

1. ターゲティングゲノム編集

概要

ゲノム編集は遺伝子機能の研究、ゲノム改変による欠陥遺伝子の修正、または新しい機能獲得のため強力なゲノムツールとなっています。ゲノム編集の機構は標的 DNA の配列特異的切断を含み、その修復を行う間に組み込まれた編集を行います。ゲノム編集は遺伝子ノックアウト、遺伝子活性化の制御、創薬スクリーニング、およびゲノム遺伝子座の画像化を含む様々な用途に使用されます。

標的となるゲノム編集には CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9)を含むいくつかの異なるシステムが使用されます。これらのシステムは数週間や数か月といった単位ではなく数日でゲノム編集されたコンストラクトを作成することができ、他の方法と比較して低コストであり、その応用範囲の広さにより、研究者、バイオテクノロジー企業および創薬に幅広い可能性を開きました。

目次

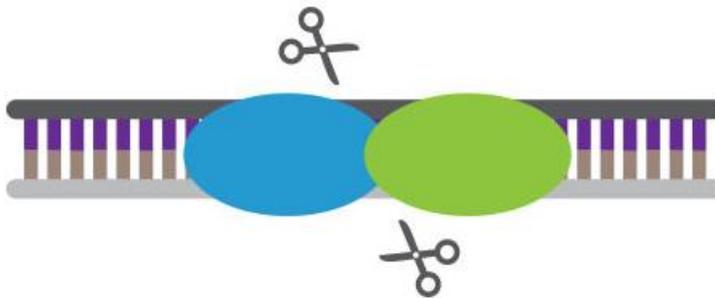
1. ターゲティングゲノム編集
 - ゲノム編集法の種類
 - ゲノム編集の CRISPR/Cas9 機構
2. ターゲティングゲノム編集アプリケーションとワークフロー
 - CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子スクリーニング
 - ターゲット遺伝子編集と幹細胞
 - CRISPR/Cas9 と遺伝子ドライブ
 - CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子活性化の調節
 - CRISPR/Cas9 を用いたエピジェネティックな編集
 - CRISPR/Cas9 と創薬
 - 治療薬としての CRISPR/Cas9
 - CRISPR/Cas9 ワークフロー
 - ワークフローオプション: ノックイン蛍光レポーターを用いた遺伝子ノックアウト
3. 参考文献

ターゲティングゲノム編集システムの分類

すべてのゲノム編集システムは、エンドヌクレアーゼによる特異的配列切断に依存しています。特異的配列ターゲティングのメカニズムには、DNA ガイドと RNA ガイドの 2 種類があります。最も一般的に使用される DNA 誘導系は、メガヌクレアーゼ(MN)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、および転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)です。最も一般的な RNA 誘導システムは、CRISPR / Cas9 系(Cas9 はエンドヌクレアーゼである)です。

メガヌクレアーゼ(Meganucleases: MN)

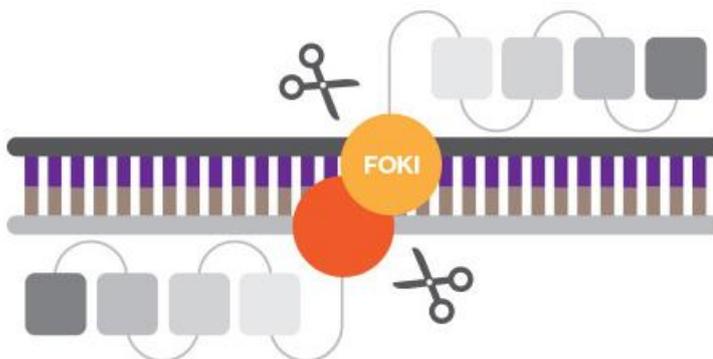
細菌中に見出されるメガヌクレアーゼ(MN)は長い認識配列を有するヌクレアーゼであり、非常に特異的です。認識配列が長いほど、オフターゲットが発生する可能性は低くなります。MN は、特定の配列を認識するように設計することができるが、費用と時間がかかります。



メガヌクレアーゼ(MN)は特異性が高く、細胞への導入も容易であるが、新しいターゲットを設計するのは難しい。

ジンクフィンガーヌクレアーゼ(Zinc Finger Nucleases :ZFN)

ZFN は、非特異的 FokI エンドヌクレアーゼの DNA 開裂部位に、配位金属イオンによって安定化された小さな構造モチーフである亜鉛フィンガー-DNA 結合ドメインを融合させることによって作製されます。ジンクフィンガーモチーフは、特定の DNA 配列に結合するように設計されており、その後ヌクレアーゼ活性部位によって切断されます。

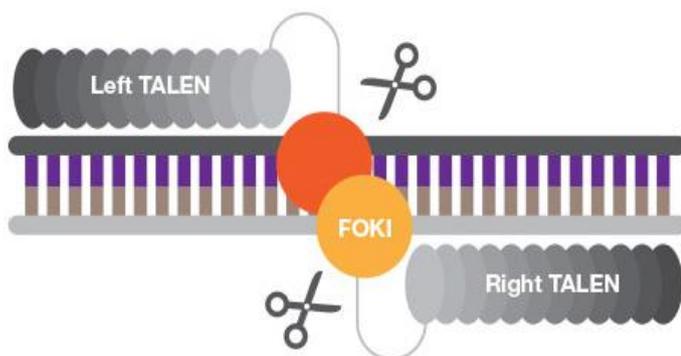


ジンクフィンガーヌクレアーゼはモジュラー性を考慮すると、予想よりも設計が困難。

転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ

(Transcription Activator-Like Effector Nucleases: TALEN)

TALEN は ZFN のように機能するキメラタンパク質ですが、配列特異的 DNA 結合ドメインは TAL (転写アクチベーター様: transcription activator-like) エフェクターであり、DNA 切断は FokI または他のヌクレアーゼの活性部位を介して起こります。ZFN では高い特異性を持ってヌクレオチド配列を認識するジンクフィンガーモチーフの設計・合成には多くのタンパク質工学処理を必要としますが、TALEN の配列特異性は2つのアミノ酸によってのみ決定されるので、TALEN は ZFN よりも作製が容易です。

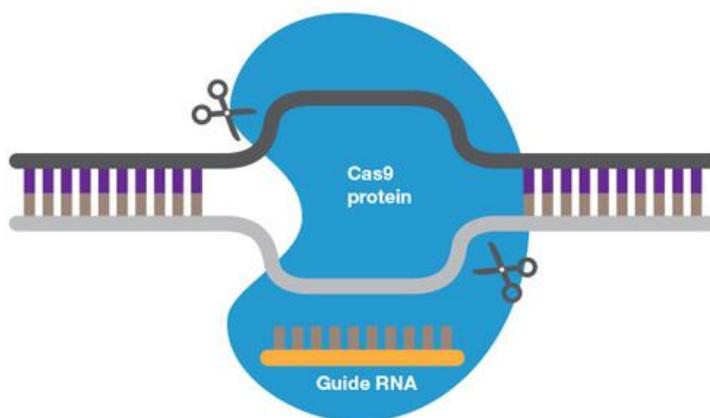


TALEN は真のモジュラー構造であり、配列によって制限されないが、サイズが大きいため細胞への導入が困難。

CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR Associated Proteins 9)

CRISPR/Cas9 標的ゲノム編集技術は原核生物においてバクテリオファージのようなウイルスとプラスミド(Horvath and Barrangou, 2010)のような外来 DNA から身を守る免疫として進化した機構です。

CRISPR/Cas9 システムはいくつかの変種があり、以下の「標的ゲノム編集の CRISPR/Cas9 機構」で説明する様々なメカニズムがあります。



ゲノム DNA と複合体を形成した CRISPR/Cas9。

遺伝子編集技術の比較

	Meganucleases	Zinc Finger Nucleases	TALENs	CRISPR/Cas9
標的部位の長さ	14 – 40 bp	18 – 36 bp per ZFN pair	28 – 40 bp per TALEN pair	19 – 22 bp
特異性	いくつかのミスマッチは許容されます	いくつかのミスマッチは許容されます	低い	多少の連続不一致への寛容さ
オフターゲット編集	低い	低から中程度	低い	付加的な相同配列がない場合によく起きる*
ターゲティングの制約	新たな特性を持たせるためのリエンジニアリングは難しい	G-リッチ領域は難しい	各 TALEN の 5' 端に T が必要	PAM** が必要
設計の容易さ	非常に困難	困難	中程度	容易
マルチプレックス	困難	困難	困難	容易
<i>in vivo</i> 導入の容易さ	小型で多くのウイルスベクターの使用可能	小型で多くのウイルスベクターの使用可能	大きなサイズはウイルスベクターを制限する。反復配列が望ましくない組換えを引き起こす	プラスミドもしくはウイルスベクター
<i>ex vivo</i> 導入の容易さ	比較的容易	比較的容易	比較的容易	比較的容易

*目的配列の上流および下流配列と相同になるようにガイド RNA(gRNA)へ配列の追加

**プロトSpacer隣接モチーフ: 標的 DNA 配列の下流の短い配列

標的ゲノム編集の CRISPR/Cas9 機構

CRISPR/Cas9 の構造および配列要件

The CRISPR/Cas9 システムは一本鎖ガイド RNA (sgRNA) と Cas9 (二本鎖ヌクレアーゼ) タンパク質で構成されています。sgRNA は、CRISPR RNA とトランス活性型 RNA (crRNA- tracrRNA もしくは trRNA) との複合体です。通常約 20bp の長さの crRNA は、ゲノムの標的領域に相補的な配列を含みかつ、特異的な編集をするために非相同配列を含みます (下記参照)。tracrRNA は crRNA にハイブリダイズして、Cas9 に結合すると、Cas9 複合体は不活性から活性型の DNA 結合コンフォメーションに変換する。crRNA に相補的な標的配列に加えて、標的配列の 3~5 ヌクレオチド下流の特異的配列であるプロトSpacer隣接モチーフ (PAM) は、Cas9 結合および DNA 切断のために必要です。異なる Cas9 ヌクレアーゼは異なる PAM 配列を有します。近接した標的配列および PAM 配列が存在する場合、CRISPR / Cas9 複合体は DNA に結合して切断し、平滑末端またはほぼ平滑末端になります。

Cas9 ニッカーゼを用いたオフターゲットの削減

CRISPR/Cas9 の相同性配列の長さは~20bp でしかないため、ゲノム上の複数の領域で同じ配列が見出されるため、1 つ以上のオフターゲットが生じる可能性が高くなります。これらのオフターゲットを低減するために、いくつかの Cas9 エンドヌクレアーゼは、DSB 活性 (Double Strand Break: 二本鎖切断) の代わりに一本鎖ニックが入る活性を有するように設計されています。2 つの CRISPR/Cas9 複合体は、一方の反対側の鎖を標的とする Cas9 ニッカーゼを用いて作製することができます。現在、2 つの異なる配列相同性が存在します (標的領域に隣接しなければならない Cas9 ごとに 1 つ) のため、オフターゲットの確率を低下させることができます。

Cas9 による切断後の DNA 修復機構

DNA 切断の後、二本鎖切断 (DSB) は、非相同末端結合 (NHEJ) または相同組換 (HDR) の 2 つの細胞機構のどちらか 1 つによって修復されます。

非相同末端結合 (non-homologous end joining : NHEJ)

NHEJ は HDR よりも効率的ですが、忠実度ははるかに低く、エラーが発生しやすくなり、結果として挿入や削除 (indels) が発生します。しかし NHEJ は、HDR より少ない相同配列しか必要とせず、修復鋳型を必要とせず、DNA 合成が少なく、迅速です。さらに、HDR とは異なり、NHEJ は細胞周期全体にわたって修復することができます。また、正確な修復の後、配列を再度切断して修復することができます。これにより異種である indel を有する細胞の割合を増加します。この修復により遺伝子機能の喪失、残存機能、または時には機能獲得をもたらす突然変異を有する細胞集団を得ることができます。NHEJ によるエラーの導入によって、ノックアウトを作成するためにコンストラクト中に非相同標的配列を有する必要はありません。

相同組換修復 (Homology Directed Repair : HDR)

HDR は NHEJ よりも長い類似性配列を必要とし、2 つの末端のライゲーションのためのわずかな相補的塩基の配列を必要とします。配列が完全に相同である場合、HDR は非常に低いエラー率で修復を行うことができます。正確な修復には、HDR に使用されるより長い配列は CRISPR / Cas9 による再切断の標的となりうるため、CRISPR / Cas9 コンストラクトにミスマッチ塩基を導入して、さらなる編集を抑制することができます。例えば、突然変異を PAM 配列に導入して Cas9 の結合を阻止することによって CRISPR/Cas9 による再切断を回避することができます。

HDR は、DSB および変更部位が 10 ヌクレオチド以内である場合に最も効率的に働きます。ゲノム編集の目的が点突然変異などの遺伝子に特定の変更を加えることである場合、CRISPR / Cas9 コンストラクトの設計は NHEJ に対して HDR を促進する必要があります。

HDR による修復を増加させるには、修復される鋳型は、標的領域の上流 (左ホモロジーアーム:left homology arm) および下流 (右ホモロジーアーム:right homology arm) の両方でより相同配列を有するように設計します。HDR は NHEJ よりも効率が悪いいため、修復の効率は低くなります。さらに、低いレベルながら NHEJ 活性があり、従って (非常に低いものの) エラーの可能性がありません。

2. ターゲティングゲノム編集アプリケーションとワークフロー

概要

ターゲティングゲノム編集は創薬を含む多くのアプリケーションに大きな影響を与えています。より低コストで早く結果が得られる実験系であり、応用範囲の広いCRISPR/Cas9コンストラクトはそれ以前のゲノム編集や干渉技術よりも詳細な分析が可能になります。制御配列と創薬候補を探すために、ゲノムの未発見な非コード領域で遺伝子発現調節、分析およびスクリーニングが急速に行われている。ゲノム編集技術により、より生理学的に関連性の高い、または各試験やその枠組みに最適な実験モデルを作成できるので、モデルシステムにおける所見が臨床試験での有効な結果を得る可能性を高めることができます。

ターゲティングゲノム編集アプリケーションとワークフロー

- CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子スクリーニング
- ターゲット遺伝子編集と幹細胞
- CRISPR/Cas9 と遺伝子ドライブ
- CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子活性化の調節
- CRISPR/Cas9 を用いたエピジェネティックな編集
- CRISPR/Cas9 と創薬
- 治療薬としての CRISPR/Cas9
- CRISPR/Cas9 ワークフロー
- ワークフローオプション: ノックイン蛍光レポーターを用いた遺伝子ノックアウト
- 参考文献

CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子スクリーニング

CRISPR/Cas9 は順遺伝学的(forward genetics)スクリーニングに非常に有効なツールです。順遺伝学的スクリーニングでは、表現型に關する遺伝子および非コード領域を同定するために突然変異を使用します。一方、逆遺伝学的(reverse genetics)スクリーニング(非編集技術を用いたスクリーニングの最も一般的なタイプ)では、特定の遺伝子を突然変異させて表現型に対する影響を観察します。順遺伝学的スクリーニングは、これまで知られていない遺伝子、遺伝子の機能、調節配列、および長鎖非コード RNA (long noncoding RNA: lncRNA) および転写に關与しない他の RNA などの調節 RNA の役割に關する情報を知ることができます。

CRISPR/Cas9 ライブラリーは大規模ゲノムスクリーニングを実施するために頻繁に用いられます。目的領域を含む重複 RNA 配列で構成されたタイリングライブラリーは、コード配列および非コード配列のスクリーニングを可能にします。表現型の変化を直接的に評価することに加えて、この種のスクリーニングを用いて薬物効果の調節について研究することができます。例えば、化学療法に対する耐性に關連する3つの遺伝子の周辺の非コード領域に対する CRISPR / Cas9 スクリーニングは、これらの遺伝子の発現に影響を及ぼす突然変異を見出しました。3つの遺伝子の内の1つの周辺配列における突然変異は、後期段階の黒色腫の治療に使用される薬剤である「ベムラフェニブ」に対する耐性を付与

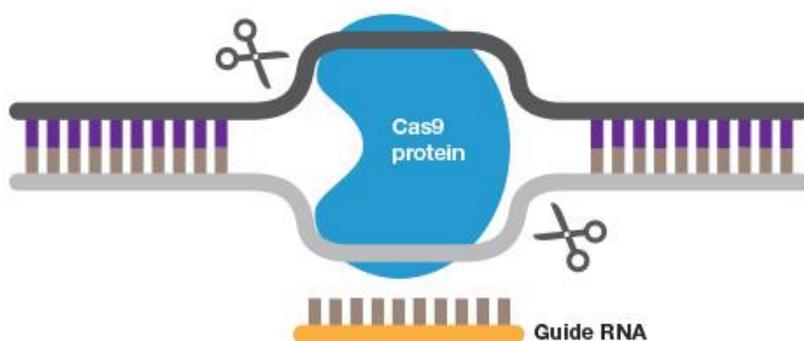
Targeted Genome Editing Application and Workflow

することが分かりました (Shalem et al. 2014)。別のアプローチでは、CRISPR / Cas9 系との非相同末端結合 (NHEJ) による修復のエラーを起こしやすい性質を用いて、MAPK、MEK1 の機能獲得および薬剤耐性変異体を同定しました (Donovan et al. 2017)。

ターゲット遺伝子編集と幹細胞

幹細胞に対するターゲティングゲノム編集は非常に活発な研究領域です。異なる種類の前駆細胞の生理学的および機能の研究に加えて、多能性幹細胞に対する遺伝子編集は、疾患モデルを開発するために活用されています。これらの疾患特異的幹細胞は疾患の理解を高め、疾患治療のための薬物およびそのほかの治療法の迅速で大規模なスクリーニングにも活用されています。細胞の3D プリントや培養の足場の開発などの最近の技術の進展はスクリーニングのための3D 組織モデルの使用を可能にしています。

幹細胞療法の一つには患者自身の幹細胞 (患者から取り出された、または以前に細胞バンクに保管された臍帯血から採取したもの) を使用して欠陥を修正し、修正した細胞を患者に注入して治療します。ターゲティング遺伝子編集技術は、突然変異を修正し、または塩基配列中の他の治療に関わる塩基変化を作成する迅速で効率的な方法を可能としています。



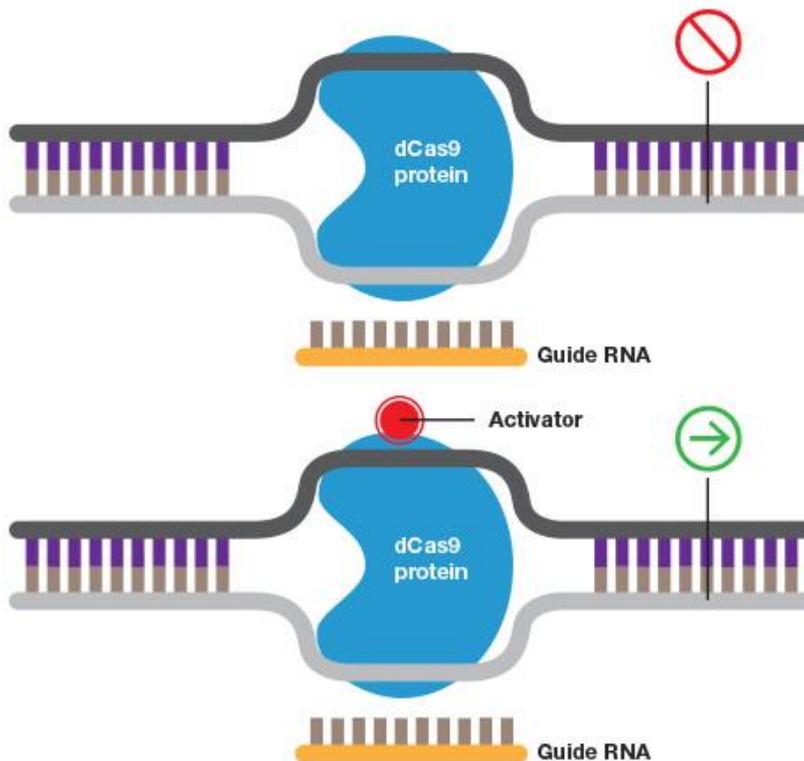
遺伝子編集: 短いガイド RNA を用いて Cas9 タンパク質を目的の配列に狙いを付けて編集することができる。Cas9 は二本鎖 DNA を切断し、非常に効率的な遺伝子編集を可能にする。

CRISPR/Cas9 と遺伝子ドライブ

遺伝子ドライブは、生物の生殖細胞系への形質の導入のためのメカニズムであり、その後、繁殖によって個体群内で活発に増殖します。ひとつの例は、マラリア原虫/熱帯熱マラリア原虫に対する耐性を蚊の胚に作り出す CRISPR / Cas9 コンストラクトの微量注入です (Gantz et al. 2015)。DNA に組み込まれた CRISPR / Cas9 コンストラクトを有する成体蚊が野生型蚊と交配すると、CRISPR / Cas9 コンストラクトを含む対立遺伝子と子孫に野生型対立遺伝子が存在します。CRISPR / Cas9 コンストラクトは、野生型親に由来する対立遺伝子を編集し、全ての子孫を寄生虫耐性についてホモ接合体にします。変化した生殖系列を持つ蚊を野に放つことは、その後の世代ごとに、寄生虫に耐性を示す蚊の割合が急速に増加する結果となります。

CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子活性化の調節

不活性化 Cas9 エンドヌクレアーゼ活性 (dCas9:nuclease-deficient Cas9 mutant) を有するコンストラクトは、遺伝子発現を活性化または抑制するために使用されています。Cas9 ヌクレアーゼ活性は結合特異性とは無関係であるので、ヌクレアーゼの活性部位に変異を有する CRISPR / dCas9 コンストラクトは依然として標的配列に結合をすることができます。転写活性化因子またはリプレッサー (Repressor) を、転写開始部位または他の調節配列を標的とする CRISPR / dCas9 コンストラクトに融合させることにより、遺伝子活性を活性化または上方制御 (CRISPRa :CRISPR activation) または下方制御 (CRISPRi :CRISPR interference) することができます。



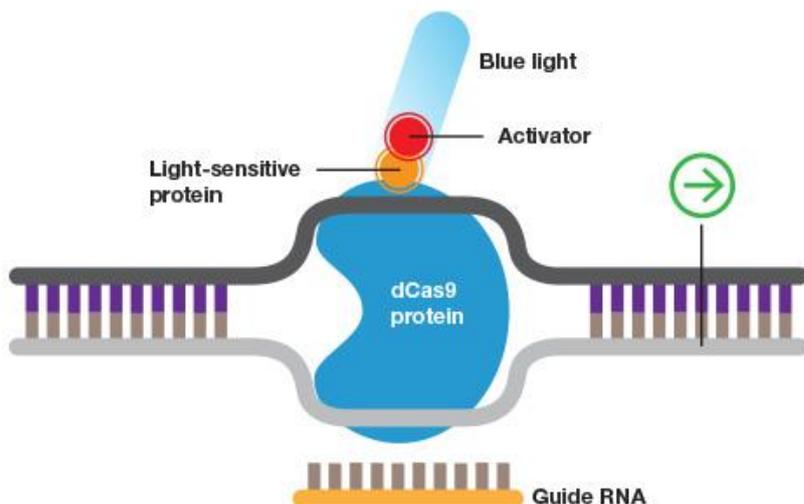
遺伝子のオン/オフを切り替える: ガイド RNA を用いて、ヌクレアーゼ活性が不活性な Cas9(dCas9)をプロモーター領域に結合させることにより転写を阻害することができます。もしくは dCas9 に活性化因子が融合されれば場合には転写を活性化することができます。

CRISPR/dCas9 が実用化される前は、転写の下方制御(ダウンレギュレーション)に使用される主な技術は RNAi でした。CRISPRi (CRISPR interference) は少なくとも RNAi と同程度の効率で転写を抑制することができます。遺伝子の上方制御(アップレギュレーション)は、以前はプロモーターおよびオープンリーディングフレームを含むコンストラクトのクローニングが必要で、さらにそのコンストラクトを細胞に導入する必要がありました。CRISPRa (CRISPR activation) の利点は細胞内にあるコンストラクトからの転写産物の増加よりも目的の内因性遺伝子が大幅にアップレギュレーションされることです。

さらに、何らかの形態の「スイッチ」構造を追加することによって、活性化または抑制を一時的に制御することができます。例えば、CRISPR/dCas9 と GFP の2つのタンパク質が二量体として融合して複合体

Targeted Genome Editing Application and Workflow

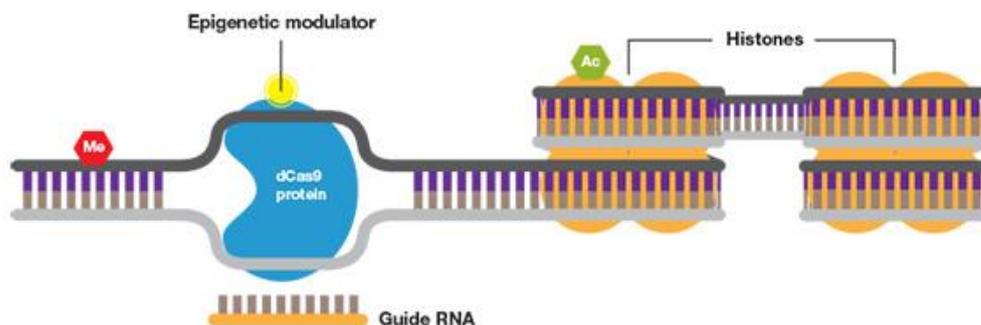
になると転写促進ドメインを活性化する光誘導システムを開発しました。このシステムは使いやすい光活性化転写システムとなりました(Polstein and Gersbach, 2015)。



誘導性 CRISPR: 野生型 Cas9 または dCas9 は、光または特定の化学物質により制御されるスイッチに融合することができる。

CRISPR/Cas9 を用いたエピジェネティックな編集

DNA 配列の変化に加えて、ヌクレオチドの修飾(例えば、シトシンメチル化およびヒストン修飾)も遺伝子発現の遺伝的変化を引き起こす可能性があります。デメチラーゼおよびアセチルトランスフェラーゼなどの酵素に融合された CRISPR / dCas9 コンストラクトを使用して、特異的修飾をターゲットとし改変することができます。これにより、個々の修飾の役割および遺伝子発現および調節に対する効果を分析する研究が可能になります。



DNA メチラーゼまたはヒストンアセチラーゼに融合させた CRISPR システムを用いて特定の DNA およびヒストン修飾の効果を研究することができる。

CRISPR/Cas9 と創薬

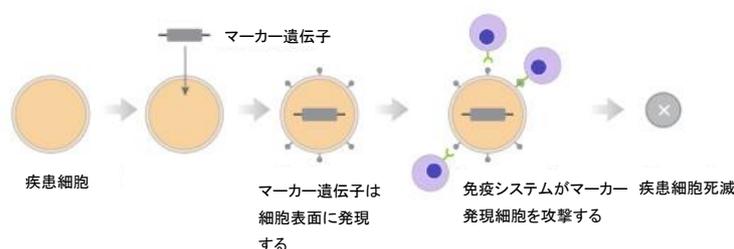
ターゲティングゲノム編集は創薬にも大きな影響を与えています。CRISPR / Cas9 コンストラクトを用いた低コストで迅速なゲノム編集は、以前の遺伝子または調節領域の編集および干渉技術よりも詳細な分析を可能にします。ゲノム編集技術を用いた分析とスクリーニングは、新薬のターゲットを探すためにゲノムの未踏領域に急速に拡大されています。

ターゲティングゲノム編集の主要な例は疾患を模倣する細胞株を樹立することです。低コストで高速な CRISPR / Cas9 システムの利点の 1 つは、幹細胞を用いて、より生理学的に関連するモデルを含む、複数のモデルを同じ疾患のために開発できることです。候補となるリード薬物がこれらすべてのモデルにおいて効果があれば、臨床試験において有効である可能性が高まります。ほとんどの候補薬は最初の臨床試験で失敗するため、これらのモデルの活用で市場に投入する候補リード薬物の割合が増加すれば、大幅なコスト削減が可能になります。

治療薬としての CRISPR/Cas9

現在の研究の方向は、CRISPR / Cas9 を直接的または間接的な治療薬として使用することです。研究分野の 1 つとしては、CRISPR / Cas9 を抗菌剤として使用できるシステムの開発が挙げられます。微生物ゲノムをターゲットとして、抗生物質耐性を付与する塩基配列または毒性・生存に必要な配列を不活性化するようにすることができます。これにより、新しい抗生物質の同定および市場投入までの時間が大幅に短縮されるはずですが、抗菌戦略の別の例は、ヘルペスウイルスのようなウイルスの複製を防ぐために臓器移植後の免疫抑制個体を治療することです。

研究対象となる標的ゲノム編集のためのデリバリーシステムは、個別化治療のための改変免疫細胞の使用です。患者から免疫細胞を採取した後、ターゲティングゲノム編集により所望の形質を細胞に導入し、そして倍加後に免疫細胞を患者に再導入します。これらの細胞は、ウイルスまたは癌細胞のような標的を攻撃するように操作することができます。



標的細胞を死滅させる自殺遺伝子として、または破壊のための特定の細胞を標識する分子ビーコンとして遺伝子導入を用いる遺伝子治療アプローチ。

[Sangamo Therapeutics 社](#)が臨床試験で現在使用しているもう 1 つのアプローチは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を使用して、HIV による感染に対する耐性を付与する遺伝子変異を導入することです。患者の免疫系 T 細胞および造血幹細胞 (T 細胞の元になる幹細胞) を編集して、CCR5 遺伝子を HIV 感染に伴う「長期間の非進行者」に見られるのと同じ突然変異でノックアウトする方法です。

Targeted Genome Editing Application and Workflow

細胞および動物モデルは、生殖細胞を編集することにより、単遺伝子疾患の標的遺伝子の突然変異を編集することの有用性を実証するために使用されています。現在、CRISPR ノックインおよびノックアウトげっ歯類は市販として入手可能であり、CRISPR / Cas9 システムは動物モデルを生殖細胞系の改変で作製する「従来の」方法を急速に置き換えています。しかしながら、ターゲティング遺伝子編集がヒトの遺伝子治療のために使用されるには、まだ多くの技術的および倫理的問題が解決されなければなりません。

CRISPR/Cas9 ワークフロー

ゲノム編集のために入手可能な多くの異なる CRISPR / Cas9 ベクターがあり、最も一般的にはプラスミドまたはウイルスです。通常、ベクターは特定タイプの編集用に設計されています。これらのベクターの多くは、編集後にゲノム編集された細胞を選択することを容易にする配列を含んでいます。その最も一般的なものは、GFP および抗生物質耐性です。GFP 蛍光はセルソーティングに使用でき、抗生物質耐性は非編集細胞を排除することができます。細胞へのコンストラクトの導入は、標準的なトランスフェクション法または形質導入法を用いて行われます。

ゲノム編集の同定および機能的アッセイ (functional assay) などのスクリーニングに使用される方法は、用途アプリケーションに依存します。塩基ミスマッチおよび小さな indels (挿入および欠失) のスクリーニングは、Surveyor アッセイ (Surveyor nuclease assay) を用いて行うことができます。野生型および編集されたゲノム DNA の両方の PCR 増幅の後、ハイブリッドヘテロ二本鎖を Surveyor ヌクレアーゼ (ミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼ) で消化し、続いてその断片を分析します。シーケンス分析は、オフターゲット編集の予測部位についての位置および周囲の配列情報を得ることができます。

最近では、デジタル PCR は、ゲノム編集の検出および定量化のために、より速く、より簡単でより感度の高い方法を提供しています (Bulletin 6712 参照)。デジタル PCR は、単離された DNA に直接使用することができ、ゲノム DNA の操作および酵素消化を不要にします。予測されたオフターゲットイベントを検出するためにデジタル PCR および Surveyor アッセイを使用することができますが、しばしば予測されなかった編集が存在することがあります。ゲノム全体に対する次世代シーケンシング (NGS) 解析は、すべての編集を検出することができます。NGS 用のデジタル PCR ライブラリー定量キットは、シーケンシングライブラリーの定量とバランスを提供し、すべてのゲノム編集が NGS で検出されることを確認することができます。

ワークフローオプション: ノックイン蛍光レポーターを用いた遺伝子ノックアウト

典型的なターゲティング遺伝子編集実験は、ノックアウトの確認と編集された細胞を選択のためにレポータータンパク質を使用します。例えば標的遺伝子を、蛍光タンパク質を発現する遺伝子で置き換えることによって、遺伝子を非機能(遺伝子ノックアウト)にするなどです。異なる手法および製品を各実験ステージで使用することができます。

実験ステージ	製品	特長
1 Transfection	Transfectin™ Lipid Reagent	<ul style="list-style-type: none"> 幅広い細胞種に低毒性で高い導入効率 広い適用細胞密度と血清有無両方に対応
	Gene Pulser Xcell™ システム	<ul style="list-style-type: none"> 初代培養から幹細胞まですべての細胞へトランスフェクト プリセット、ユーザー作成プロトコルを実装。プロトコルはプライマリーを含む多くの細胞タイプに対応
	Helios® Gene Gun システム	<ul style="list-style-type: none"> 細胞種に依存しない迅速な遺伝子銃での導入 少量の DNA しか必要とせず、キャリア DNA が不要 大きな DNA フラグメントも導入可能
	PDS-1000/He™ PDS-1000/He™ Hepta™ システム	<ul style="list-style-type: none"> 細胞もしくは組織への導入 他の方法でできない細胞の形質転換
	ZOE™ 蛍光セルイメージャー	<ul style="list-style-type: none"> トランスフェクション効率の推定 細胞増殖のモニター 細胞状態や形態の観察
2 Enrichment and single cell isolation	TC20™ 全自動セルカウンター	<ul style="list-style-type: none"> 幅広い細胞サイズと種類に対応 複数細胞集団から特定細胞集団を選択可能 複数焦点面分析による細胞生存率分析
	S3e™ セルソーター	<ul style="list-style-type: none"> 蛍光マーカーを発現する細胞をソーティング 2 方向セルソーティング
	ZE5™ Cell Analyzer	<ul style="list-style-type: none"> 多くのアプリケーションに対応するフローサイトメーター 355 から 640 nm の最大 5 レーザー異軸システム
3 Confirmation of edits	Droplet Digital™ PCR (ddPCR™)	<ul style="list-style-type: none"> 絶対定量による小規模または大規模編集の検出 NGS ライブラリーの正確な定量と適正判定 0.5%以下の存在比率の対立遺伝子の検出
	PCR 用サーマルサイクラー	<ul style="list-style-type: none"> 挿入欠失(indels)の同定 Surveyor アッセイによって編集を確認
4 Analysis	リアルタイム PCR 解析システム	<ul style="list-style-type: none"> 目的遺伝子に関連する遺伝子の転写を分析する
	PrimePCR™ PCR プライマー、アッセイ、アレイ	<ul style="list-style-type: none"> アッセイとプレートアレイ PCR もしくは ddPCR による遺伝子発現の変化を検出 設計済み/カスタムアッセイ
	Bio-Plex® マルチプレックスアッセイシステム	<ul style="list-style-type: none"> 目的細胞もしくは組織のプロテオミクス分析
	V3 Western Workflow™	<ul style="list-style-type: none"> 目的細胞もしくは組織のプロテオミクス分析

3. 参考文献

- Horvath P and Barrangou R (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327, 167–70. PMID: [20056882](#)
- [Clinical Trials](#) for targeted gene editing for resistance to HIV infection
- Donovan KF et al. (2017) Creation of novel protein variants with CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis: Turning a screening by-product into a discovery tool. *PLOS One* 12, e0170445. PMID: [28118392](#)
- Gantz VM (2015) Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112, E6736–43. PMID: [26598698](#)
- Polstein LR and Gersbach CA (2015) A light-inducible CRISPR–Cas9 system for control of endogenous gene activation. *Nat Chem Biol* 11, 198–200. PMID: [25664691](#)
- Shalem O et al. (2014) Genome-scale CRISPR–Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 343, 84–7. PMID: [24336571](#)

More Information

- [Quinlan A \(2017\). Erasing disease: How gene editing is changing genetic therapies.](#), accessed April 4, 2017
- [Quinlan A \(2016\). CRISPR: Changing the pace of BioPharma R&D.](#), accessed April 4, 2017
- [Quinlan A \(2016\). From megaTALs to CRISPR: The many ways to edit a gene.](#), accessed April 4, 2017



バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社
ライフサイエンス

www.bio-rad.com

本社	〒140-0002	東京都品川区東品川 2-2-24	Tel : 03-6361-7000	Fax : 03-5463-8480
大阪	〒532-0025	大阪市淀川区新北野 1-14-11	Tel : 06-6308-6568	Fax : 06-6308-3064
福岡	〒812-0013	福岡市博多区博多駅東 2-5-28	Tel : 092-475-4856	Fax : 092-474-5580

製品の学術的なお問い合わせは

Mail : life_ps_jp@bio-rad.com Tel : 03-6404-0331 Fax : 03-6404-0334

Z11562L 1803a