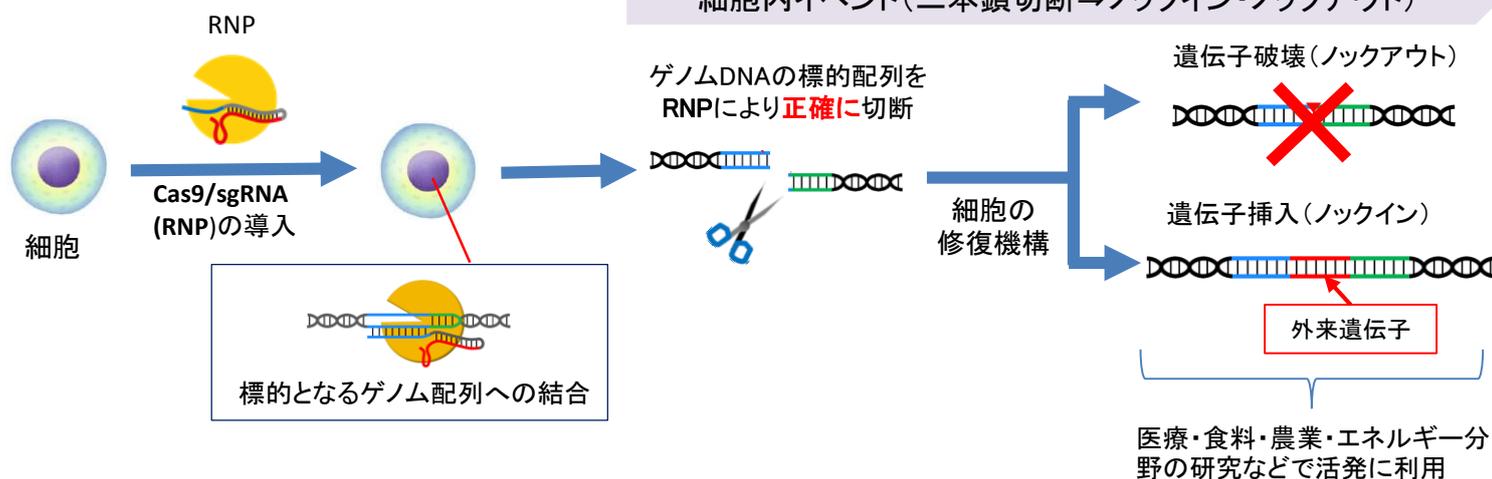


毎号、テーマを絞って製品トレンドをお伝えします

はじめに：ゲノム編集のとりわけ『CRISPR-Cas9システム』は、その圧倒的な構築の簡便さにより、がんや遺伝性疾患の治療応用、エネルギー問題や食糧問題に関する研究のブレイクスルーとして、その広がりとはとまるところを知りません。

今回の「クロンテック通信」は、最近のトレンドである Ribonucleoprotein (RNP: “Cas9タンパク質”と“ガイドRNA”の複合体) を直接用いるゲノム編集に関連する情報をお届けします。

RNPによるゲノム編集

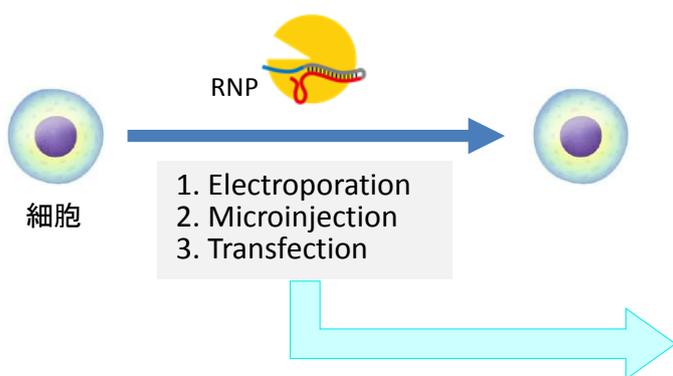


RNPのここがポイント

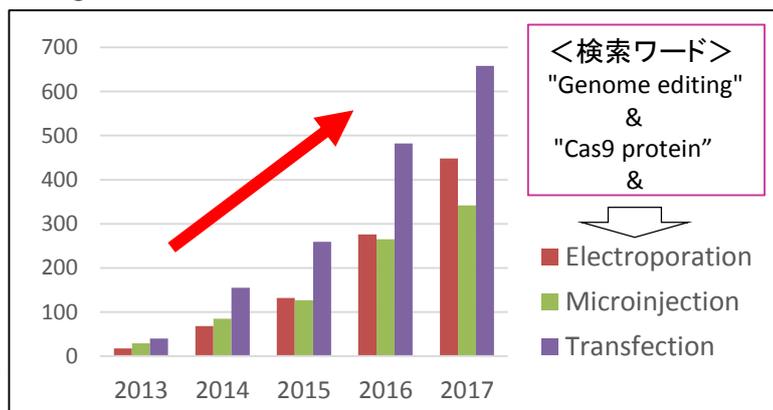
RNPは細胞導入直後からDNA切断活性が“アクティブ”なため、**速やかに標的配列を切断**することが可能です。また、RNPは細胞内で**速やかに分解**されるため、標的配列以外のゲノム上の類似配列の切断(オフターゲット作用)を回避する効果も期待できることから、最近のゲノム編集研究のトレンドになっています。

参考文献：Hendriks, WT. *et al.*, Genome Editing in Human Pluripotent Stem Cells: Approaches, Pitfalls, and Solutions. *Cell Stem Cell*. 2016, **18**(1): 53.

RNPの細胞導入法



Google Scholarを用いた検索ヒット数



どの導入法も文献数は年々増加しています。

RNP関連製品

製品コード	製品名	製品内容
632641/632640	Guide-it™ Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready)	Cas9タンパク質
632635	Guide-it™ sgRNA <i>In Vitro</i> Transcription Kit	<i>In vitro</i> sgRNA調製キット
MIR6003	<i>TransIT</i> -X2® Dynamic Delivery System	トランスフェクション試薬

裏面：ユーザー様実施例

ユーザー様実施例

『マイクロインジェクション法によるCas9タンパク質とガイドRNA複合体(RNP)を用いたマウスのゲノム編集(ノックアウト/ノックイン)』

東京医科歯科大学 未来ゲノム研究開発支援室
石久保春美様 平岡優一様



東京医科歯科大学 未来ゲノム研究開発支援室 平岡優一様から、**Guide-it™ Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready)**(製品コード 632641)を用いた実施例をご提供いただきました。また、平岡様に詳しいご研究内容やCRISPR/Cas9に関するお話をお伺いいたしましたので是非ご一読ください。

■ 実験の背景

未来ゲノム研究開発支援室は、ゲノム編集技術(CRISPR/Cas)を用いた遺伝子改変マウス作製サービスを実施しており、遺伝子組換えマウスの樹立や飼育、特定病原体の排除、受精卵の凍結保存などで、所内の共同利用実験室の1つとして各分野の研究をサポートしている。

■ 経緯と問題点

タカラバイオ社のCas9タンパク質を使用する前は、複数社のCas9タンパク質を使用していた。しかし、Cas9タンパク質に含まれる高濃度のグリセロールにより、マイクロインジェクション時のキャピラリーに目詰まりを起し、その度にキャピラリーを交換する必要に迫られるため、作業者は大変ストレスを感じていた。また、製造ロットごとにゲノム編集効率が安定せず、複数社のCas9タンパク質を併用することで対応していたが、安定した活性を示しかつ継続的に入手可能な製品が必要だった。

■ 解決策

目詰まりの問題を解決するために、各社から発売のCas9タンパク質を調査したところ、タカラバイオ社のCas9タンパク質が低グリセロール濃度だったので、早速購入しロット間差と合わせて他社製品も含めた性能比較実験を行った。

■ 結果

タカラバイオ社のCas9タンパク質使用によりキャピラリーでのマイクロインジェクション作業時の目詰まりが改善され、作業時のストレスを大きく低減できるようになった。また、今まで実施した複数ロットでのCas9の性能は安定しており、問題なくゲノム編集を実施することができるようになった。

他社製品と比較するとタカラバイオ社のCas9では相同組換え修復による遺伝子ノックインの効率が優れていた。

下表にタカラバイオ社のCas9を用いたマウスのゲノム編集結果を示す。

遺伝子名	Type (挿入カセット長/欠失長)	ドナー	産仔数	改変あり 産仔数	効率
遺伝子A	KI (insert長=3 kb)	プラスミド	9	4	44%
遺伝子B	KI (insert長=7.5 kb)	プラスミド	11	4	36%
遺伝子C	KO (deletion長=51 kb)	オリゴDNAドナー	14	4	28%
遺伝子D	SNP	オリゴDNA	8	2	25%
遺伝子E	flox	プラスミド	6	2	33%
遺伝子F	flox	プラスミド	8	2	25%

■ 今後

ゲノム編集によるノックインやノックアウトを安定して作成可能なタカラバイオのCas9タンパク質に満足しており、引き続き使用していく予定である。

■ 実験プロトコール

Aida *et al.* Genome Biology (2015) 16:87

Aida *et al.* BMC Genomics (2016) 17:979

RNPを用いたゲノム編集関連の文献情報

受精卵: “RNP”をエレクトロポレーションで直接導入することによりモザイク変異を低減

Hashimoto, M *et al.*, Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. *Dev Biol.* 2016. **418**(1): 1.

T細胞: “RNP”をエレクトロポレーションで導入し、特定のがん抗原を認識するTCRに改変

Roth, TL. *et al.*, Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature.* 2018. **559** (7714): 405

植物: レタスやイネなど“RNP”のプロトプラスト・トランスフェクションによるノックアウト。

Woo, JW. *et al.*, DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol.* 2015. **33**(11): 1162.

緑藻クラミドモナス: エレクトロポレーションで“RNP”を直接導入しノックアウト

Shin, SE. *et al.*, CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci Rep.* 2016. **6**: 27810.

