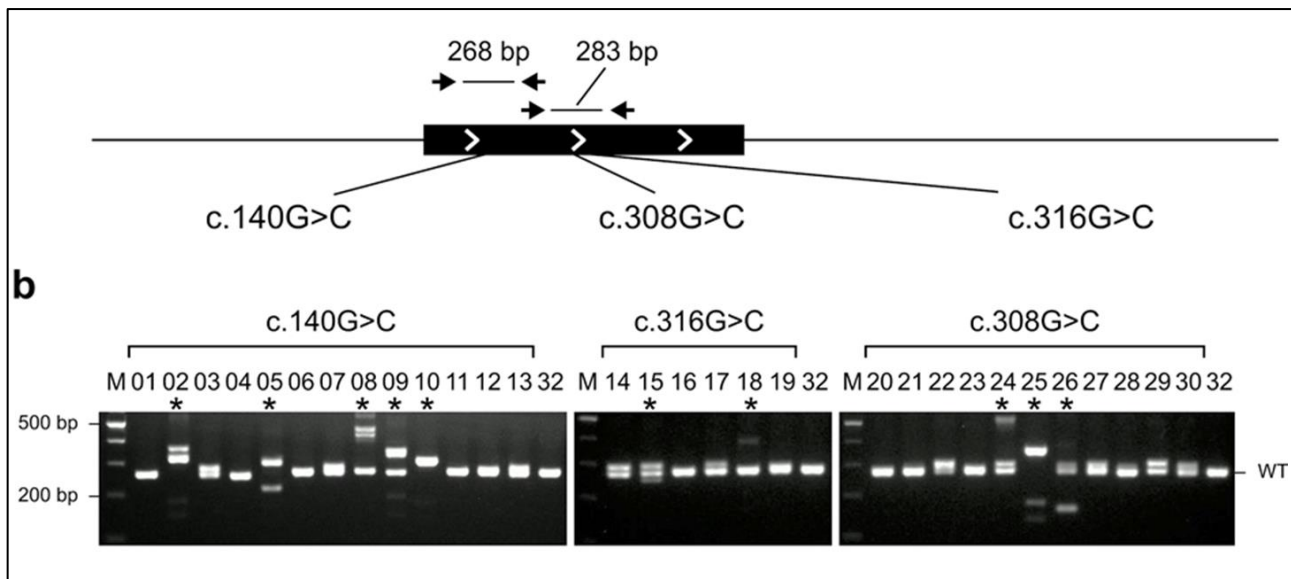


図 51. *Tyr* c.140G>C、c.316G>C、c.308G>C マウスにおける PCR 解析結果

上の図は PCR 解析デザインを示す。矢印は PCR 産物のサイズを含む PCR プライマーを示す。

下の図は電気泳動図を示す。

\*の番号は indel 変異がみられるマウス ID を示す。

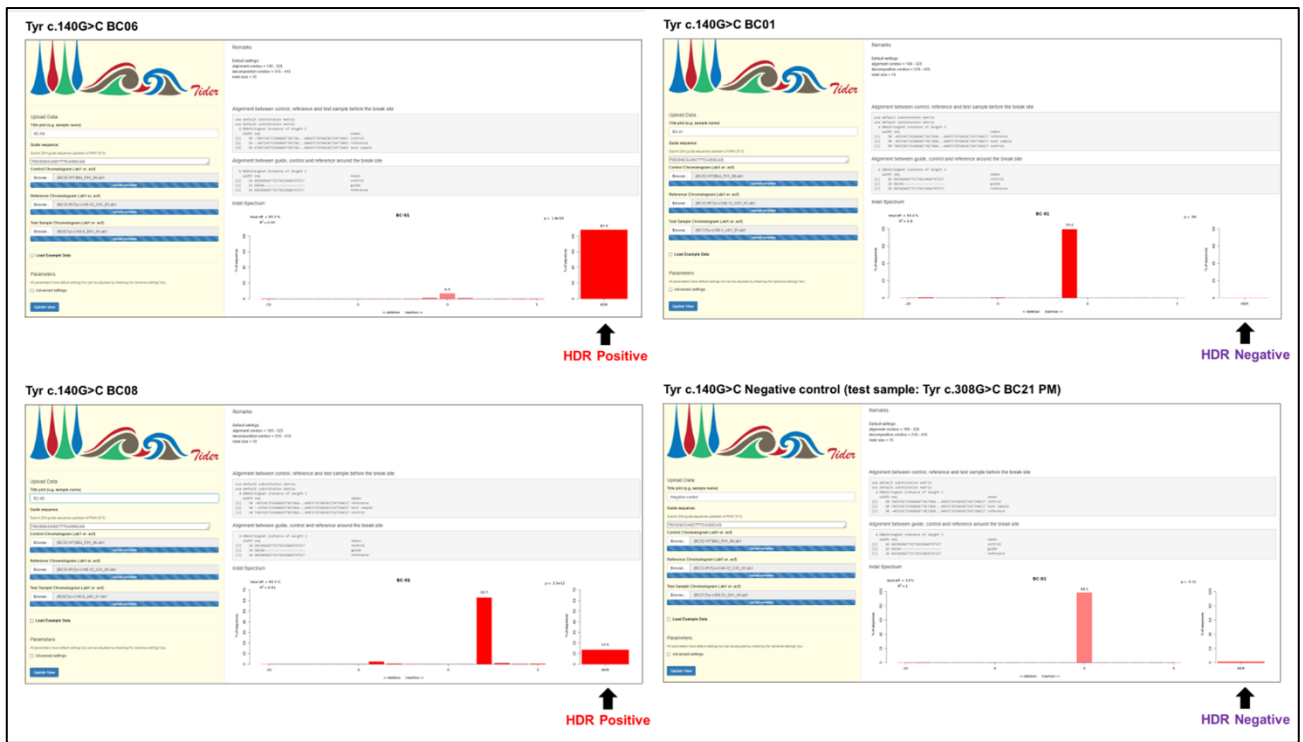


図 52. Tyr c.140G>C マウスにおける TIDER 解析結果

TIDER 解析結果の一例として、HDR Positive と判定された BC06 および BC08、HDR Negative と判定された BC01、およびネガティブコントロールの結果を示す。

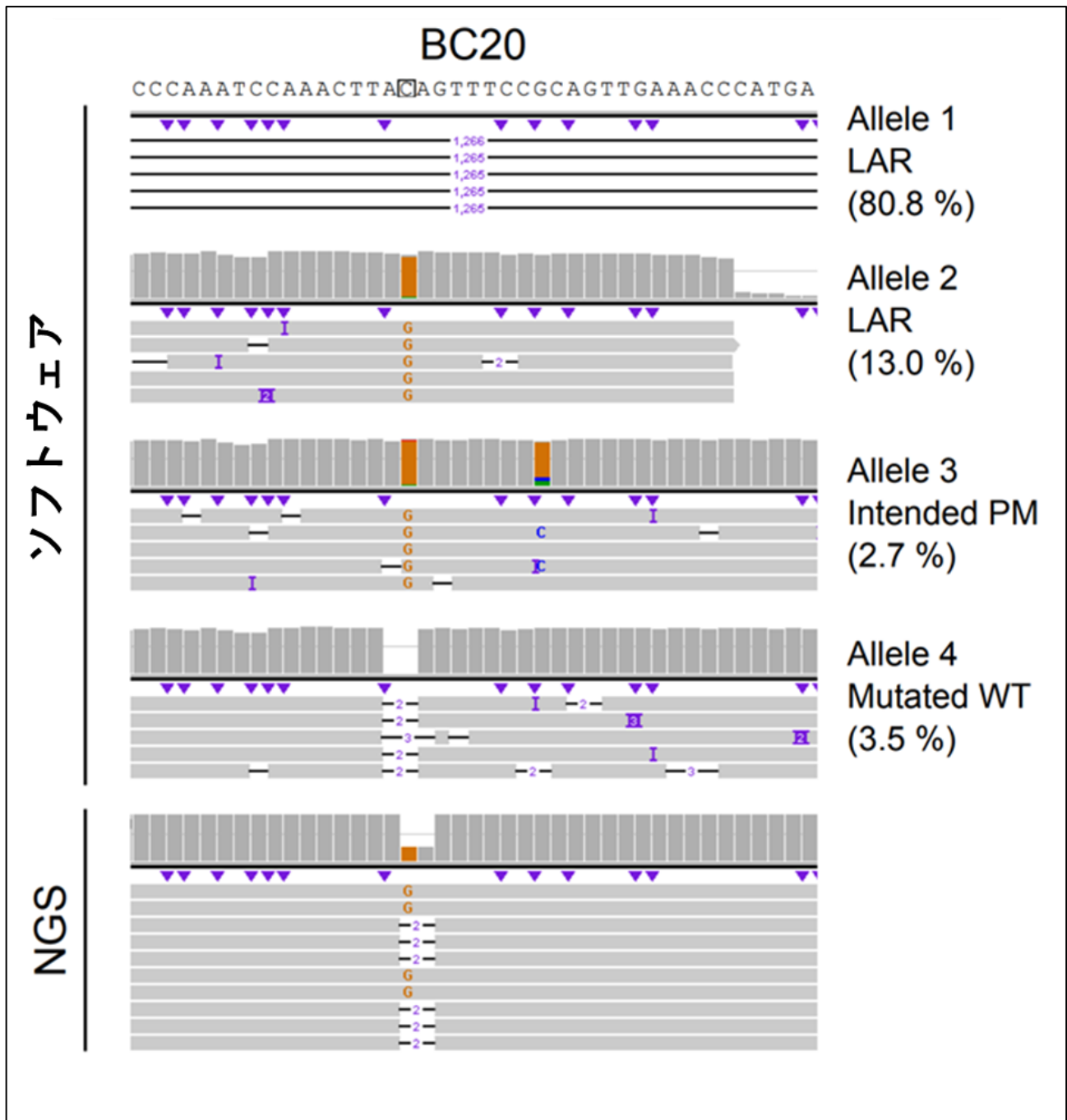


図 53. *Tyr c.308G>C* BC20 マウスにおけるソフトウェアとショートリード NGS の比較  
BC20 におけるリード情報の可視化図を示す。ソフトウェアが報告したすべてのアレルタイプおよびショートリード NGS が検出したアレルタイプを示す。



図 54. *Tyr c.308G>C* BC20 マウスにおけるサンガーシーケンスによる

4つのアレルパターンの検出

塩基の色は欠損(スカイブルー)、置換(緑)の変異のタイプを示す。塩基配列の黒い三角はゲノム DNA の接合部位(Junction site)を示す。

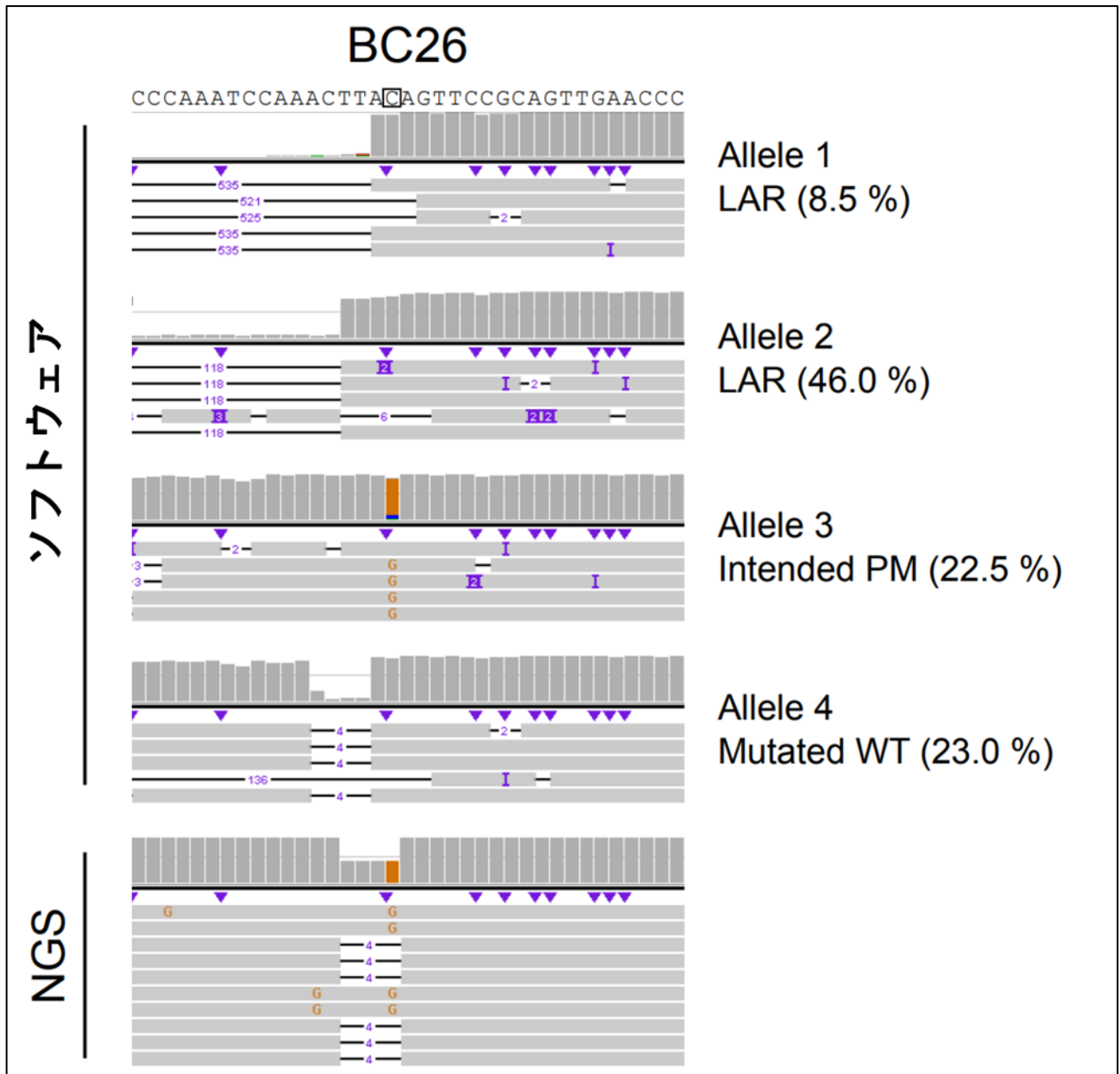


図 55. *Tyr c.308G>C* BC26 マウスにおけるソフトウェアとショートリード NGS の比較  
 BC26 におけるリード情報の可視化図を示す。ソフトウェアが報告したすべてのアレルタイプおよびショートリード NGS が検出したアレルタイプを示す。

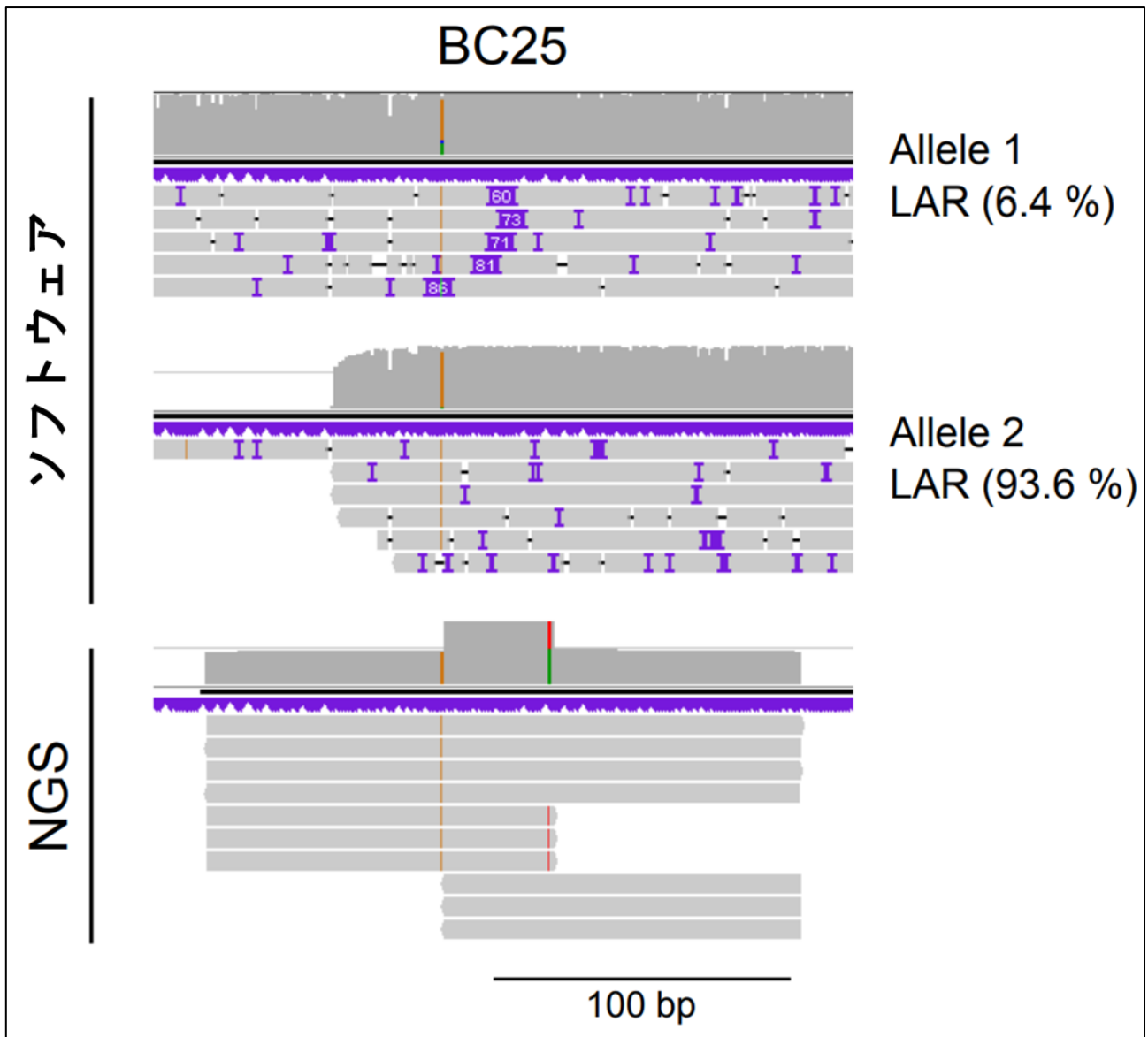


図 56. *Tyr c.308G>C* BC25 マウスにおけるソフトウェアとショートリード NGS の比較  
 BC25 におけるリード情報の可視化図を示す。ソフトウェアが報告したすべてのアレルタイプおよびショートリード NGS が検出したアレルタイプを示す。

表 1. 各標的遺伝子・塩基のゲノム編集に使用した gRNA の配列

標的遺伝子・塩基	gRNA配列
<i>Tyr</i> c.140G>C	5'-CTGCCTGAAAGCTGGCCGCA-3'
<i>Tyr</i> c.308G>C	5'-AACTGCGGAAACTGTAAGTT-3'
<i>Tyr</i> c.316G>C	5'-AACTGCGGAAACTGTAAGTT-3'
<i>Stx2</i>	Left: 5'-CATAAAGTGGTTGCGCTCTT-3'
	Right: 5'-GCAGATGTGATGCTCGGCTG-3'
<i>Prdm14 (Cas9)</i>	Left: 5'-GTATCCAGGAACATCTTGAG-3'
	Right: 5'-TGACTATCTAGAGCCTGACC-3'
<i>Prdm14 (Cas12a)</i>	Left: 5'-ACAGTTATGTGTTTGCCAAGT-3'
	Right: 5'-TTCCACACCCGGTCAGGCTCT-3'
<i>Ddx4 (Cas9)</i>	Left: 5'-AGCTGCCAGTCGTCTCGAA-3'
	Right: 5'-GCTGTATAAACTAACCAGAA-3'
<i>Ddx4 (Cas12a)</i>	Left: 5'-ACAACACAGTATTTACCAGAG-3'
	Right: 5'-CCTGCTGGGCTGTCTTGATGACC-3'
<i>Cables2</i>	Left: 5'-GGCTATCTCCCACTCTGGAC-3'
	Right: 5'-GGGTTACCCACAGCTAGCAG-3'
<i>Usp46</i>	Left: 5'-ACTCAAGCAAGTAAGAGGAT-3'
	Right: 5'-GAAGAAAACGGCAATGTCAT-3'
<i>Exoc7</i>	Left: 5'-TCATAGTTGTACGTCTCACT-3'
	Right: 5'-CTGGGGGATACAGCAACAGT-3'

( )はゲノム編集に使用した Cas タンパクを示す

表 2. *Tyr* 遺伝子のゲノム編集に使用した ssDNA 配列

標的遺伝子・塩基	ssDNA配列
<i>Tyr</i> (c.140G>C)	5'-gtgcactggacagaaggatatcctggcaggaacctctgcctgaaagctgg Gcgcagggactcccatcacccatccatggtgggcagcattctttgccaac-3'
<i>Tyr</i> (c.308G>C)	5'-taggacctgccagtgctcaggcaacttcatgggttcaactgcggaaact Ctaagtttgattggggggcccaaattgtacagagaagcgagtcttgatta-3'
<i>Tyr</i> (c.316G>C)	5'-gccagtgctcaggcaacttcatgggttcaactgcggaaactgtaagttt Cgatttggggggcccaaattgtacagagaagcgagtcttgattagaagaac-3'



表 3. ナノポアシーケンスライブラリ調製に使用した  
ターゲットアンプリコンプライマーの配列

系統	標的遺伝子	Primer	Primer配列
PM	<i>Tyr</i>	Forward primer	TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCTGCATTGAAGCAGTTCACCAAATAACA
PM	<i>Tyr</i>	Reverse primer	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCGAGAATTCCACACCTGAGCCTGATAGAA
PM	<i>Stx2</i>	Forward primer	TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCGCTCCAGGGTGTCTCATAGTGTGTTGAAG
KO	<i>Stx2</i>	Reverse primer	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCACACAGTAATGTGGCAGAAATGTGATGC
KO	<i>Prdm14</i>	Forward primer	TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCTTGTACTCAAACCTTCTGCCCAACT
KO	<i>Prdm14</i>	Reverse primer	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCCTCTGGACATGACTGTTAGGGAAAGCAC
KO	<i>Ddx4</i>	Forward primer	TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCTACAGCTTGTCTGAAGGAGGCTTGGATA
KO	<i>Ddx4</i>	Reverse primer	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCCTCATACGAGACTACATGCCAGCAACAC
Flox	<i>Cables2</i>	Forward primer	TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCGGCAAGAACGACCTGCTTTTTACCTTAC
Flox	<i>Cables2</i>	Reverse primer	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCGCCATGGCTGTCATTCTTGTGTATAACC
Flox	<i>Exoc7</i>	Forward primer	TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCGGCTCTAACCTCATTCTCTGGAAGGTA
Flox	<i>Exoc7</i>	Reverse primer	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCAGTGACAAGAACAACCTGGCAATTCAGG
Flox	<i>Usp46</i>	Forward primer	TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCACTCTGGGGAAGGATTGTAAGGGTAAA
Flox	<i>Usp46</i>	Reverse primer	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCTGGGTTTAGCAGTTGGGATAAATGACAG

赤字は共通配列を示す

表 4. ナノポアシーケンスライブラリ調製で実施した

1 st PCR の反応組成液および反応条件

試薬・テンプレート	添加量(μL)
蒸留水	7.4
2xPCR buffer for KOD -Multi & Epi	10
10μM Forward primer	0.6
10μM Reverse primer	0.6
1.0 U/μL KOD -Multi & Epi-®	0.4
ゲノムDNA	1
合計	20

*Cables2* flox

ステップ	温度条件	反応時間	
1	98°C	2分	
2	98°C	15秒	ステップ2~3を 30回繰り返す
3	68°C	2分	
4	68°C	5分	
5	4°C	∞	

*Exoc7* flox

ステップ	温度条件	反応時間	
1	98°C	2分	
2	98°C	15秒	ステップ2~3を 32回繰り返す
3	68°C	2.5分	
4	68°C	5分	
5	4°C	∞	

*Usp46* flox

ステップ	温度条件	反応時間	
1	98°C	2分	
2	98°C	15秒	ステップ2~3を 32回繰り返す
3	68°C	2分	
4	68°C	5分	
5	4°C	∞	

*Prdm14* KO

ステップ	温度条件	反応時間	
1	98°C	2分	
2	98°C	15秒	ステップ2~3を 32回繰り返す
3	68°C	3分	
4	68°C	5分	
5	4°C	∞	

*Ddx4* KO

ステップ	温度条件	反応時間	
1	98°C	2分	
2	98°C	15秒	ステップ2~3を 32回繰り返す
3	68°C	3分	
4	68°C	5分	
5	4°C	∞	

*Stx2* KO

ステップ	温度条件	反応時間	
1	98°C	2分	
2	98°C	15秒	ステップ2~3を 32回繰り返す
3	68°C	3分	
4	68°C	5分	
5	4°C	∞	

*Tyr* PM

ステップ	温度条件	反応時間	
1	98°C	2分	
2	98°C	15秒	ステップ2~3を 32回繰り返す
3	68°C	2分	
4	68°C	5分	
5	4°C	∞	

表 5-1. ナノポアシーケンスライブラリ調製に使用した  
 バーコードアタッチメントプライマーForward(Fwd)の配列

バーコード No-Forward(Fwd)	Primer配列
barcode01-Fwd	AAGAAAGTTGTCGGTGTCTTTGTGTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode02-Fwd	TCGATTCCGTTTGTAGTCGTCTGT TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode03-Fwd	GAGCTTGTGTCCCAGTTACCAGGTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode04-Fwd	TTCCGATTCTATCGTGTTCCTA TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode05-Fwd	CTTGTCCAGGTTTGTGTAACCTT TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode06-Fwd	TTCTCGCAAAGGCAGAAAGTAGTC TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode07-Fwd	GTGTTACCGTGGGAATGAATCCTT TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode08-Fwd	TTCAGGGAACAAACCAAGTTACGT TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode09-Fwd	AACTAGGCACAGCGAGTCTTGTT TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode10-Fwd	AAGCGTTGAAACCTTTGTCCTCTC TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode11-Fwd	GTTTCATCTATCGGAGGGAATGGA TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode12-Fwd	CAGGTAGAAAGAAGCAGAATCGGA TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode13-Fwd	AGAACGACTTCCATACTCGTGTGA TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode14-Fwd	AACGAGTCTCTTGGACCCATAGA TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode15-Fwd	AGGTCTACCTCGCTAACACCACTG TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode16-Fwd	CGTCAACTGACAGTGGTTCGTA TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode17-Fwd	ACCCTCCAGGAAAGTACCTCTGAT TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode18-Fwd	CCAAACCCAAACCTAGATAGGC TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode19-Fwd	GTTCCCTCGTGCAGTGTCAAGAGAT TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode20-Fwd	TTGCGTCCTGTTACGAGAATCAT TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode21-Fwd	GAGCCTCTCATTGTCCGTTCTCTA TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode22-Fwd	ACCACTGCCATGTATCAAAGTACG TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode23-Fwd	CTTACTACCCAGTGAACCTCCTCG TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode24-Fwd	GCATAGTTCTGCATGATGGGTTAG TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode25-Fwd	GTAAGTTGGGTATGCAACGCAATG TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode26-Fwd	CATACAGCGACTACGCATTCTCAT TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode27-Fwd	CGACGGTTAGATTCACCTCTTACA TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode28-Fwd	TGAAACCTAAGAAGGCACCGTATC TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode29-Fwd	CTAGACACCTTGGGTTGACAGACC TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode30-Fwd	TCAGTGAGGATCTACTTCGACCCA TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode31-Fwd	TGCGTACAGCAATCAGTTACATTG TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode32-Fwd	CCAGTAGAAGTCCGACAACGTCAT TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode33-Fwd	CAGACTTGGTACGGTTGGGTAAC TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode34-Fwd	GGACGAAGAACTCAAGTCAAAGGC TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode35-Fwd	CTACTTACGAAGCTGAGGGACTGC TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode36-Fwd	ATGTCCCAGTTAGAGGAGGAAACA TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode37-Fwd	GCTTGCGATTGATGCTTAGTATCA TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode38-Fwd	ACCACAGGAGGACGATACAGAGAA TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode39-Fwd	CCACAGTGTCAACTAGAGCCTCTC TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode40-Fwd	TAGTTTGATGACCAAGGATAGCC TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode41-Fwd	GGAGTTCGTCCAGAGAAGTACACG TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode42-Fwd	CTACGTGTAAGGCATACCTGCCAG TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode43-Fwd	CTTTCGTTGTTGACTCGACGGTAG TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode44-Fwd	AGTAGAAAGGTTCCCTTCCACTC TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode45-Fwd	GATCCAACAGAGATGCCTCAGTG TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode46-Fwd	GCTGTGTTCCACTTCATTCTCCTG TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode47-Fwd	GTGCAACTTCCACAGGTAGTTC TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC
barcode48-Fwd	CATCTGGAACGTGGTACACCTGTA TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC

赤字は共通配列を示す

表 5-2. ナノポアシーケンスライブラリ調製に使用した  
 バーコードアタッチメントプライマーReverse(Rev)の配列

バーコード No-Reverse(Rev)	Primer配列
barcode01-Rev	CACAAAGACACCGACAACCTTTCTTACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode02-Rev	ACAGACGACTACAAACGGAATCGAACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode03-Rev	CCTGGTAACTGGGACACAAGACTCACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode04-Rev	TAGGGAACACGATAGAATCCGAAACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode05-Rev	AAGGTTACACAAACCCTGGACAAGACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode06-Rev	GACTACTTTCTGCCTTTGCGAGAAACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode07-Rev	AAGGATTCATTCCCACGGTAACACACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode08-Rev	ACGTAACCTGGTTTGTCCCTGAAACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode09-Rev	AACCAAGACTCGCTGTGCCTAGTTACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode10-Rev	GAGAGGACAAAGGTTTCAACGCTTACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode11-Rev	TCCATTCCCTCCGATAGATGAAACACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode12-Rev	TCCGATTCTGCTTCTTTCTACCTGACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode13-Rev	TCACACGAGTATGGAAGTCGTTCTACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode14-Rev	TCTATGGGTCCCAAGAGACTCGTTACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode15-Rev	CAGTGGTGTAGCGAGGTAGACCTACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode16-Rev	AGTACGAACCACTGTCAGTTGACGACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode17-Rev	ATCAGAGTACTTTCCTGGAGGGTACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode18-Rev	GCCTATCTAGTTGTTGGTTTGGACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode19-Rev	ATCTCTTGACACTGCACGAGGAACACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode20-Rev	ATGAGTTCTCGTAACAGGACGCAAACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode21-Rev	TAGAGAACGGACAATGAGAGGCTCACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode22-Rev	CGTACTTTGATACATGGCAGTGGTACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode23-Rev	CGAGGAGTTCACTGGTAGTAAGACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode24-Rev	CTAACCATCATGCAGAACTATGCACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode25-Rev	CATTGCGTGCATACCCAACCTTACACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode26-Rev	ATGAGAATGCGTAGTCGCTGTATGACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode27-Rev	TGTAAGAGGTGAATCTAACCGTCGACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode28-Rev	GATACGGTGCCTTCTTAGGTTTCAACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode29-Rev	GGTCTGTCAACCAAGGTGTCTAGACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode30-Rev	TGGGTGCAAGTAGATCCTCACTGAACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode31-Rev	CAATGTAACCTGATTGCTGTACGCAACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode32-Rev	ATGACGTTGTCGGACTTCTACTGGACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode33-Rev	AGTTACCAACCGTACCAAGTCTGACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode34-Rev	GCCTTTGACTTGAGTTCTTCGTCCACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode35-Rev	GCAGTCCCTCAGCTTCGTAAGTAGACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode36-Rev	TGTTTCCTCCTCTAACTGGGACATACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode37-Rev	TGATACTAAGCATCAATCGCAAGCACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode38-Rev	TTCTCTGTATCGTCCTCCTGTTACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode39-Rev	GAGAGGCTCTAGTTGACACTGTGGACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode40-Rev	GGCTATCCTTGGTCATCCAAACTACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode41-Rev	CGTGTACTTCTCTGGACGAACTCCACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode42-Rev	CTGGCAGGTATGCCTTACACGTAGACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode43-Rev	CTACCGTCGAGTCAACAACGAAAGACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode44-Rev	GAGTGGGAAGGAACCCTTTCTACTACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode45-Rev	CACTGAAGGCATCTCTGTTGGATCACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode46-Rev	CAGGAGAATGAAGTGAACACAGCACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode47-Rev	GAACCTACCTGTGGGAAAGTTGCACACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC
barcode48-Rev	TACAGGTGTACCAGTTCCAGATGACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC

赤字は共通配列を示す

表 6. ナノポアシーケンスライブラリ調製で実施した

Nested PCR の反応組成液および反応条件

試薬・テンプレート	添加量(μL)
蒸留水	11.4
2xPCR buffer for KOD -Multi & Epi	15
5μM Forward primer	1
5μM Reverse primer	1
1.0 U/μL KOD -Multi & Epi-®	0.6
5倍希釈 1st PCR産物	1

合計

30

*Cables2* flox

*Exoc7* flox

*Usp46* flox

ステップ	温度条件	反応時間	
1	94°C	2分	
2	98°C	10秒	ステップ2~4を 23回繰り返す
3	63°C	30秒	
4	68°C	分	
5	68°C	5分	
6	4°C	∞	

ステップ	温度条件	反応時間	
1	94°C	2分	
2	98°C	10秒	ステップ2~4を 20回繰り返す
3	63°C	30秒	
4	68°C	2.5分	
5	68°C	5分	
6	4°C	∞	

ステップ	温度条件	反応時間	
1	94°C	2分	
2	98°C	10秒	ステップ2~4を 18回繰り返す
3	63°C	30秒	
4	68°C	2分	
5	68°C	5分	
6	4°C	∞	

*Prdm14* KO

*Ddx4* KO

*Stx2* KO

ステップ	温度条件	反応時間	
1	94°C	2分	
2	98°C	10秒	ステップ2~4を 18回繰り返す
3	63°C	30秒	
4	68°C	3分	
5	68°C	5分	
6	4°C	∞	

ステップ	温度条件	反応時間	
1	94°C	2分	
2	98°C	10秒	ステップ2~4を 18回繰り返す
3	63°C	30秒	
4	68°C	3分	
5	68°C	5分	
6	4°C	∞	

ステップ	温度条件	反応時間	
1	94°C	2分	
2	98°C	10秒	ステップ2~4を 18回繰り返す
3	63°C	30秒	
4	68°C	3分	
5	68°C	5分	
6	4°C	∞	

*Tyr* PM

ステップ	温度条件	反応時間	
1	94°C	2分	
2	98°C	10秒	ステップ2~4を 18回繰り返す
3	63°C	30秒	
4	68°C	2分	
5	68°C	5分	
6	4°C	∞	

表 7. 従来の遺伝型解析の PCR に使用したプライマー配列

PCR-RFLP			
系統	標的遺伝子	Primer	Primer配列
Flox	<i>Cables2 Left LoxP</i>	Forward primer	GGCAAGAACGACCTGCTTTTTACCTTAC
Flox	<i>Cables2 Left LoxP</i>	Reverse primer	CTTGCTCCCAATACTGTGCCTTAATGTG
Flox	<i>Cables2 Right LoxP</i>	Forward primer	AGTTAAGATACAGGCTGCCCTCAGGCTA
Flox	<i>Cables2 Right LoxP</i>	Reverse primer	GCCTGACAATTGTAGCAAGTTCAGAAGG
Flox	<i>Exoc7 Left LoxP</i>	Forward primer	GGCTCTAACCTCATTCTCTGGAAGGTA
Flox	<i>Exoc7 Left LoxP</i>	Reverse primer	AGGGAGGGGTAGACCTGTATCAAGGAGT
Flox	<i>Exoc7 Right LoxP</i>	Forward primer	CAAGTCAAGATGCTCCCAAGGTAACAGA
Flox	<i>Exoc7 Right LoxP</i>	Reverse primer	AGGACTCAAGTGAGAGCTCAAGCAGAGA
Flox	<i>Usp46 Left LoxP</i>	Forward primer	CACTCTGGGGAAGGATTGTAAGGGTAAA
Flox	<i>Usp46 Left LoxP</i>	Reverse primer	ACCCAGGTGAGTTCTGGCTTATTGTTCT
Flox	<i>Usp46 Right LoxP</i>	Forward primer	TCCTTGATGTTTCTCTCAGTGTTGGA
Flox	<i>Usp46 Right LoxP</i>	Reverse primer	CCTTGTCAGAAGCCAACAACGTAGACTC

PCR			
系統	標的遺伝子・塩基	Primer	Primer配列
PM	<i>Tyr c.140 G&gt;C</i>	Forward primer-1	ATCTCTGATGGCCATTTTCCT
PM	<i>Tyr c.140 G&gt;C</i>	Reverse primer-1	AGATGGTGCCTGGACAGAAG
PM	<i>Tyr c.140 G&gt;C</i>	Forward primer-2	TGGCTGTTTTGTATTGCCTTC
PM	<i>Tyr c.140 G&gt;C</i>	Reverse primer-2	GAGCACTGGCAGGTCCTATTA
PM	<i>Tyr c.316 G&gt;C, c308 G&gt;C</i>	Forward primer-1	TCCTGGCCCTCTGTGTTTTAT
PM	<i>Tyr c.316 G&gt;C, c308 G&gt;C</i>	Reverse primer-1	TTTTCGGAGACACTCAAATCAA
PM	<i>Tyr c.316 G&gt;C, c308 G&gt;C</i>	Forward primer-2	CTTCTGTCCAGTGCACCATCT
PM	<i>Tyr c.316 G&gt;C, c308 G&gt;C</i>	Reverse primer-2	TGGGGATGACATAGACTGAGC
KO	<i>Stx2</i>	Forward primer	GCCCAGCTGACATGTGTTTTA
KO	<i>Stx2</i>	Reverse primer	TATAGGTAGCCGAGTCGCTGA
KO	<i>Prdm14</i>	Forward primer	AGGGCTCTTAGCTTTGATTGC
KO	<i>Prdm14</i>	Reverse primer	TGTAGCCTTCCATTCTTTGGA
KO	<i>Ddx4</i>	Forward primer	TTTTGTACAAGGAACCAAGG
KO	<i>Ddx4</i>	Reverse primer	CAGAAGGTGCTTTTAACCTGAG

Inversionを検出するPCR			
系統	標的遺伝子	Primer	Primer配列
Flox	<i>Cables2-Left side</i>	Forward primer	AGGCCTACGGATCAGGTAAGA
Flox	<i>Cables2-Left side</i>	Reverse primer	CCCTTCTCCTGTTTTGAGGAC
Flox	<i>Cables2-Right side</i>	Forward primer	GCACCTGTCTGCCTAACTCTG
Flox	<i>Cables2-Right side</i>	Reverse primer	GCATAAGACACGACCTGGAAA
KO	<i>Stx2-Left side</i>	Forward primer	GGGTGTGGAAGTTGGTACCTT
KO	<i>Stx2-Left side</i>	Reverse primer	TCTTGGTGACTCTGTCCTGCT

表 8. ショートリード NGS に使用したプライマー配列

Forward primer	Primer配列
<i>Tyr-c.140-sNGS-sBC01-F</i>	ATGC AAGAAAGTTGTCGGTGTCTTTGTGGCCTGTGCCTCCTCTAAGAA
<i>Tyr-c.140-sNGS-sBC02-F</i>	ATGCTCGATTCCGTTTGTAGTCGTCTGTGCCTGTGCCTCCTCTAAGAA
<i>Tyr-c.140-sNGS-sBC03-F</i>	ATGCGAGTCTTGTGTCCCAGTTACCAGG GCCTGTGCCTCCTCTAAGAA
<i>Tyr-c.140-sNGS-sBC04-F</i>	ATGCTTCGGATTCTATCGTGTTCCTAGCCTGTGCCTCCTCTAAGAA
<i>Tyr-c.316-308-sNGS-sBC05-F</i>	ATGCTTTGTCCAGGGTTTGTGTAACCTTGCACCATCTGGACCTCAGTT
<i>Tyr-c.316-308-sNGS-sBC06-F</i>	ATGCTTCTCGCAAAGGCAGAAAGTAGTCGCACCATCTGGACCTCAGTT
<i>Tyr-c.316-308-sNGS-sBC07-F</i>	ATGCGTGTTACCGTGGGAATGAATCCTTGCACCATCTGGACCTCAGTT
<i>Tyr-c.316-308-sNGS-sBC08-F</i>	ATGCTTCAGGGAACAAACCAAGTTACGTGCACCATCTGGACCTCAGTT
<i>Tyr-c.316-308-sNGS-sBC09-F</i>	ATGCAACTAGGCACAGCGAGTCTTGGTTGCACCATCTGGACCTCAGTT

Reverse primer	Primer配列
<i>Tyr-c.140-sNGS-sBC01-R</i>	ATGCCACAAAGACACCGACAACCTTTCTTAACCCATGAAGTTGCCTGAG
<i>Tyr-c.140-sNGS-sBC02-R</i>	ATGCACAGACGACTACAAACGGAATCGAAACCCATGAAGTTGCCTGAG
<i>Tyr-c.140-sNGS-sBC03-R</i>	ATGCCCTGGTAACTGGGACACAAGACTCAACCCATGAAGTTGCCTGAG
<i>Tyr-c.140-sNGS-sBC04-R</i>	ATGCTAGGGAAACACGATAGAATCCGAAACCCATGAAGTTGCCTGAG
<i>Tyr-c.316-308-sNGS-sBC05-R</i>	ATGCAAGGTTACACAAACCCTGGACAAGTCGGAGACACTCAAATCAAAAA
<i>Tyr-c.316-308-sNGS-sBC06-R</i>	ATGCGACTACTTTCTGCCTTTGCGAGAATCGGAGACACTCAAATCAAAAA
<i>Tyr-c.316-308-sNGS-sBC07-R</i>	ATGCAAGGATTCATTCCCACGGTAACACTCGGAGACACTCAAATCAAAAA
<i>Tyr-c.316-308-sNGS-sBC08-R</i>	ATGCACGTAACCTTGGTTTGTTCCTGAATCGGAGACACTCAAATCAAAAA
<i>Tyr-c.316-308-sNGS-sBC09-R</i>	ATGCAACCAAGACTCGCTGTGCCTAGTTTCGGAGACACTCAAATCAAAAA

赤字はバーコード配列を示す

表 9. 免疫染色で使用した一次抗体および二次抗体

一次抗体	販売元	カタログ番号	希釈率
Mouse monoclonal anti-PLZF	Santa Cruz	sc-28319	1/50
Guinea pig polyclonal anti-Vimentin	PROGEN parrion for research	GP53	1/50

二次抗体	販売元	カタログ番号	希釈率
Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555	invitrogen	A31570	1/200
Goat anti-Guinea Pig IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647	invitrogen	A21450	1/100



表 10. TIDER 解析結果

<i>Tyr c.140 G&gt;C</i>	ソフトウェア判定結果	TIDER判定結果
BC1	PM negative	HDR negative
BC3	PM negative	HDR negative
BC4	PM negative	HDR negative
BC6	Mutated PM positive	HDR positive
BC7	PM negative	HDR negative
BC8	Intended PM positive	HDR positive
BC9	PM negative	HDR negative
BC11	PM negative	HDR negative
BC13	PM negative	HDR negative

<i>Tyr c.316 G&gt;C</i>	ソフトウェア判定結果	TIDER判定結果
BC14	Mutated PM positive	HDR positive
BC15	Mutated PM positive	HDR positive
BC16	PM negative	HDR negative
BC17	PM negative	HDR negative
BC19	PM negative	HDR negative

<i>Tyr c.308 G&gt;C</i>	ソフトウェア判定結果	TIDER判定結果
BC20	Intended PM positive	HDR positive
BC22	Intended PM positive	HDR positive
BC23	Intended PM positive	HDR positive
BC24	Intended PM positive	HDR positive
BC26	Intended PM positive	HDR positive
BC27	Intended PM positive	HDR positive
BC28	PM negative	HDR negative
BC29	Intended PM positive	HDR positive
BC30	Intended PM positive	HDR positive