

遺伝子導入装置 4D-Nucleofector™ による ssODNを介したCRISPR/Cas9ゲノム編集

— CRONUS システムによる高効率で自在なゲノム改変技術 —

京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 堀田秋津講師のご厚意により、ご論文からのデータ掲載の許諾を頂きましたこと、心より感謝申し上げます。

論文名: "Site-specific randomization of the endogenous genome by a regulatable CRISPR-Cas9 piggyBac system in human cells"

ジャーナル名: Scientific Reports

著者: Kentaro Ishida¹, Huaigeng Xu¹, Noriko Sasakawa¹, Mandy Siu Yu Lung¹, Julia Alexandra Kudryashev², Peter Gee¹ & Akitsu Hotta^{1,3}

著者のご所属機関: 1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) 2. マサチューセッツ工科大学 3. 京都大学物質・細胞統合システム拠点 (iCeMS)



CRONUS システム概要

CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術は、ゲノム上の狙った箇所を切断して DNA 修復機構を活性化することにより、塩基の欠失や配列組換えを誘導する技術です。しかし iPS 細胞をはじめとするヒト培養細胞において、30 億塩基からなるゲノムの一塩基だけを狙った通り精密に改変するのは非常に効率が悪く、困難でした。堀田講師らの研究グループは、iPS 細胞内に CRISPR-Cas9 とガイド RNA をあらかじめ組み込んでおくことで、ゲノム編集効率を高めることにしました。この際、Cas9 Nuclease が常に働いてしまうと、意図しない欠損ばかりが発生してしまうため、Cas9 の活性を二重に薬剤で制御する方法が開発され、**CRONUS (CRISPR-Cas9 regulated by transcription and nuclear-shuttling) system** と名づけられました。

CRONUS システムによって、iPS 細胞の中の Cas9 の活性を二種類の薬剤で自在に制御することが可能となり、また Cas9 とガイド RNA を毎回細胞内へ導入する必要もないため、ゲノム編集効率が大きく向上することが分かりました。さらに、一塩基を置換するための一本鎖 DNA (ssODN) を導入すると、これまでの効率を大幅に上回る、20 ~ 30% もの効率で狙った一塩基改変が誘導可能であることが分かりました。(京都大学 iPS 細胞研究所ホームページより抜粋)

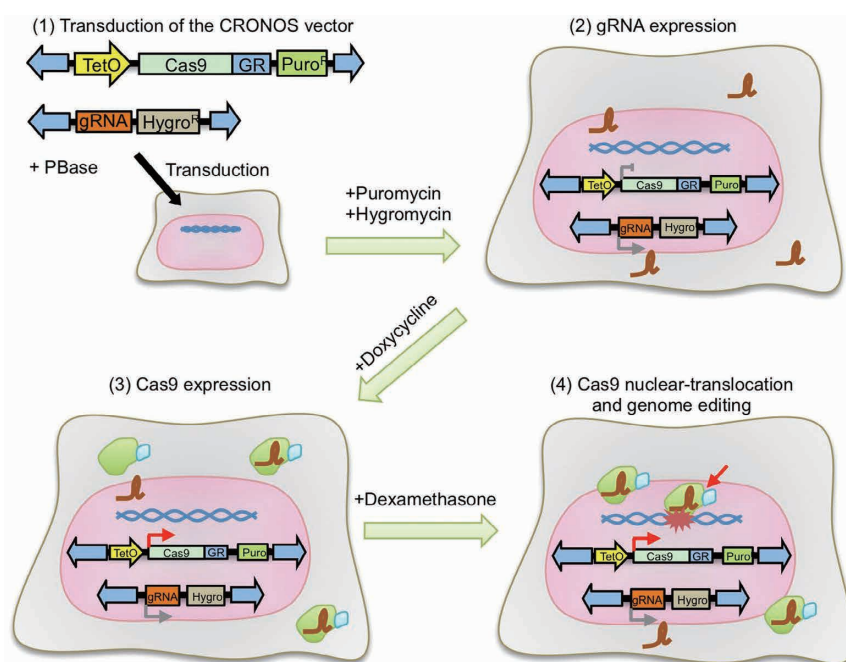


図1. Schematic drawing of the CRONUS system

- (1) CRONUS piggyBacベクター (PuroR) のターゲット細胞への導入。ガイドRNA発現piggyBacベクター (HygroR) およびpiggyBac transposase (PBase) を共導入
- (2) PuromycinとHygromycinによるセレクションによりCRONUSとガイドRNAの安定発現株を樹立
- (3) Doxycycline添加によりCas9-グルコルチコイド受容体 (GR) の発現を誘導
- (4) Dexamethasone添加によりCas9-GRの核移行を誘導し、核内においてターゲット配列への結合、ゲノムDNAの切断が発生

CRONUS システムの開発プロセスとその特長

著者らは、ターゲット細胞において CRISPR-Cas9 安定発現株を作製することによってゲノム編集効率を高めようとした。同時に意図しない変異を回避するために、Cas9 の DNA 切断活性は調節されるべきものと考えました。そこで調節可能な Cas9 発現ベクター構築のため、293T 細胞における piggyBac ベクターの一過性発現でのテストが行われました。まず、Doxycycline (Dox) 誘導性の TetO-Cas9 発現 piggyBac ベクターが構築され、293T 細胞において Single strand annealing assay を用いてゲノム編集効率を調査しました (図 2.a)。結果、Dox 容量依存性の Cas9 による標的 DNA の切断が観察されたものの、バックグラウンドの切断活性が Dox 非添加サンプルで確認されました。続いてエストロゲン受容体 (ERT2) またはグルココルチコイド受容体 (GR) のバリエーションを Cas9 との融合タンパクとして発現させ、それぞれ (Z) -4-hydroxytamoxifen (4-OHT) または Dexamethasone (Dex) によって、リガンド依存性の Cas9 の核内輸送を誘導できるかを調べました。その結果、基質添加量に応じた Cas9 の切断活性が GR-Dex の系でも確認されましたが、同時に Dex 非添加コントロールにおいても切断活性が観察されました (図 2.b)。このようなバックグラウンドの切断活性を最小限にするために、これら 2 つの要素を組合わせたデュアル調節 CRONUS システム (TetO-Cas9-GR) (図 2.c) は、バックグラウンドレベルを劇的に引き下げることができました。そして重要なことに Dox/Dex 処理後 8 ~ 24 時間において、迅速な Cas9 活性の誘導が見られました (図 2.d)。

この CRONUS システムとガイド RNA を piggyBac ベクターを用いて、ヒト iPS 細胞に安定導入し、非相同性末端結合 (NHEJ) を介した挿入 / 欠失 (Indel) 変異誘導効率が検討されました。CRONUS [Cas9] ベクターは Puromycin、ガイド RNA 発現ベクターは Hygromycin 選択によって樹立され (図 1)、T7EI アッセイによりゲノム編集効率を測定しました。Dox/Dex 処理後 6 時間で二本鎖 DNA 切断が検出され、24 時間後にはプラトーに達しました (図 2.e)。

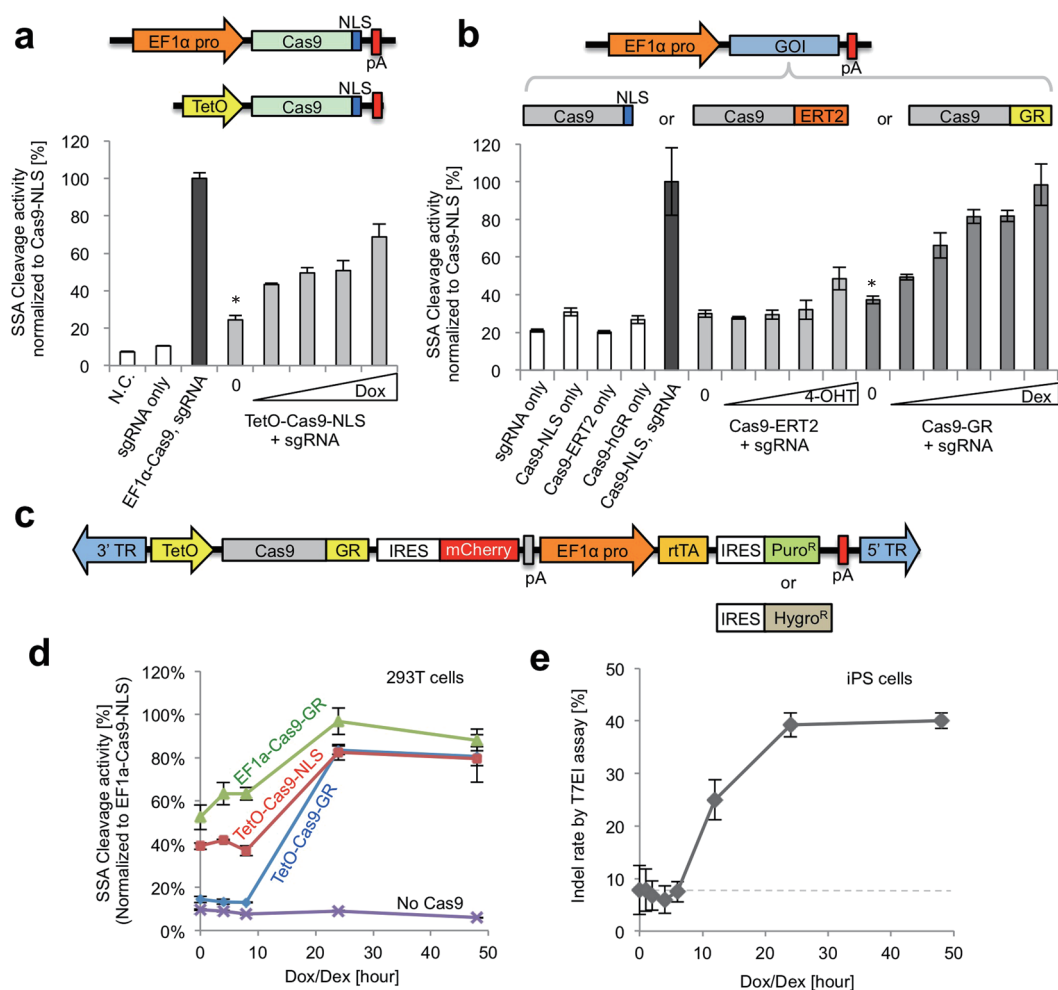


図2. CRONUS (CRISPR-Cas9 regulated by transcription and nuclear-shuttling) システムの開発プロセス

- SV40核移行シグナルを付加したspCas9がDox応答で発現するpiggyBacベクターを293T細胞にトランスフェクションし、複数濃度にてDox処理(0.0065, 0.065, 0.65, 6.5 μM)を行いました。Cas9のDNA切断活性はDox容量に依存して調節されましたが、Dox非添加サンプルにおいて、高いバックグラウンドが観察されました(*)。
- 核移行シグナル、ERT2またはGRとの融合spCas9がEF1プロモーターによって発現するpiggyBacベクターに組み込まれ、293T細胞に導入。複数濃度にて4-OHT処理(0.025, 0.25, 2.58 μM)またはDex処理(0.00375, 0.015, 0.06, 0.25, 1 μM)されました。ERT2/4-OHTの系よりもGR/Dexの系において優れたspCas9活性の調節が観察されました。一方でやはりDex非添加サンプルにおいても、高いバックグラウンドが見出されました(*)。
- CRONUS piggyBacベクターの構造
- TetO-Cas9やCas9-GRの単独調節システムと比較して、CRONUS システム (TetO-Cas9-GR) は、Cas9活性の高い誘導率を示しました。Cas9活性は処理後24時間でプラトーに達しました。
- CRONUS iPS細胞におけるT7EIアッセイによるゲノム切断活性のタイムコース。

CRONUS システムの利用: ssODNを介したジストロフィン遺伝子の一塩基改変

* デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、筋肉の細胞膜の支持に必要なタンパク質であるジストロフィンが遺伝子変異により欠損したことに起因する筋疾患です。ゲノム編集技術の発展により将来的な遺伝子治療法の開発が期待されています。

CRONUS システムは ssODN (鋳型となる一本鎖 DNA、100 塩基ほどの長さ) を介した相同組換えにも効果的であると考え、DMD 遺伝子を 1 コピー持つヒト男性由来 iPS 細胞に 4D-Nucleofector™ を使用して ssODN を導入しました (下記 Method 参照)。Dox/Dex を添加した所、驚くほど高い効率のノックインが観察され、またそれは ssODN 導入量に依存的でした (図 3.b)。さらに検証のため、RFLP 解析 (制限酵素サイトを ssODN で挿入することにより生じる、制限酵素切断可能 DNA 断片を定量する解析方法) により ssODN による塩基置換の割合を確認した結果、約 19.7% の Age I による切断が確認され、効果的な ssODN ドナーのノックインが行われたことが示されました (図 3.c)。また、違う ssODN を用いて同様の実験を行い、ターゲット領域の PCR 産物をシーケンスにより確認した所、Indel 変異が 47.2%、そして Indel 変異を伴わないノックインの成功頻度は 13.9% という結果が示されました (図 3.d,e)。

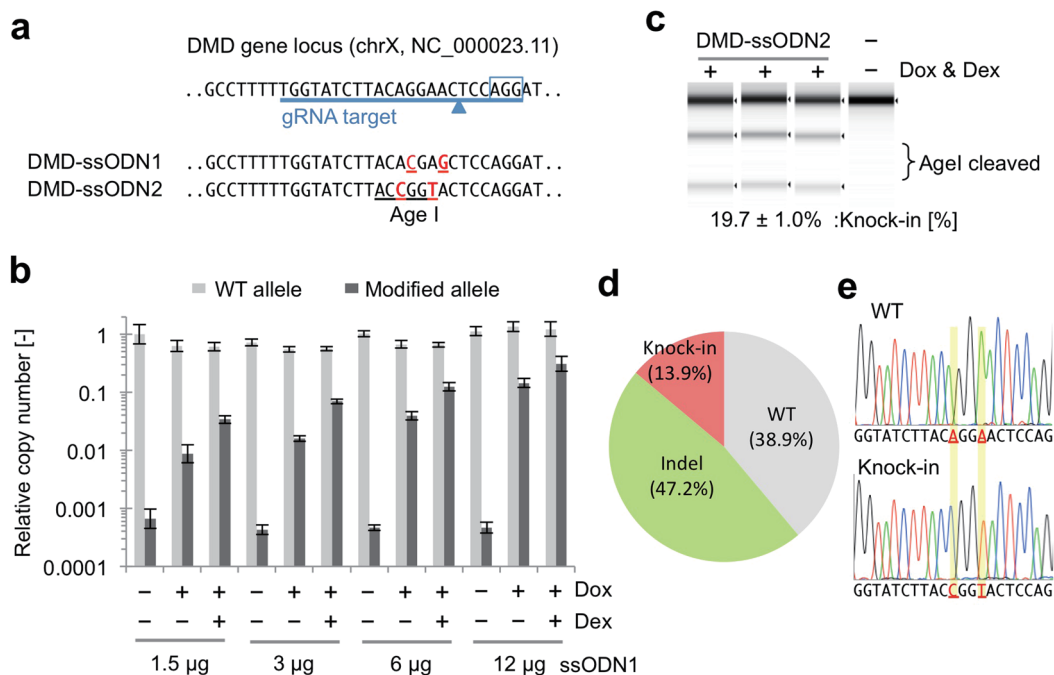


図3. ssODNを介したジストロフィン遺伝子の一塩基改変

- (a) DMD遺伝子のガイドRNAの標的配列、PAM配列 (青枠)、Cas9切断サイト (▲) が2つのssODNドナーテンプレート (長さ100塩基) と共に表示。ssODNの置換塩基は赤字、新規に発生するAge I 切断部位は下線で表示。
- (b) ノックイン実験におけるssODN量の最適化: ノックイン効率はアリル特異的定量PCRで測定。改変前 (WT) アリルは灰色、ノックイン (KI) アリルは黒色で表示。
- (c) CRONUS iPS細胞にDMD-ssODN2をトランスフェクションし、Dox/Dex48時間処理。ノックイン効率はAge I 切断により生じたDNA量から計測。
- (d) CRONUS iPS細胞にDMD-ssODN2をトランスフェクションし、Dox/Dex48時間処理。DMD遺伝子におけるガイドRNAターゲット領域のPCR産物をサブクローン後、シーケンス解析。
- (e) シーケンス結果の一例。

Method ssODNを介した一塩基ゲノム編集

- 細胞 iPS細胞 (クローン1383D2及び404C2) 0.5×10^6 cells/20 µL Strip
- 導入基質 ssODN (100-mer) 12 µg
- 導入条件
機器: 4D-Nucleofector™ コアおよび X Unit
試薬キット: P4 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit S (Cat.#:V4XP-4032)
プログラム: CA-137

* iPS細胞クローンにより、試薬キットおよびプログラムは最適化する必要があります。



最適化ガイドライン

P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit S (Cat.#:V4XP-3032) 及び P4 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit S を使用して、以下の 7 プログラムでの条件検討を実施します。

最適化プログラム: **CA-137 CB-150** CD-118 CE-118 CM-113 DC-100 DN-100

* 太字のプログラムは有力なプログラムを示します。



Nucleofector™ による核内への遺伝子導入実績

ヌクレオフェクションは電気パルスにより細胞膜に瞬時に細孔を形成する技術です。Nucleofector™ プログラムと細胞種ごとに最適化された専用試薬の開発による総合的な手法を採用し、細胞質へはもちろん、さらに核膜を通して核内への遺伝子の導入を実現しました。これにより、細胞種によっては99%という高導入効率と細胞増殖に依存しない遺伝子導入の実現が可能になりました。核内への効率的な遺伝子導入により、ssODN を介した CRISPR/Cas9 ゲノム編集を効果的に実施することが可能となります。

核内へDNAを直接導入

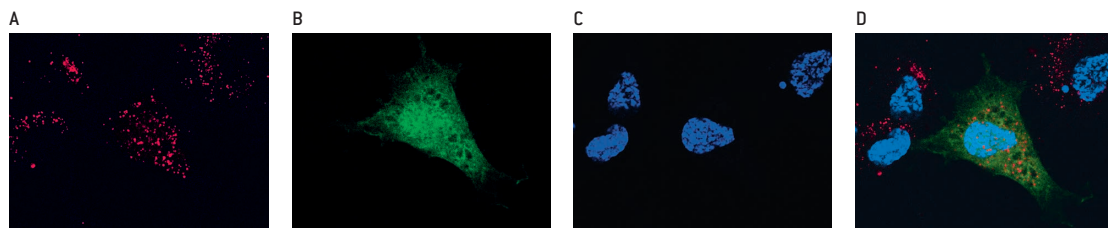
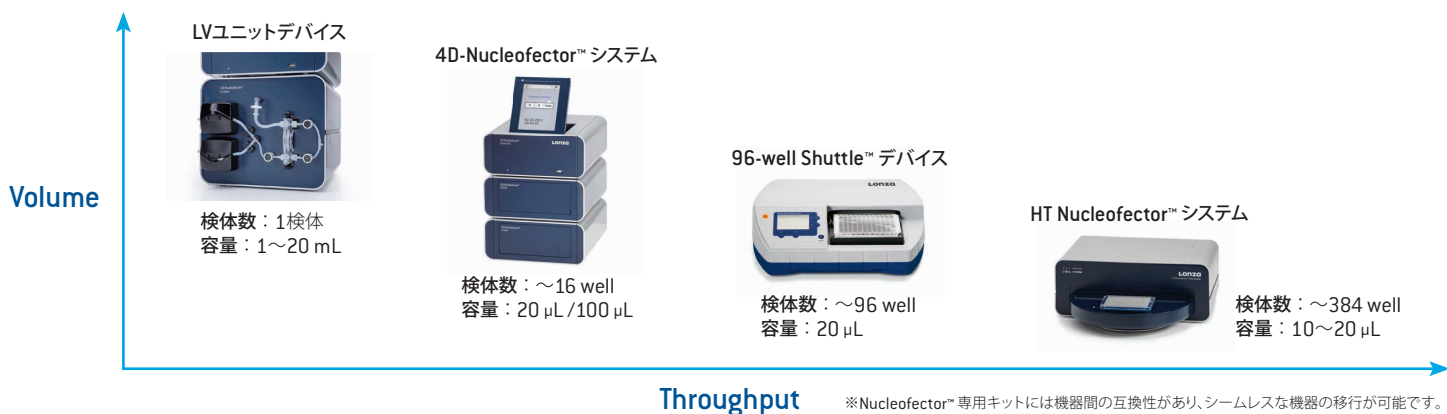


図4

正常ヒト皮膚線維芽細胞（新生児）に2.5 μ gのeGFP（高感度GFP）をコードするTMR標識したプラスミドDNAを導入。導入2時間後、細胞は3.5%PFAにより固定され、共焦点顕微鏡で観察された。導入プラスミド（TMR標識）〔A〕、導入、発現されたGFP〔B〕、核（DAPI染色）〔C〕、以上3つを重ね合わせたもの〔D〕を示した。

Nucleofector™ 機器ラインアップ



Nucleofector™ Technologyの構成要素

- Nucleofector™ デバイスは、各細胞に最適化された独自の電気的パラメーターを提供します。
- Nucleofector™ Solutionは、生理学的に適切な細胞機能を維持しながら、高い遺伝子導入効率および細胞生存率を実現する保護環境を提供します。
- Nucleofector™ の最適化プロトコルは、ヌクレオフェクションの最適条件に加え、細胞の継代・増殖条件および遺伝子導入後の培養に関するアドバイスなどを含む包括的なガイダンスを提供します。



ロンザジャパン株式会社

バイオサイエンス事業部

〒104-6591 東京都中央区明石町8-1 聖路加タワー 39階

受注・在庫照会 TEL: 03-6264-0620

セールス E-mail: bioscience.sales.jp@lonza.com

テクニカルサポート TEL: 03-6264-0663

E-mail: bioscience.technicalsupport.jp@lonza.com

<http://www.lonzabio.jp/>