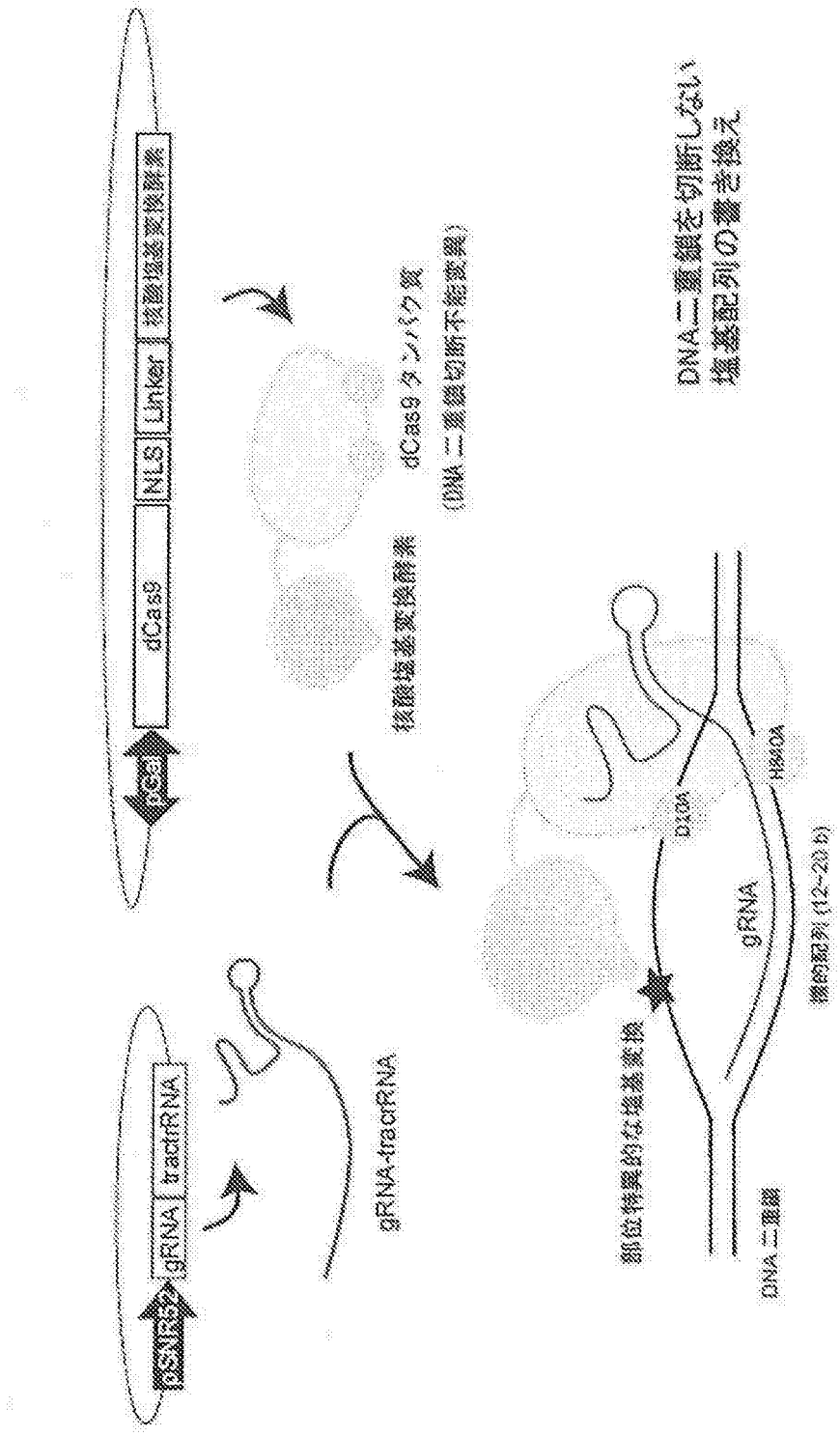
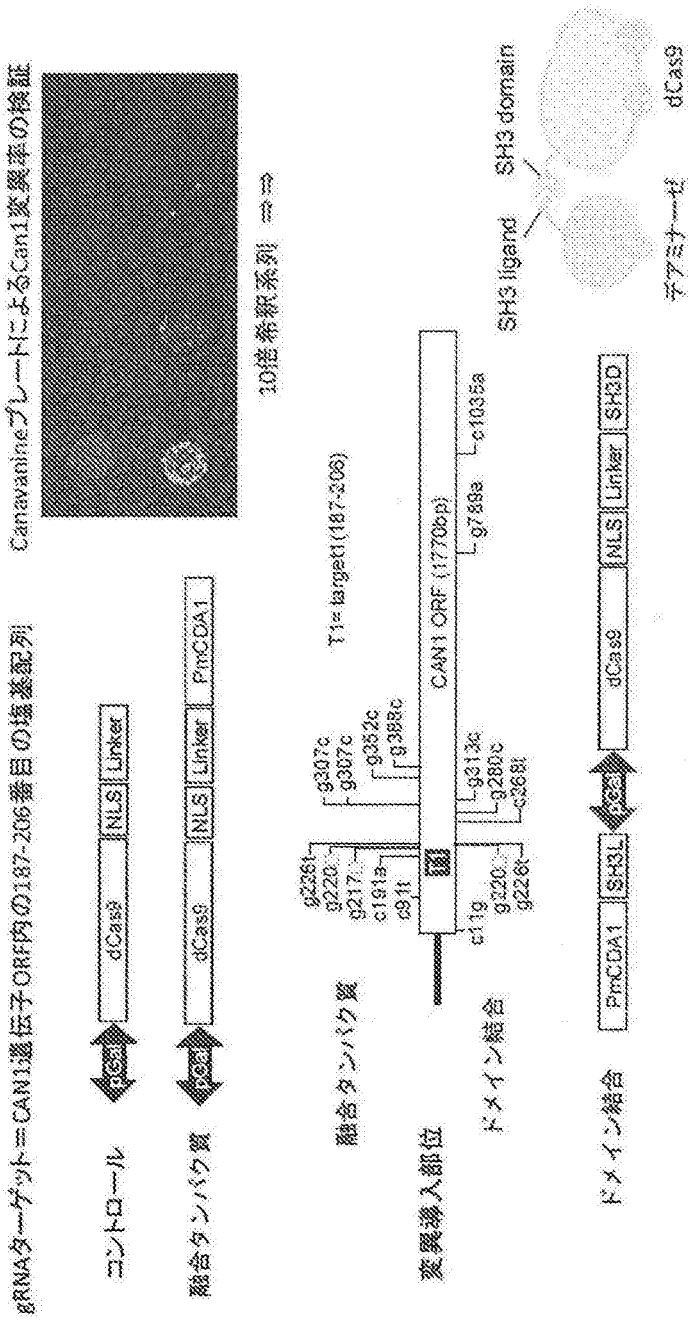
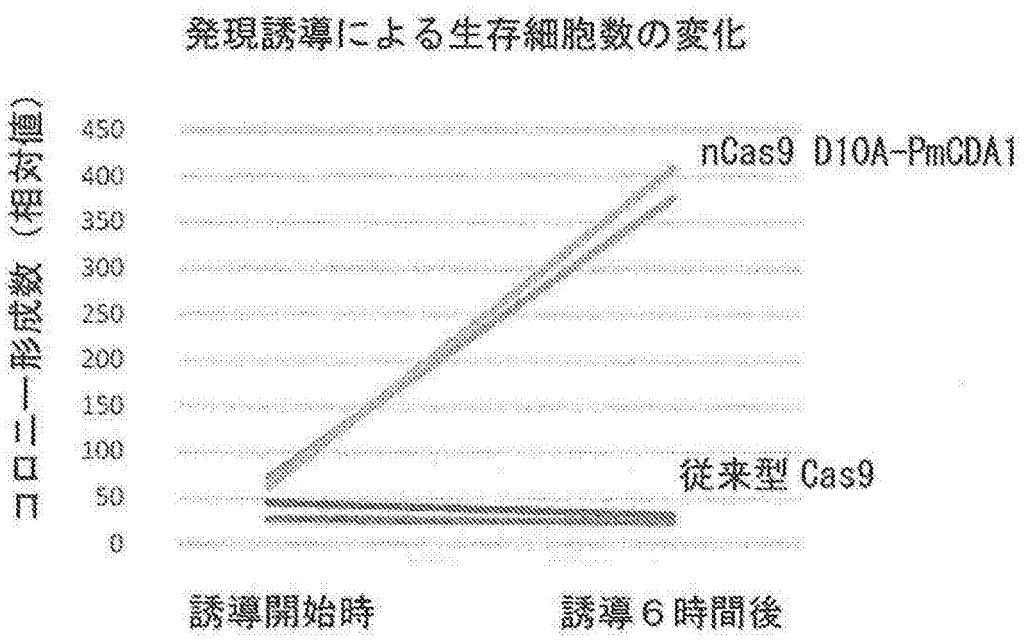
[図1]


pSNR6
gRNA
tracrRNA
gRNA-tracrRNA
pCAG
dCas9
NLS
Linker
核酸塩基変換酵素
核酸塩基変換酵素
dCas9タンパク質
(DNA二重鎖切断不能変異)
DNA二重鎖を切断しない
塩基配列の書き換え
D10A
H840A
gRNA
標的配列 (12~20 b)
部位特異的な塩基変換
DNA二重鎖

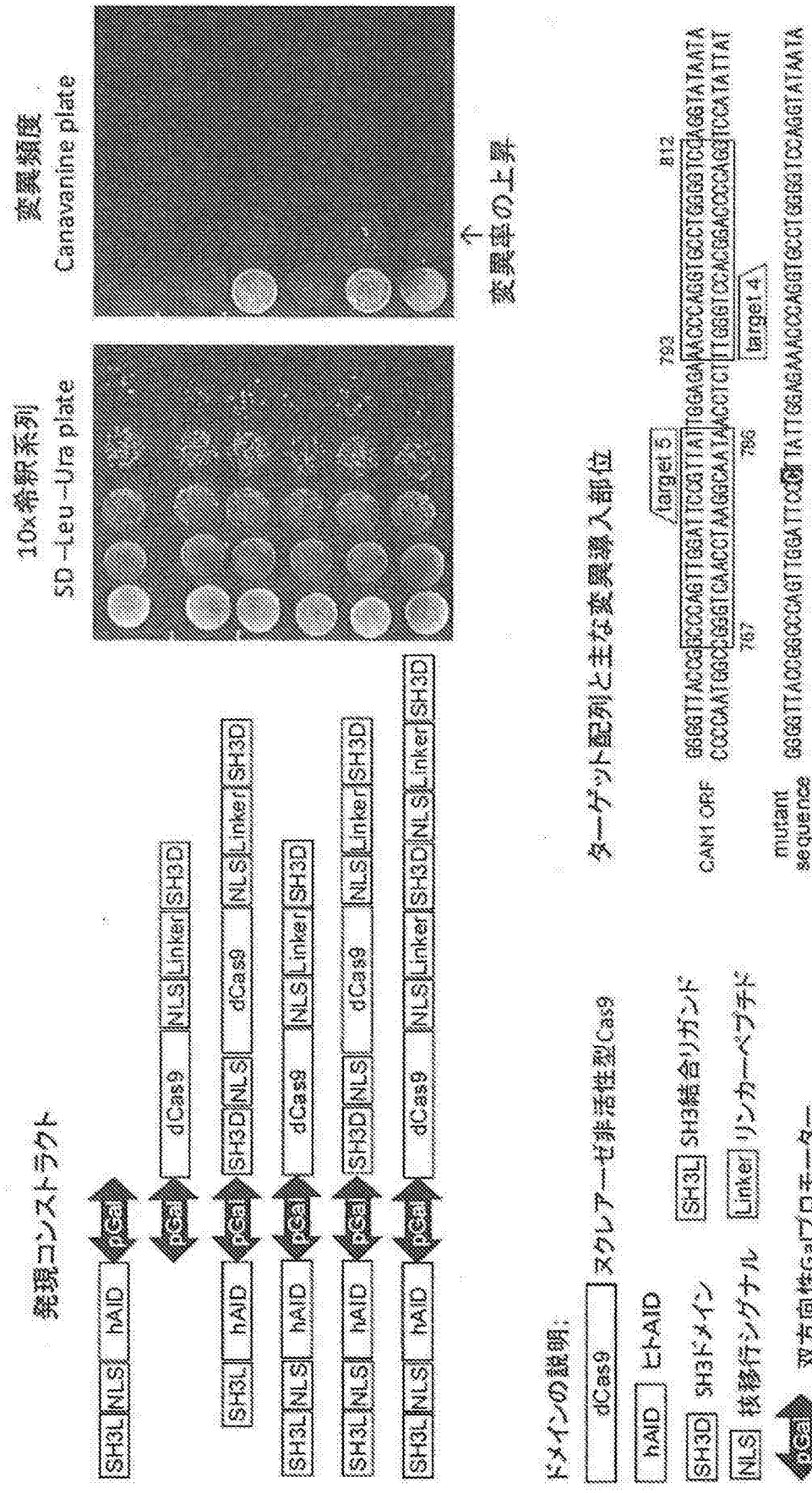
[図2]


gRNAターゲット＝CAN1遺伝子ORF内の187-206番目の塩基配列
Canavanineプレートによる Can1変異率の検証
コントロール
dCas9
NLS
Linker
pCas
融合タンパク質
dCas9
NLS
Linker
PmCDA1
10倍希釈系列
融合タンパク質
変異導入部位
T1= target1(187-206)
g2361
g220
g217
c191a
c911
g307c
g307c
g352c
g388c
CAN1 ORF (1770bp)
c11g
g313c
g280c
c368t
g220
g226t
c1035a
g788a
ドメイン結合
ドメイン結合
PmCDA1
SH3L
pCas
dCas9
NLS
Linker
SH3D
SH3 ligand
SH3 domain
テアミナーゼ
dCas9

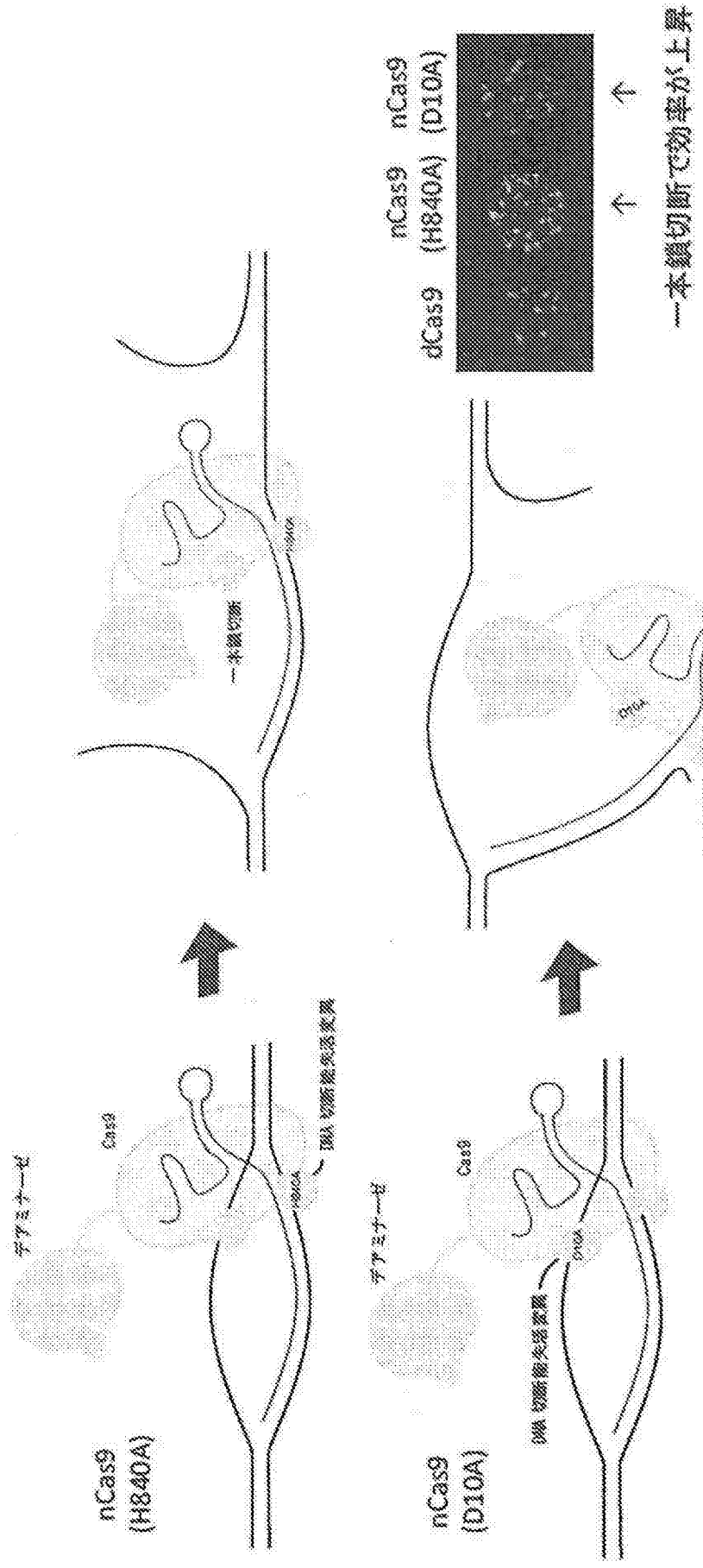
[図3]


発現誘導による生存細胞数の変化
コロニー形成数（相対値）
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
nCas9 D10A-PmCDA1
従来型 Cas9
誘導開始時
誘導６時間後

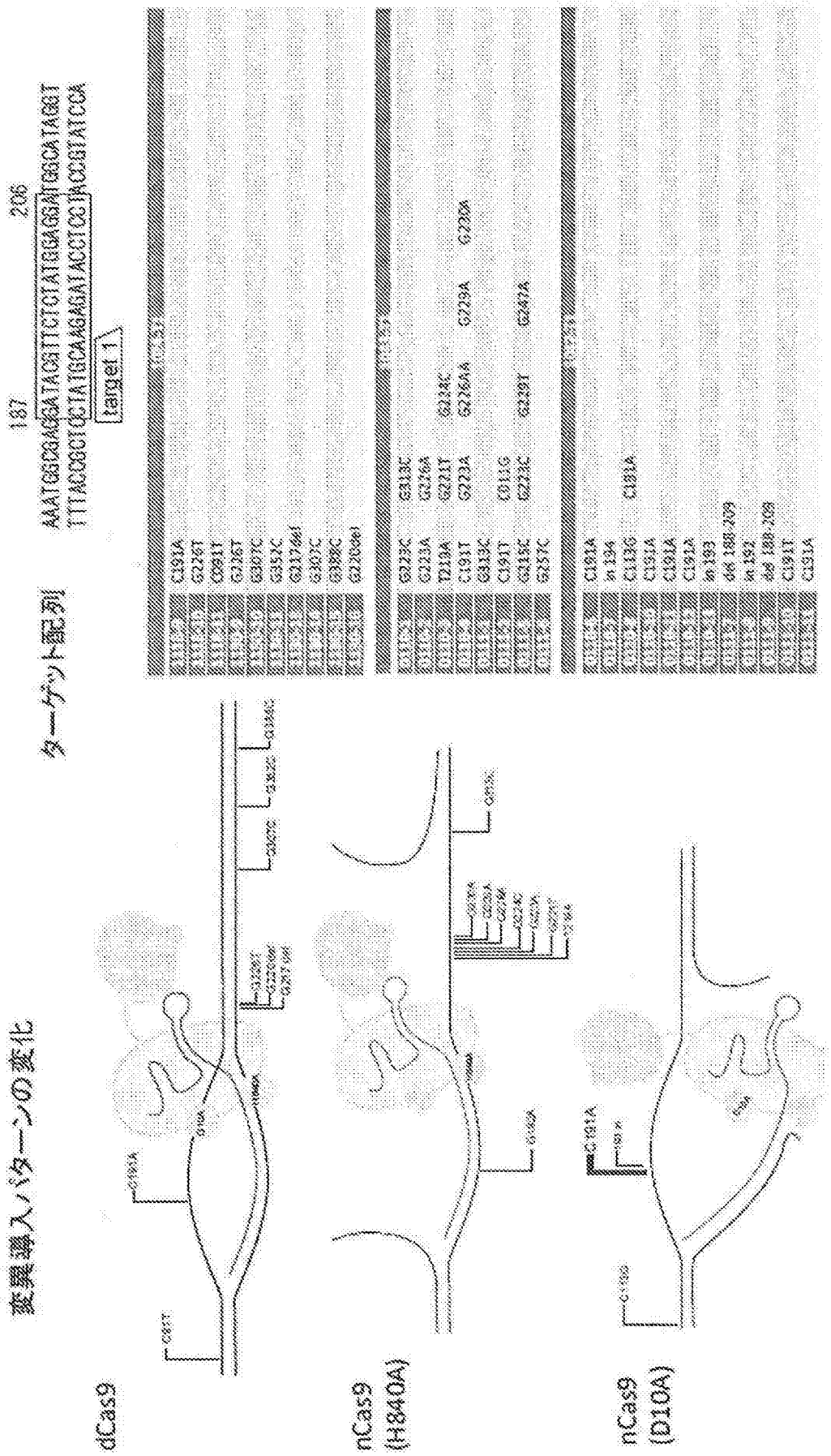
[図4]


発現コンストラクト
SH3L NLS hAID pGal
pGal dCas9 NLS Linker SH3D
pGal SH3L hAID SH3D NLS Linker dCas9
pGal SH3L NLS hAID SH3D Linker dCas9
pGal SH3L NLS hAID SH3D NLS Linker dCas9
pGal SH3L NLS hAID dCas9 NLS Linker SH3D NLS Linker SH3D
10x希釈系列
SD –Leu –Ura plate
変異頻度
Canavanine plate
変異率の上昇
ドメインの説明:
dCas9 スクレアーゼ非活性型Cas9
hAID ヒトAID
SH3D SH3ドメイン
SH3L SH3結合リガンド
NLS 核移行シグナル
Linker リンカーペプチド
pGal 双方向性Galプロモーター
ターゲット配列と主な変異導入部位
target 5
target 4
CAN1 ORF
mutant sequence

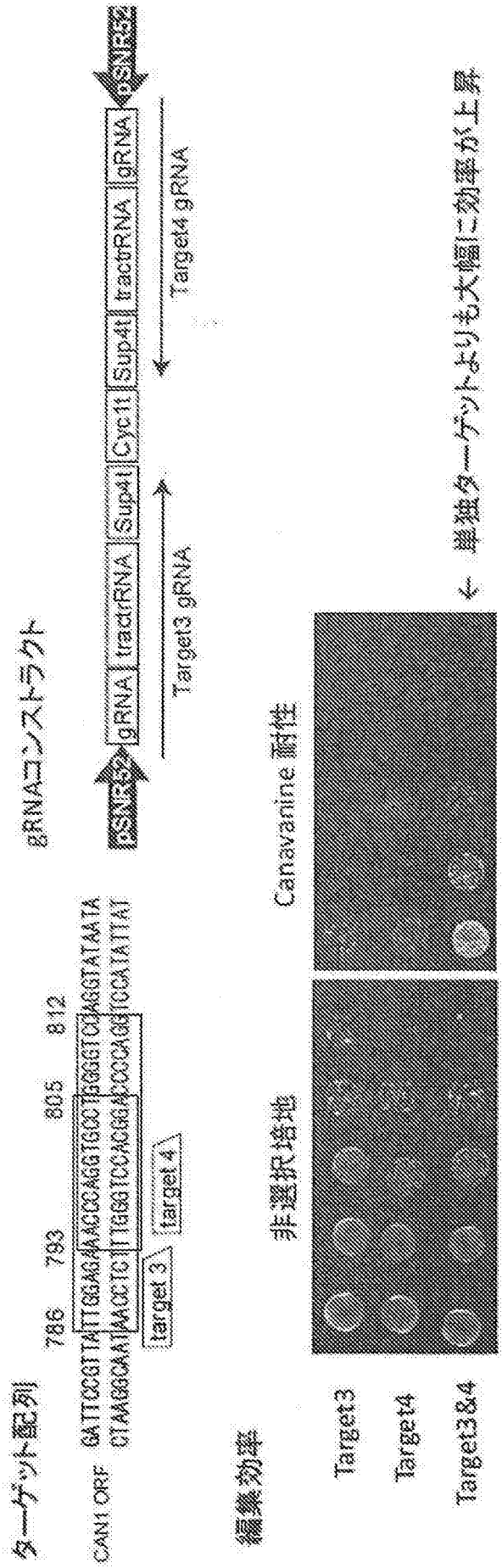
[図5]


nCas9
(H840A)
nCas9
(D10A)
dCas9
nCas9
(H840A)
nCas9
(D10A)
一本鎖切断で効率が上昇

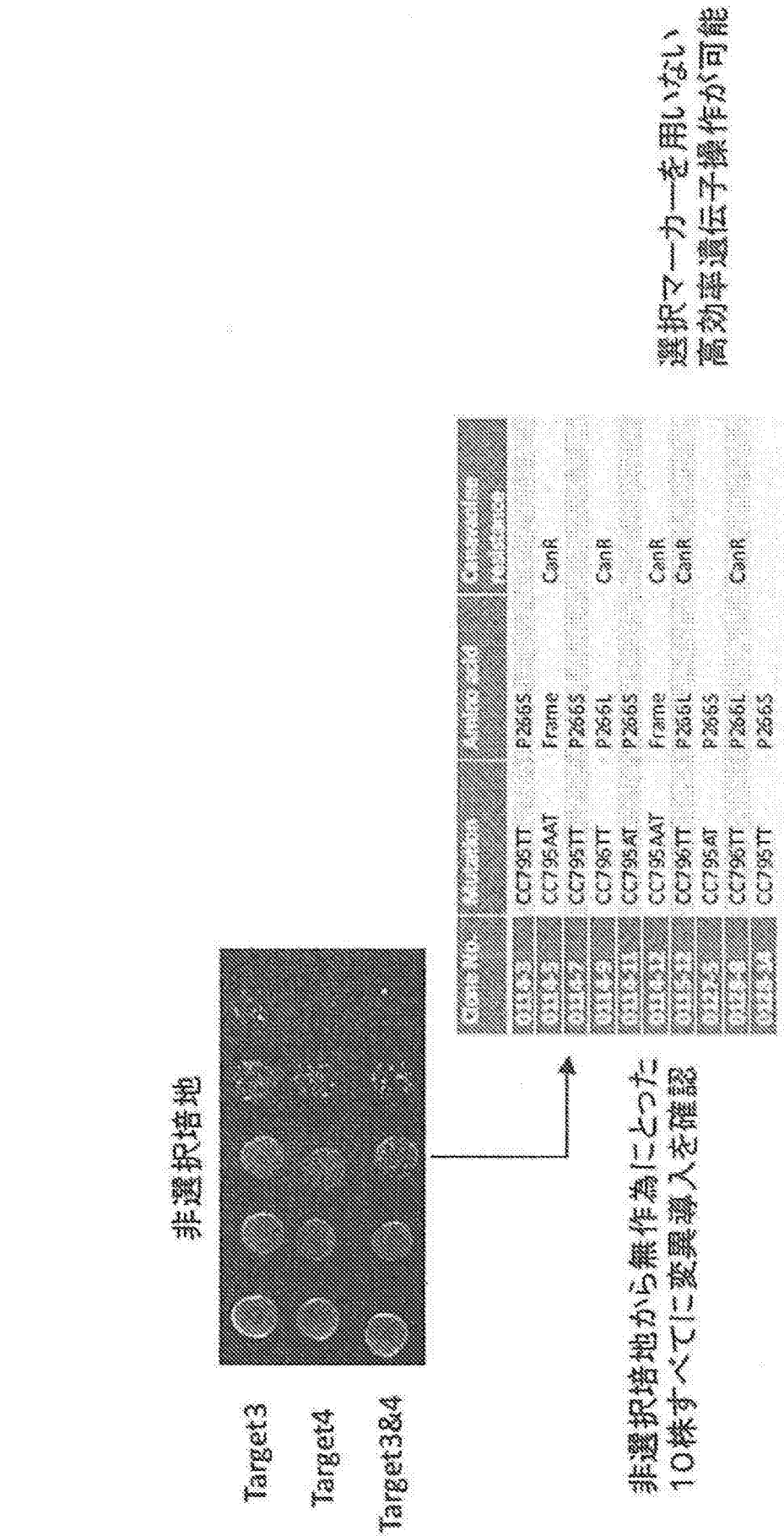
[図6]


変異導入パターンの変化
ターゲット配列
187
206
target 1
dCas9
nCas9
(H840A)
nCas9
(D10A)

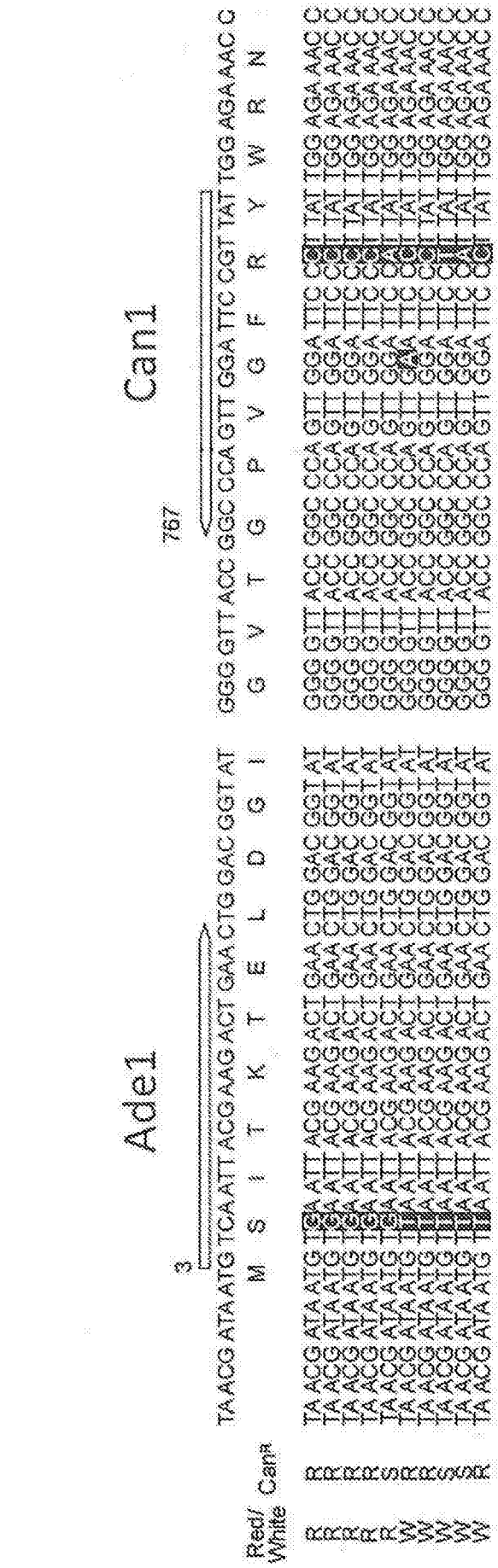
[図7]


ターゲット配列
786
793
805
812
CAN1 ORF
target 3
target 4
gRNAコンストラクト
CSN1-2
gRNA
tractRNA
Sup4t
Cyc1t
Sup4t
tractRNA
gRNA
CSN1-2
Target3 gRNA
Target4 gRNA
編集効率
非選択培地
Canavanine 耐性
Target3
Target4
Target3&4
← 単独ターゲットよりも大幅に効率が上昇

[図8]

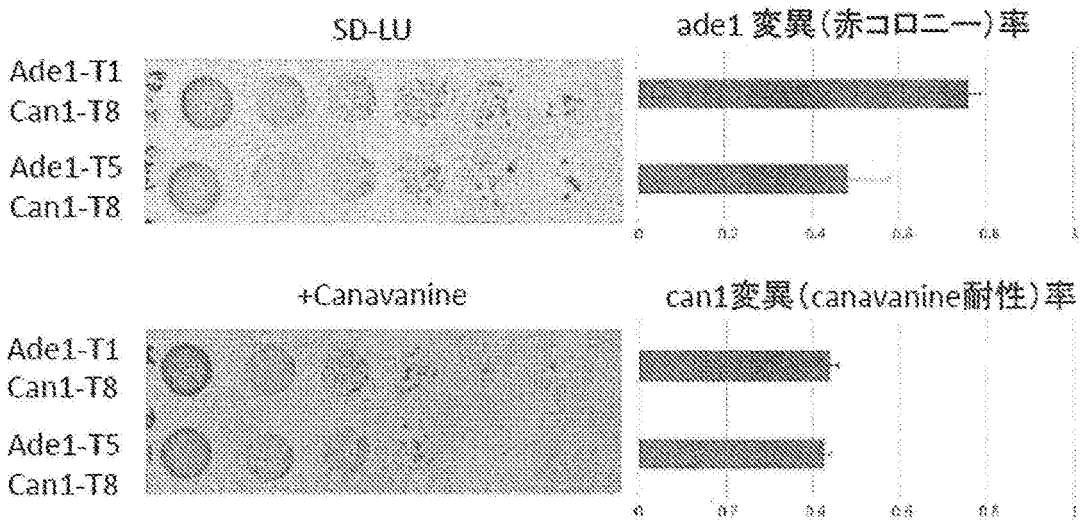

非選択培地
Target3
Target4
Target3&4
非選択培地から無作為にとった
10株すべてに変異導入を確認
選択マーカーを用いない
高効率遺伝子操作が可能
CC795TT
CC795AAT
CC795AT
P266S
P266L
Frame
CamR

[図9]

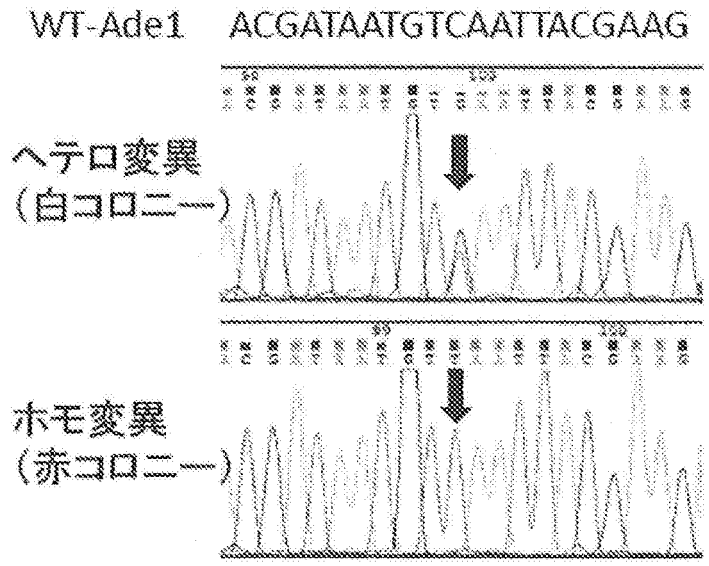

Ade1
Can1
3
767
Red/ White
Can^R
TA ACG ATA ATG TCA ATT ACG AAG ACT GAA CTG GAC GGT ATT
M S I T K T E L D G I
GGG GTT ACC GGC CCA GTT GGA TTC CGT TAT TGG AGA AAC C
G V T G P V G F R Y W R N

[図10]

A

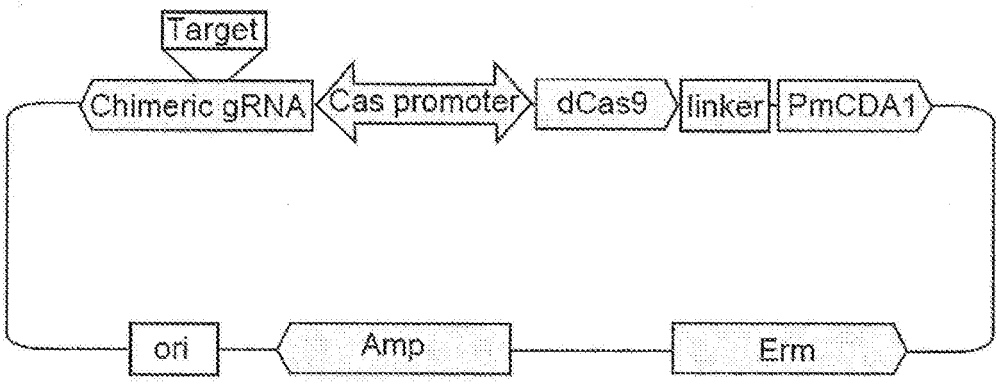

SD-LU
ade1 変異(赤コロニー)率
Ade1-T1
Can1-T8
Ade1-T5
Can1-T8
+Canavanine
can1変異(canavanine耐性)率
Ade1-T1
Can1-T8
Ade1-T5
Can1-T8

B


WT-Ade1 ACGATAATGTCAATTACGAAG
ヘテロ変異
(白コロニー)
ホモ変異
(赤コロニー)

[図11]

A



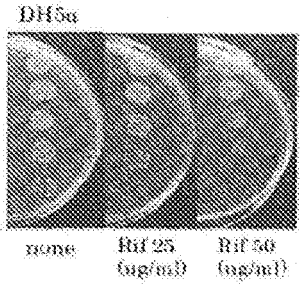
B

galK TCAATGGGCTAACTACGTTC-3'
1 TCAATGGGCTAACTACGTTC
2 TTAATGGGCTAACTACGTTC
3 TTAATGGGCTAACTACGTTC

C

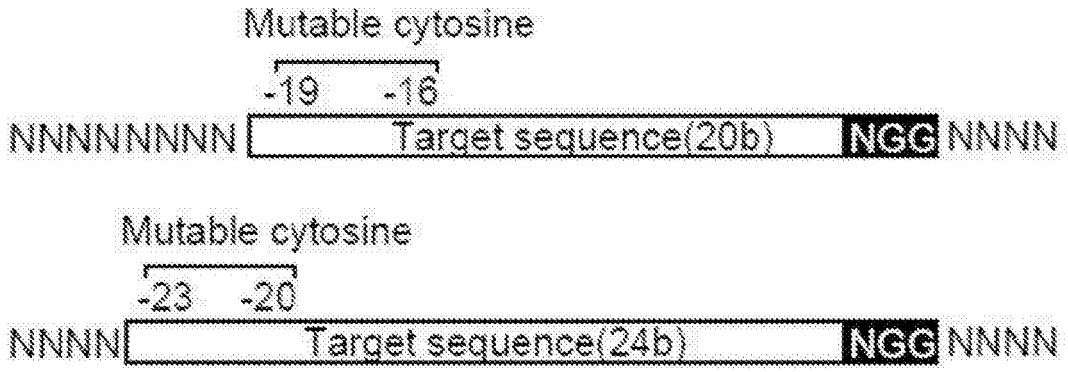
rpoB GCTGTCTCAGTTTATGGACC-3'
(CGACAGAGTCAAATACCTGG-5')

none 1 GCTGTCTCAGTTTATGGACC
2 GCTGTCTCAGTTTATGGACC
Rif25 1 GCTGTCTCAGTTTATGAACC
2 GCTGTCTCAGTTTATGAACC
Rif50 1 GCTGTCTCAGTTTATAAACC
2 GCTGTCTCAGTTTATGAACC
(CGACAGAGTCAAATACTTGG-5')

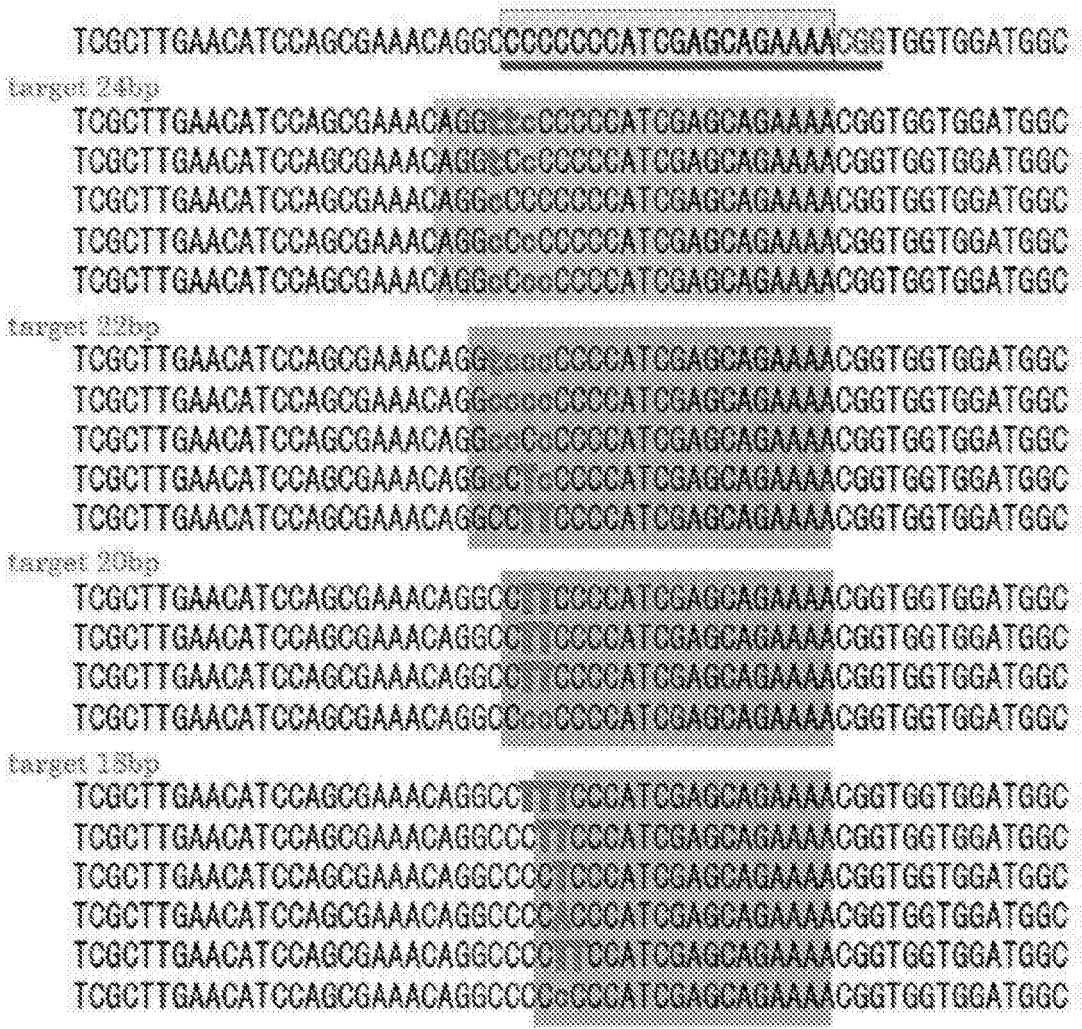


[図12]

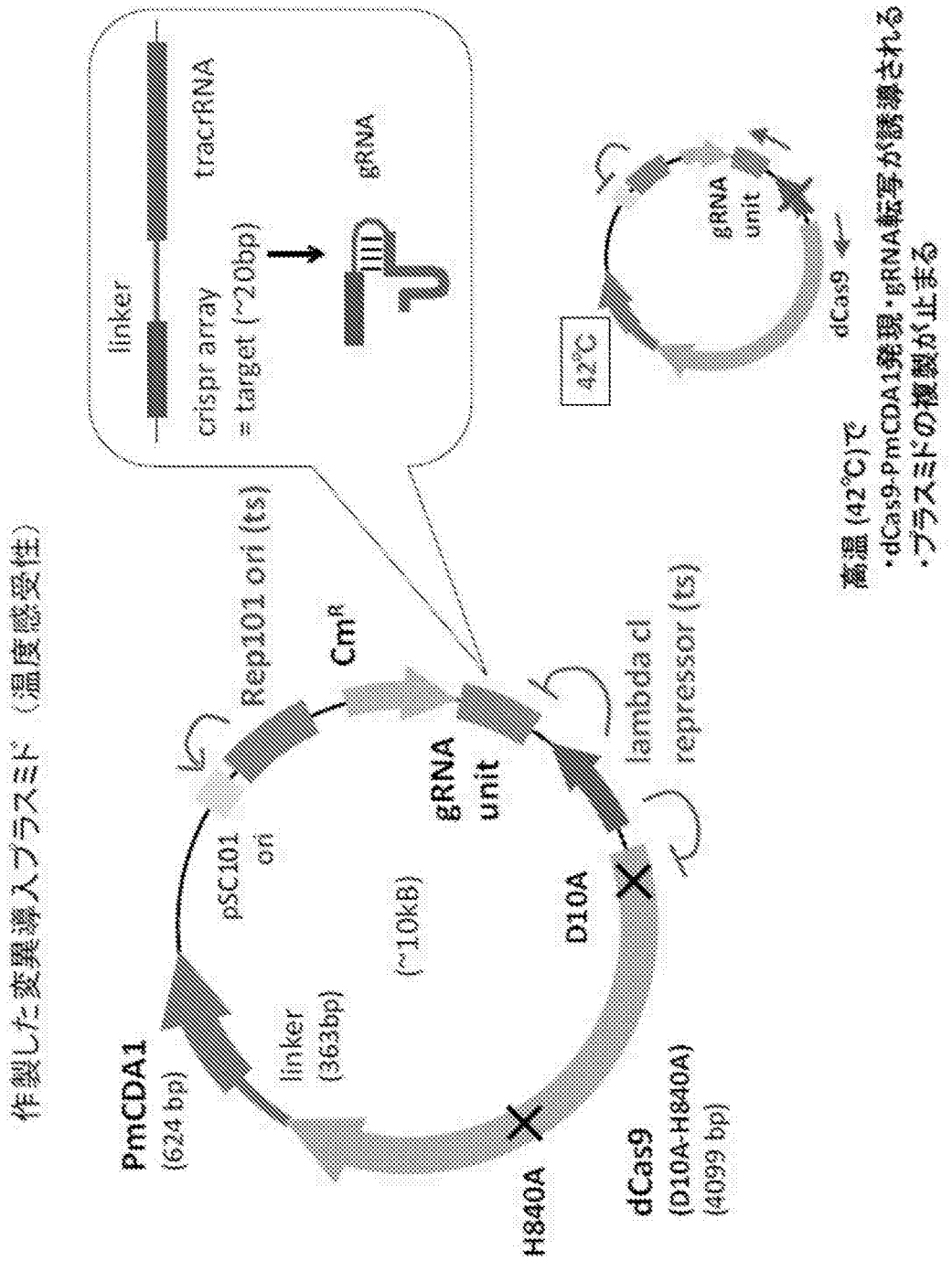
A


Mutable cytosine
-19 -16
NNNNNNNN
Target sequence(20b)
NGG
NNNN
Mutable cytosine
-23 -20
NNNN
Target sequence(24b)
NGG
NNNN

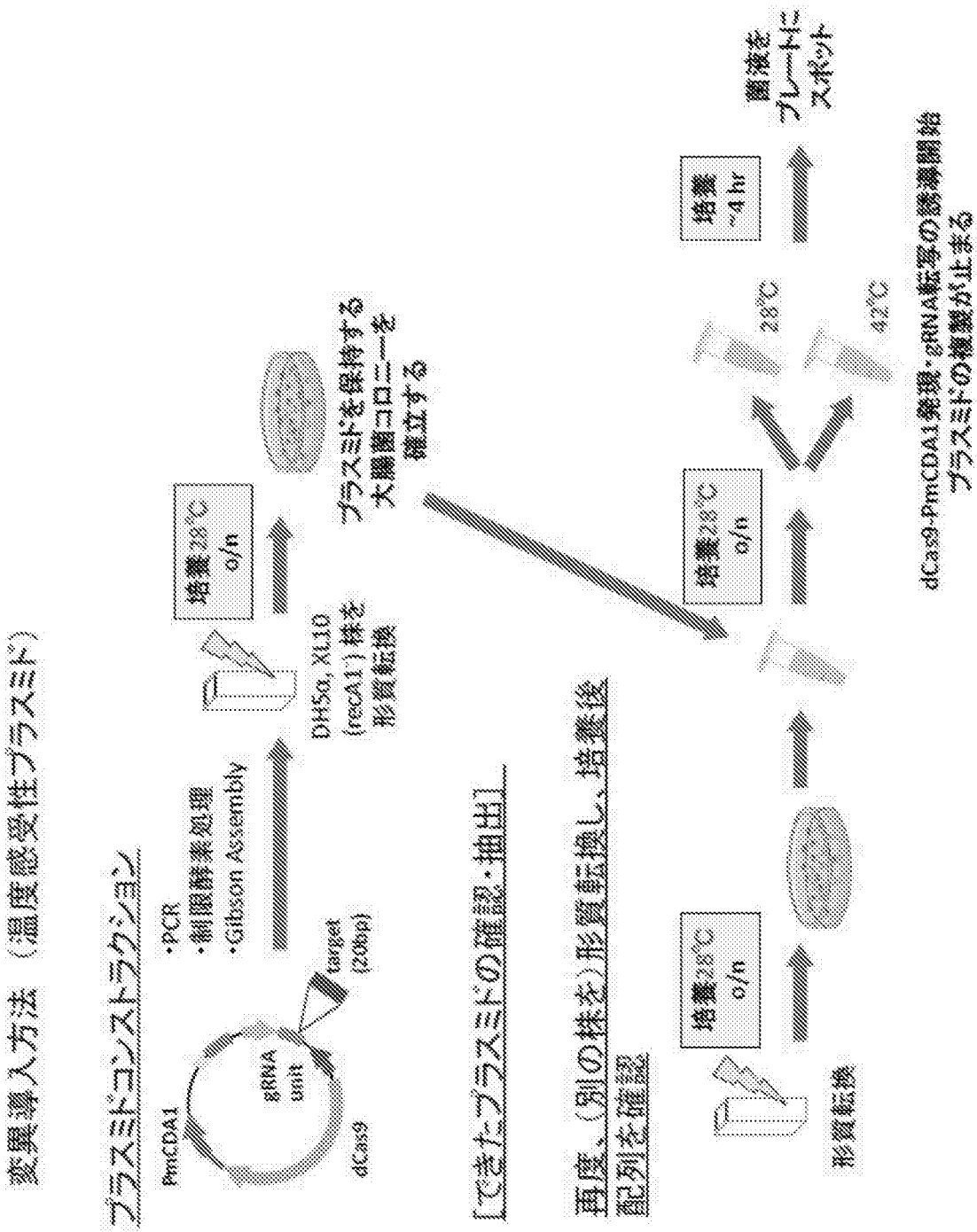
B


TCGCTTGAACATCCAGCGAAACAGGCCCCCCCATCGAGCAGAAAACGGTGGTGGATGGC
target 24bp
target 22bp
target 20bp
target 18bp

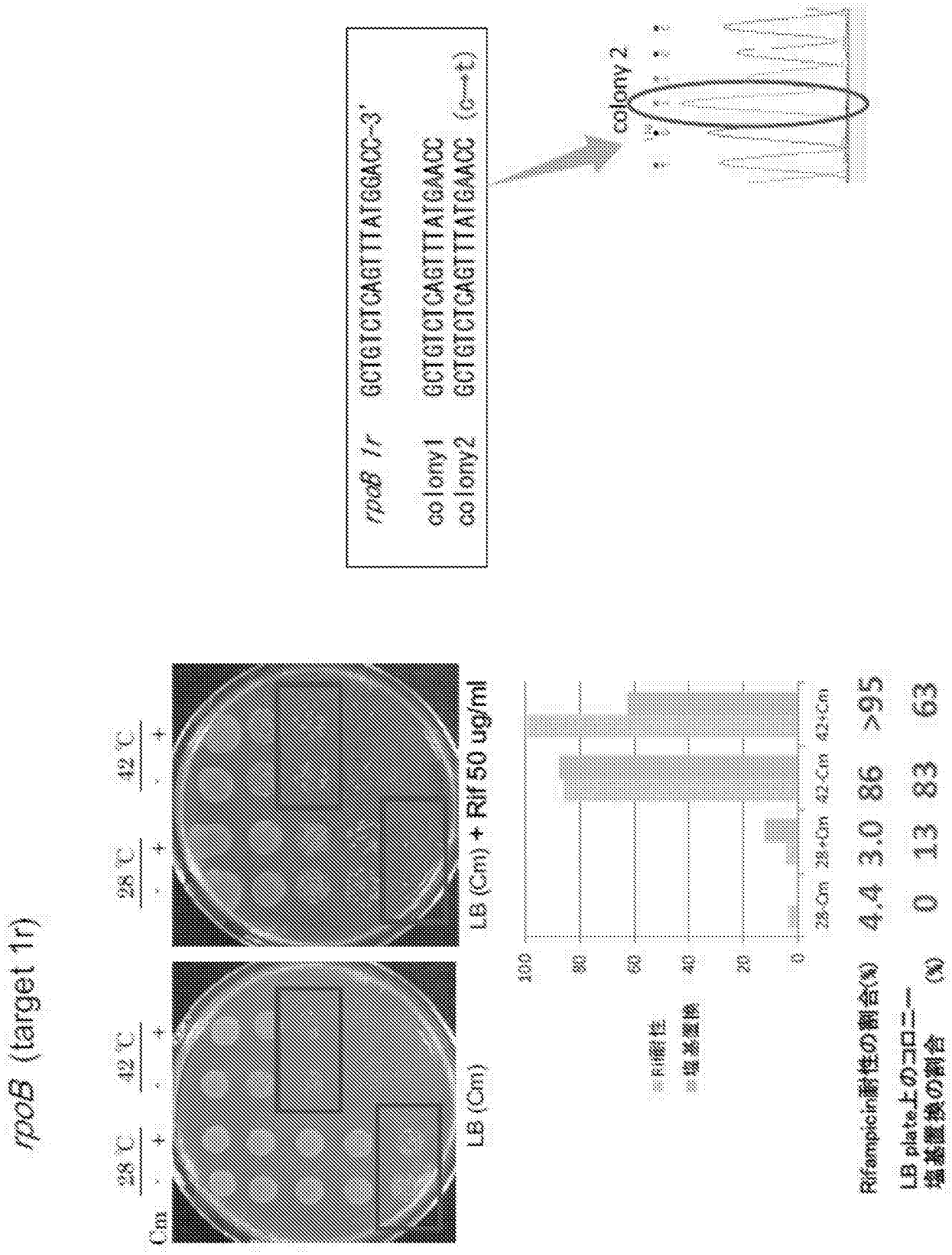
[図13]


作製した変異導入プラスミド（温度感受性）
PmCDA1
(624 bp)
linker
(363bp)
pSC101
ori
(~10kB)
Rep101 ori (ts)
Cm^R
gRNA
unit
D10A
H840A
dCas9
(D10A-H840A)
(4099 bp)
lambda cI
repressor (ts)
linker
crispr array
= target (~20bp)
tracrRNA
gRNA
42℃
gRNA
unit
dCas9
高温 (42℃)で
・dCas9-PmCDA1発現・gRNA転写が誘導される
・プラスミドの複製が止まる

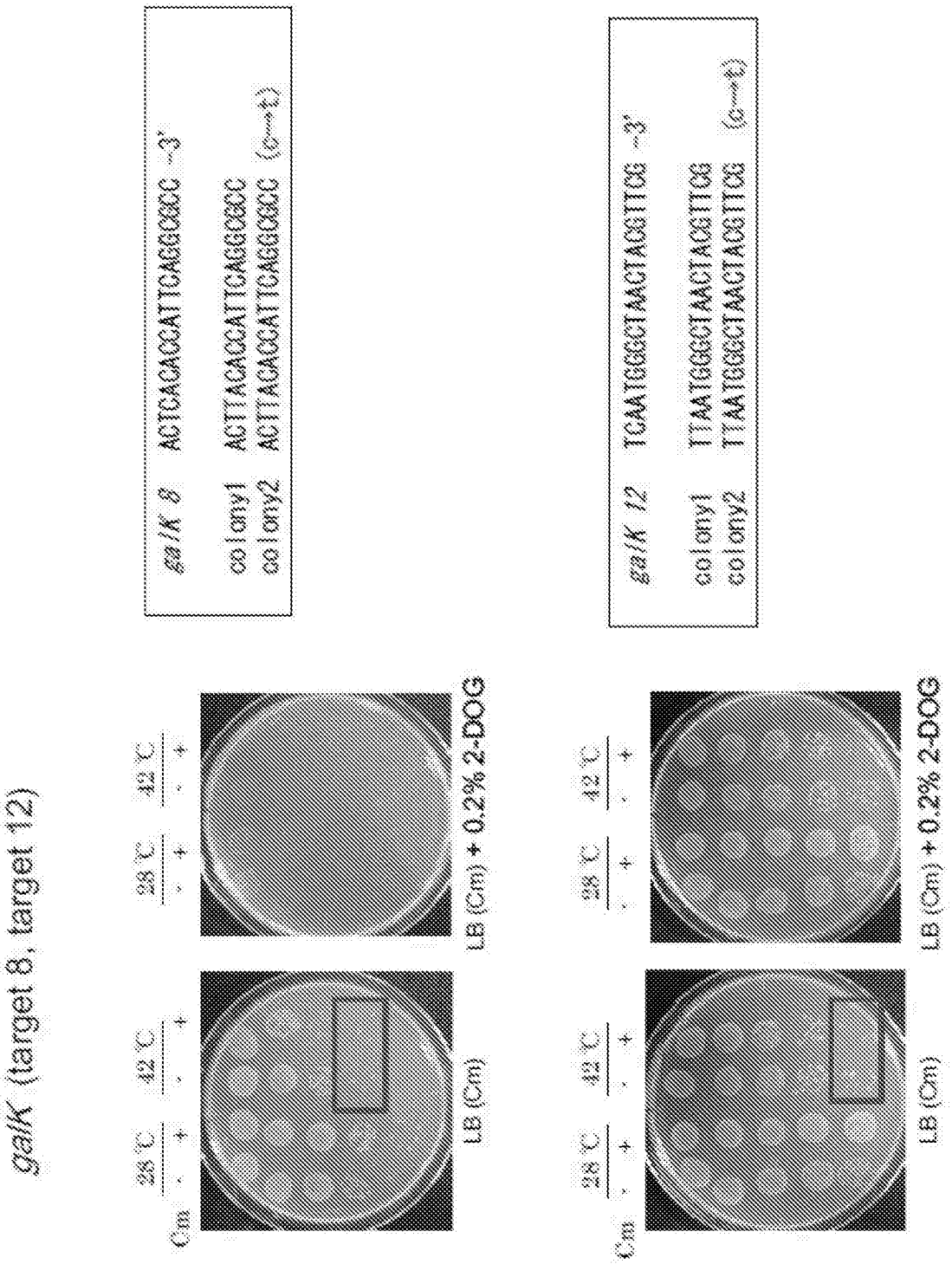
[図14]


変異導入方法 （温度感受性プラスミド）
プラスミドコンストラクション
PmCDA1
gRNA unit
dCas9
・PCR
・制限酵素処理
・Gibson Assembly
target (20bp)
DH5α, XL10 (recA1-) 株を形質転換
培養28℃ o/n
プラスミドを保持する大腸菌コロニーを確立する
できたプラスミドの確認・抽出
再度、（別の株を）形質転換し、培養後配列を確認
形質転換
培養28℃ o/n
28℃
42℃
培養 ~4 hr
菌液をプレートにスポット
dCas9-PmCDA1発現・gRNA転写の誘導開始
プラスミドの複製が止まる

[図15]


rpoB (target 1r)
28 ℃
42 ℃
Cm
LB (Cm)
LB (Cm) + Rif 50 ug/ml
rpoB 1r GCTGTCTCAGTTTATGGACC-3'
colony1 GCTGTCTCAGTTTATGAACC
colony2 GCTGTCTCAGTTTATGAACC (c→t)
colony 2
耐性
塩基置換
28-Cm
28+Cm
42-Cm
42+Cm
Rifampicin耐性の割合(%) 4.4 3.0 86 >95
LB plate上のコロニー
塩基置換の割合 (%) 0 13 83 63

[図16]


galK (target 8, target 12)
galK 8 ACTCACACCATTCAGGCGCG -3'
colony1 ACTTACACCATTCAGGCGCC
colony2 ACTTACACCATTCAGGCGCG (c→t)
galK 12 TCAATGCGCTAACTACGTTCG -3'
colony1 TTAATGGGCTAACTACGTTCG
colony2 TTAATGCGCTAACTACGTTCG (c→t)
Cm
28 ℃ 42 ℃
LB (Cm)
LB (Cm) + 0.2% 2-DOG