

CRISPR/Cas9によるゲノム編集における アデノ随伴ウイルスDNAドナーを用いた高効率ノックイン

■はじめに

2013年春に登場したCRISPR/Cas9によるゲノム編集は、迅速かつ簡便に複数の遺伝子を同時にノックアウトできるなどの従来技術に対する優位点を背景に、多様な生物への応用が急速に進められています。

ゲノム編集では、ゲノムDNA特定部位をDNA二本鎖切断酵素により切断し、その切断された部位において、NHEJ（非相同性再結合）およびHR（相同組換え）の細胞内DNA修復機構が活性化されることを利用してゲノム改変を行います。NHEJによるゲノム編集は、切断されたゲノムDNAがNHEJにより修復される際に高頻度に生じる偶発的な塩基の欠失や挿入により、フレームシフト変異が起こり遺伝子を破壊（ノックアウト）をします。また、HRを利用したゲノム編集では、切断部位の両端に標的の相同配列をもつドナーDNAを導入することで、それを鋳型にHRによる遺伝子修復が起こることを利用し、ゲノム上の標的部位に外来遺伝子の挿入（ノックイン）を行います。

このうち、NHEJによるノックアウトは、細胞や*in vivo*において比較的高効率化が容易であることが報告されていますが、HRによるノックインの効率については、ドナーDNAのサイズ、標的細胞、ゲノム改変の標的部位によりその効率はまちまちとなり、現在でも十分な効率が得られているとは言い難い状況にあります。一方、新規機能付加のための外来遺伝子挿入を可能とするノックインによるゲノム改変の重要性は極めて高く、高効率なゲノム改変手法の開発が望まれています。

ここでは、ノックインを高効率化する手法の1つとして、AAV（アデノ随伴ウイルス）ゲノムをノックインドナーとして用いる方法を紹介します。

■アデノ随伴ウイルスによるノックインドナーの導入

ゲノム編集のノックインドナーとしては、一本鎖DNAオリゴを用いることで高効率なゲノム改変が可能である事が報告されていますが、一般的に用いられる短鎖の合成一本鎖DNAを用いたノックインの場合、改変できる遺伝子長は数十塩基程度が限界です。しかしながら、ノックインにより新規の機能を付加する場合には、通常、相同配列の部位を含めて数kb程度以上のノックインDNAが必要となります（相同配列は一般的に左右それぞれ500b以上）。

そこで、本検討では、5kb程度の一本鎖DNAをゲノムとして一過性感染型ウイルスであるアデノ随伴ウイルスをDNAドナーとして用いたノックイン法を検討しました。

アデノ随伴ウイルス（Adeno Associated Virus: AAV）は、アデノウイルスやヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスの存在下で増殖する非エンベロープウイルスである。アデノ随伴ウイルスベクター（AAVベクター）は文部科学省の定める省令（「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」平成16年文部科学省・環境省令第1号）にあるP1レベルの施設で取扱いが可能であり、アデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターと比較して、安全で取扱いの容易なウイルスベクターとして知られている。AAVベクターは増殖/非増殖のいずれの細胞にも遺伝子導入が可能であり、特に非分裂細胞においては長期間の発現が可能である。また、免疫原性が低く、動物個体への遺伝子導入にも適している。

標的配列へのCRISPR/Cas9の構築
(mRNA, plasmid, protein, virus等)

標的配列への相同組換えに必要なフラグメントと目的配列
を含んだノックインドナーの構築
(ssDNA, dsDNA, plasmid)

CRISPR/Cas9導入用ベクターとノックインドナーの
コトランスフェクション

ノックインした遺伝子によるセレクション
(耐性遺伝子およびレポーターによる選択)

セレクション後の目的細胞のクローニング
(限界希釈法、セルソーター等)

ノックインした遺伝子およびタンパク質等の
発現確認

図1.一般的なゲノム編集による細胞へのノックインフロー

▶ [AAVpro® Helper Free System \(AAV2\)](#)

製品コード 6230 1Kit ¥150,000

▶ [AAVpro® Helper Free System \(AAV5\)](#)

製品コード 6650 1Kit ¥150,000

▶ [AAVpro® Helper Free System \(AAV6\)](#)

製品コード 6651 1Kit ¥150,000

AAVをDNAドナーとして用いたGAPDH遺伝子C末端へのAcGFP遺伝子のノックイン

■本実験の流れ

本実験では、図.2のフローに従い、HEK293細胞を用いたGAPDH遺伝子C末端へのAcGFP遺伝子とノックイン細胞の選択に必要なpuromycin耐性遺伝子の導入を行った(図.4参照)。

1. CRISPR/Cas9 plasmidの構築

<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/index.php>を用いてsgRNAのターゲット認識配列を選択し、Cas9/sgRNAプラスミドを構築した。

2. 相同組換えに必要なフラグメントと目的遺伝子配列を搭載したAAVベクター(ノックインドナー)の構築

AAVpro® Helper Free System (AAV2) (6230)のpAAV-CMVに図.3のようにドナーDNAをコードするAAVプラスミドを作製した(両アームは1.で設定したCRISPR/Cas9による認識配列の前後1kbよりそれぞれ選択)。本プラスミドベクターとAAVpro® Helper Free System (AAV2) (6230)に付属のpRC2 VectorおよびpHelper Vectorを用いて、ドナーDNAを搭載したAAVベクター(AAVドナー)を産生した(AAVベクターのパッケージング操作は、6230のユーザーマニュアルに従った)。

3. 培養細胞へのCRISPR/Cas9プラスミド導入とAAVドナー感染

HEK 293細胞へのCas9/sgRNAプラスミドのトランスフェクション直後に、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ のAAVドナーを培地中添加し感染した。比較対象としてAAVドナーと同じノックイン配列(左右両アーム、AcGFP、PGKプロモーター、Puromycin耐性遺伝子、loxP遺伝子)をコードしたプラスミドとCas9/sgRNAプラスミドのコトランスフェクションも実施した(図.5)。

4. FACS解析

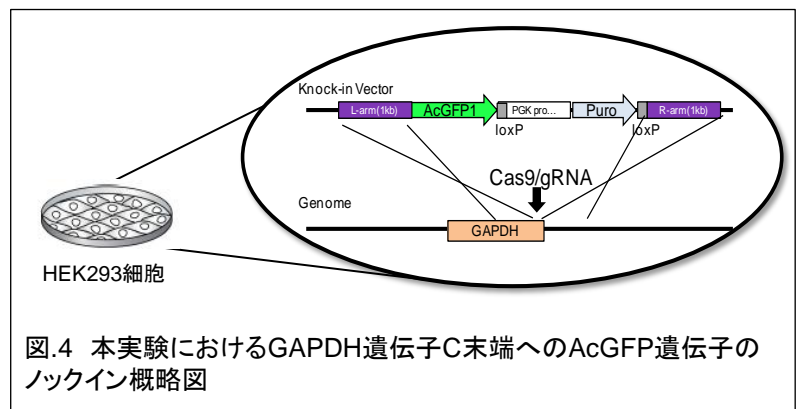
3.のゲノム編集処理後、HEK293細胞を3日間培養した後、FACSを用いてAcGFP陽性細胞の割合を解析した。

5. puromycinによるノックイン細胞のセレクション

HEK293細胞にpuromycin添加培地を加え、ノックインされた細胞のセレクションを行った。

6. クローニング化細胞の解析

得られたクローンのノックイン部分両端をPCR増幅し、増幅産物の有無とサイズを電気泳動により解析することで、ノックインDNAの有無を確認した(図.6)。また、増幅産物のシーケンス解析を行い、ノックインDNAの周辺の塩基配列を確認した(図7上段)。さらに、得られたクローン(Clone#1~#3)のAcGFPの発現をFACSにより解析した(図7下段)。



CRISPR/Cas9 plasmidの構築

相同組換えに必要なフラグメントと目的配列を含んだAAVノックインドナーの構築

CRISPR/Cas9 plasmidとAAVノックインドナーのコトランスフェクション

FACSによるノックイン効率の解析

puromycinによるセレクション

クローニングした細胞の解析

図.2 AAVをノックインドナーとして用いたプロモーターレスAcGFP遺伝子とPGKプロモーター制御下のpuromycin耐性遺伝子の293細胞へのノックイン実験フロー

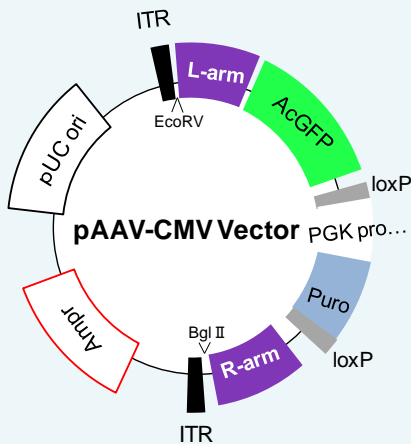


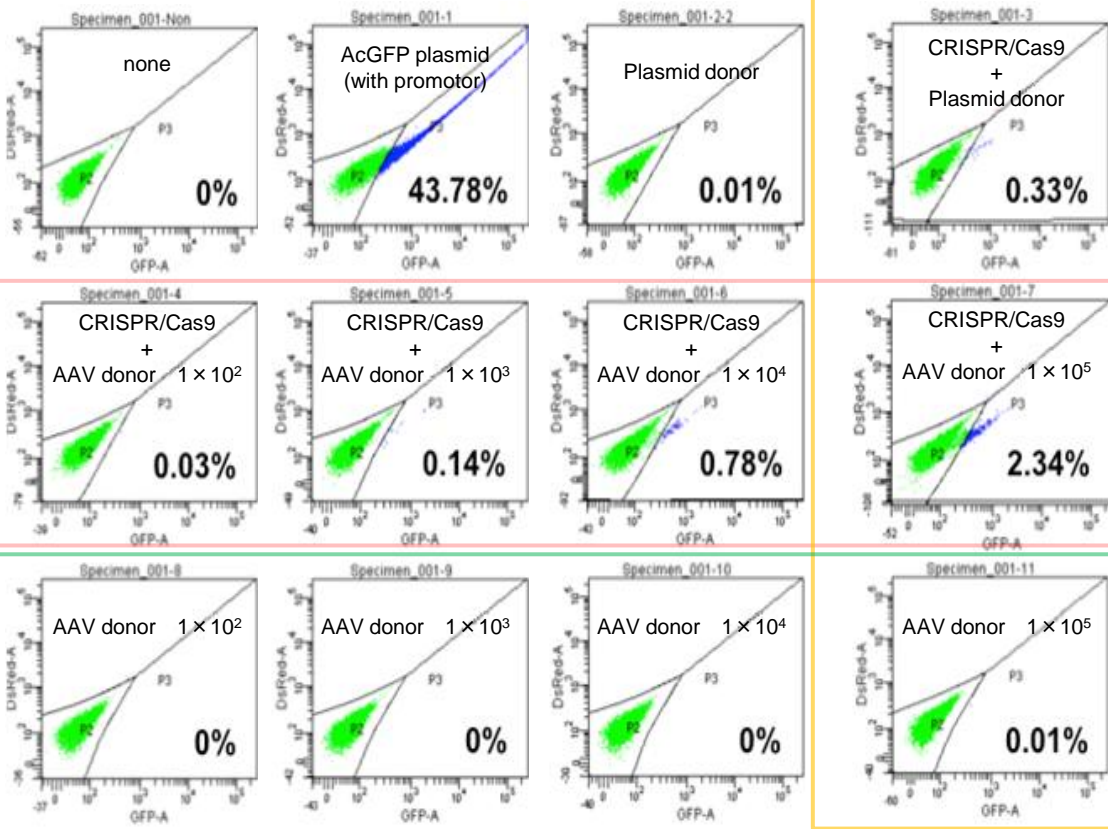
図.3 一本鎖ドナーDNA生成用AAVベクターAAVpro® Helper Free System(AAV2)(製品コード:6230)のpAAV-CMV VectorをEcoRVとBgl IIによる制限酵素処理にて両ITR間の不要領域を取り除いた後、左右両アーム、AcGFP、PGKプロモーター、Puromycin耐性遺伝子、loxP遺伝子を含むフラグメントをIn-Fusion®によってクローニングした。

▶ In-Fusion® HD Cloning Kit

製品コード 639648 10回 ¥23,000

▶ In-Fusion® HD Cloning Plus

製品コード 638909 10回 ¥47,400



plasmidドナーDNAと比較してAAVドナーの方がノックイン効率が7倍となった。

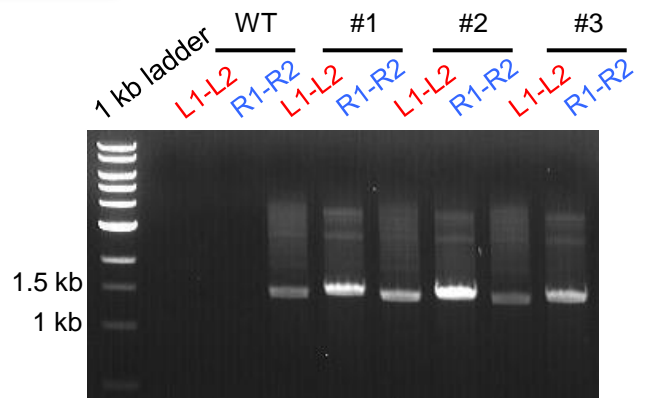
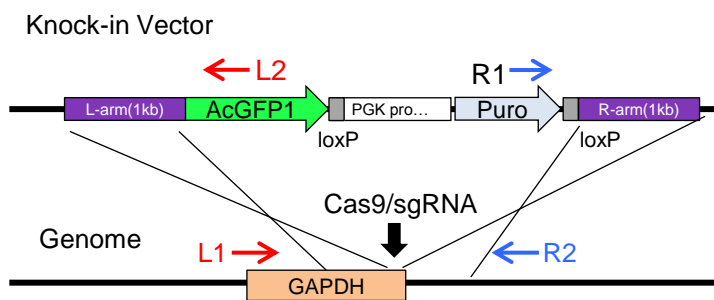
AAVの導入量を増やすにつれてノックインの効率が上昇した。

AAVドナーだけではノックインは起こらなかった。(非特異的なノックインのリスクは低い。)

図.5 ゲノム編集後HEK293細胞のFACS解析結果

PCR増幅配列のMap

PCR

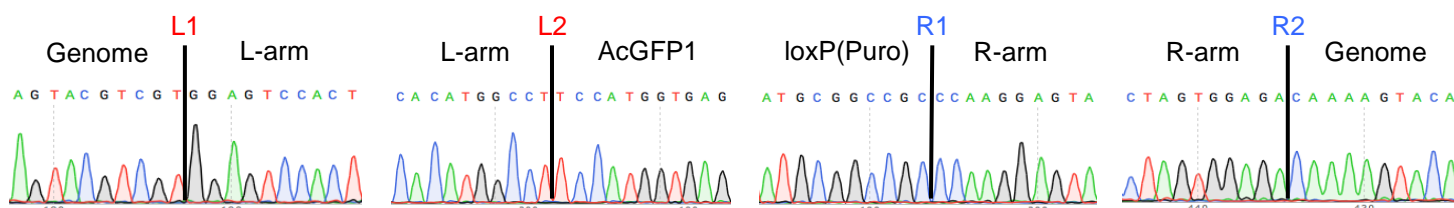


予想増幅サイズ
 L1-L2: 1425 bp
 R1-R2: 1481 bp

図.6 取得クローンを用いたノックイン周辺配列のPCR増幅とその電気泳動解析結果

取得クローンのシーケンス解析

Clone #1



取得クローンのFACS解析

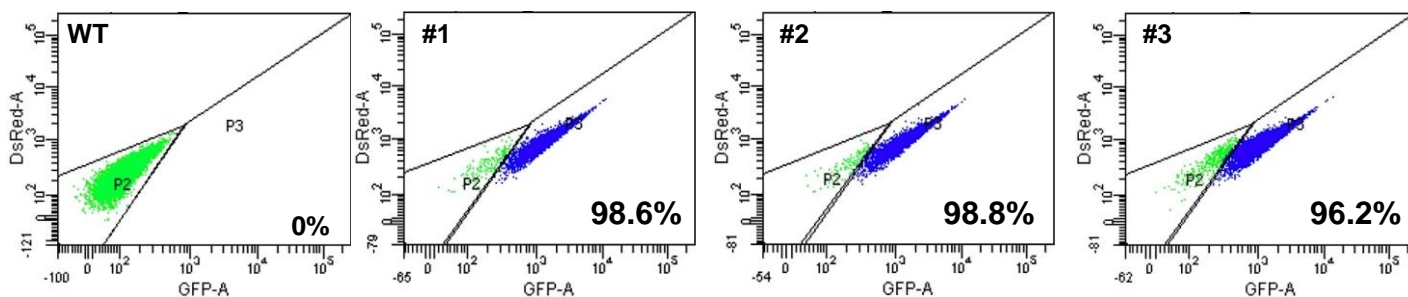


図.7 Clone#1のノックイン配列のシーケンスの確認と株化したクローンのFACS解析

■ 結果

AAVをノックインドナーとして用いることでplasmid DNAドナーと比較し約7倍のAcGFP陽性細胞が取得できた(図.5)。一方、AAVドナーのみの感染ではAcGFP陽性細胞の増加は見られなかったことから、AAVドナーとCRISPR/Cas9の組み合わせによるAcGFP取得効率の増加は、ターゲット特異的な遺伝子挿入であるものと考えられた。また、本実験で、薬剤(*puromycin*)選択後に取得したクローンの解析より、期待通りのノックイン細胞が取得できることが確認できた(図.7)。

■ ゲノム編集関連製品

	製品名	容量	製品コード	価格(税別)	備考
In vitro でsgRNAを合成して有効性を試験	Guide-it™ Complete sgRNA Screening System	1 System	631439	¥120,000	-
アデノ随伴ウイルスベクタータイプのCRISPR/Cas9システム	AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2)	1 Kit	632608	¥150,000	-
プラスミドベクタータイプのCRISPR/Cas9システム	Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Green)	1 Kit	632601	¥73,000	☑
	Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Red)		632602	¥73,000	☑
ゲノム編集効率のモニター	Guide-it™ Mutation Detection Kit	25回	631448	¥28,000	-
		100回	631443	¥88,000	
ゲノム編集クローンのジェノタイプング	Guide-it™ Genotype Confirmation Kit	100回	632611	¥88,000	-
Indels変異の配列確認	Guide-it™ Indel Identification Kit	10回	631444	¥51,000	-
CRISPR/Cas9システムのCas9抗体	Guide-it™ Cas9 Polyclonal Antibody	100 µl	632607	¥40,000	-
		100 µl × 3	632606	¥98,000	

☑ご購入に際してライセンス確認が必要となります。

☑営利施設の場合、ご購入前にライセンス(有償)を取得する必要があります。