

長鎖一本鎖 DNA (ssDNA) ドナーを用いた相同組換え修復による iPS 細胞の効率的な遺伝子ノックイン



ポイント

- ・ ヒト iPS 細胞の *SEC61B* または *TUBA1A* 遺伝子座に AcGFP1 配列をノックインするための一本鎖ドナーDNA (ssDNA) の設計
- ・ ヒト iPS 細胞への ssDNA のエレクトロポレーションは、二本鎖 DNA (dsDNA) と比較して、細胞毒性が劇的に低下
- ・ ゲノム編集後の FACS による細胞解析から、AcGFP1 のノックイン効率は 3%~13%
- ・ クローン細胞株の分析から、AcGFP1 が単一アレルまたは両アレルにノックインされており、さらに AcGFP1 融合タンパク質は正しい細胞内局在を示した

はじめに

ゲノム編集技術 CRISPR/Cas の一般的な応用例として、特定のゲノム遺伝子座に DNA 配列を置換・挿入するノックインが挙げられます。遺伝子ノックアウトは、遺伝子修復時の塩基挿入・欠損などのエラーが生じやすい非相同末端再結合 (non-homologous end joining : NHEJ) と呼ばれる修復機構を利用しています。これに対しノックインは、相同組換え修復 (homology-directed repair : HDR) と呼ばれる修復機構が利用され、Cas9 タンパク質と sgRNA に加えてノックインドナーDNA が使用されています (Hsu *et al.*, 2014; 図 1)。

HDR に用いられるテンプレート (ノックインドナーDNA) は、線状あるいはプラスミド状の二本鎖 DNA (double strand DNA : dsDNA) と一本鎖 DNA (single strand DNA : ssDNA) があり、最近の知見では、使用するテンプレートによって相同組換えの修復メカニズムが異なることが示唆されています。dsDNA を用いた場合、減数分裂期の相同組換え (homologous recombination : HR) に類似した、RAD51 リコンビナーゼによるメカニズムで修復されますが、ssDNA を用いた場合、RAD51 には依存せず、ファンコニー貧血 (Fanconi Anemia) の DNA 修復経路と同じ因子によって修復が行われます (Richardson *et al.*, 2018)。

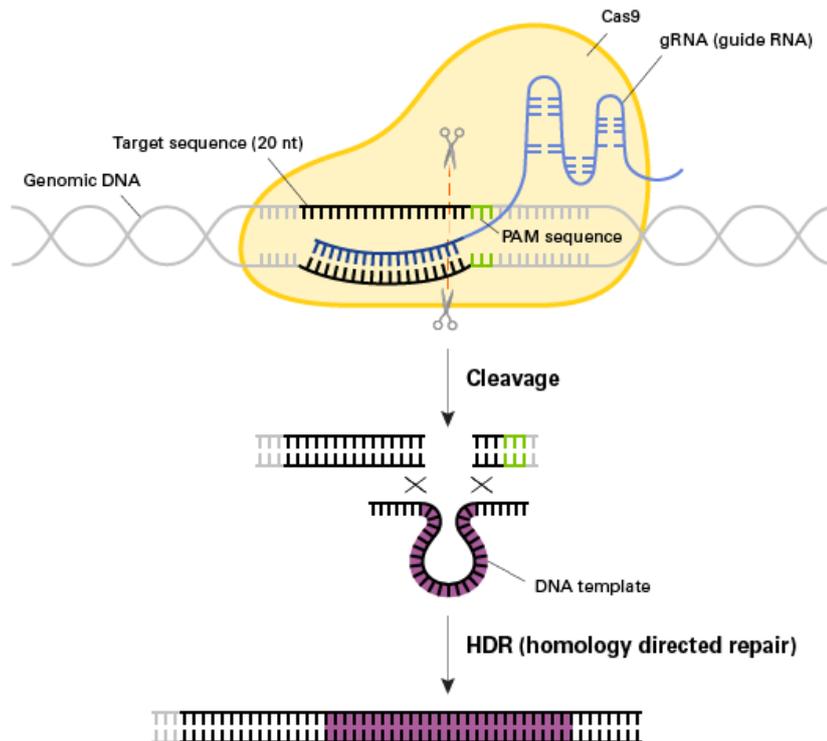


図 1. 相同組換え修復を用いた CRISPR/Cas による遺伝子ノックイン

Cas9/sgRNA 複合体による切断でゲノム DNA の標的部位に二本鎖切断が生じると、標的部位と相同性のある DNA テンプレートが相同組換え修復 (HDR) に用いられ、DNA テンプレート上の外来配列 (紫) がノックインされる。

HDR を利用したノックインは、一塩基置換のような短鎖の編集だけでなく、蛍光レポーターや遺伝子プロモーターなどの長い配列の挿入にも用いられています。またノックイン効率は、生物種や細胞種、標的とするゲノム領域、インサートのサイズなどによって大きく異なります。一般的な細胞への導入方法は、Cas9/sgRNA 複合体 (ribonucleoprotein: RNP) と DNA テンプレートを同時にエレクトロポレーションする方法があり、幅広い細胞種に用いることができ、Cas9/sgRNA の発現が一時的でありオフターゲット効果を抑制することもできます。

ノックインに用いられる HDR テンプレートには dsDNA と ssDNA がありますが、ssDNA を用いてノックインを行った場合、dsDNA と比較して細胞毒性が低く、かつオフターゲットが生じる可能性を抑えることができます (Roth *et al.*, 2018)。

200 nt 以下の短い ssDNA テンプレートは通常、オリゴ DNA 合成により調製しますが、長い ssDNA の場合、オリゴ合成では莫大な費用を要するため、最近注目されているのが、センス鎖またはアンチセンス鎖の選択的分解により、二本鎖の PCR 増幅産物から最大 5kb の高品質 ssDNA を調製することが可能である、[Guide-it Long ssDNA Production System](#) です。

CRISPR/Cas を用いたノックイン技術の利用により、部位特異的な蛍光タンパク質配列の挿入が可能となり、目的遺伝子が元々持っている発現調節やシグナル伝達系によって制御される融合タンパク質遺伝子を得られます。つまり CMV プロモーターのような外来プロモーターからの発現やランダムインテグレ

TECH NOTE

ーションされた遺伝子から発現させるのではなく、内在性の遺伝子と同じプロモーターで発現する蛍光タンパク融合タンパク質を発現できます。Guide-it Long ssDNA Production System が本アプリケーションに適していることを示すために、染色体上の *SEC61B* 遺伝子とチューブリン遺伝子 (*TUBA1A*) の N 末端に AcGFP1 を融合させた 2 種類のヒト iPS 細胞株を作製しました。

実験結果

ssDNA テンプレートの設計と作製

SEC61B、*TUBA1A* 遺伝子座へ AcGFP1 をノックインするため、AcGFP1 配列の上流下流に長さ~350 nt のノックイン領域のホモロジー配列がある PCR 産物を設計し (図 2)、Guide-it Long ssDNA Production System を用いてセンス鎖およびアンチセンス鎖の ssDNA を調製しました。エレクトロポレーションでの ssDNA と dsDNA を用いた比較実験のため、一本鎖化処理していない各 PCR 産物を dsDNA として使用しました。ホモロジーアームの長さとのノックイン効率には指数関数的関係があり、長さ 350~700 nt のホモロジーアームを持つ ssDNA テンプレートにおいて最適なパフォーマンス結果が得られることが明らかにされています (Li *et al.*, 2018)。ヒト iPS 細胞を用いた弊社研究でも、350 nt のホモロジーアームで最適なパフォーマンスが観察され、これより長いアームを使用してもノックイン効率が大幅に向上しませんでした。

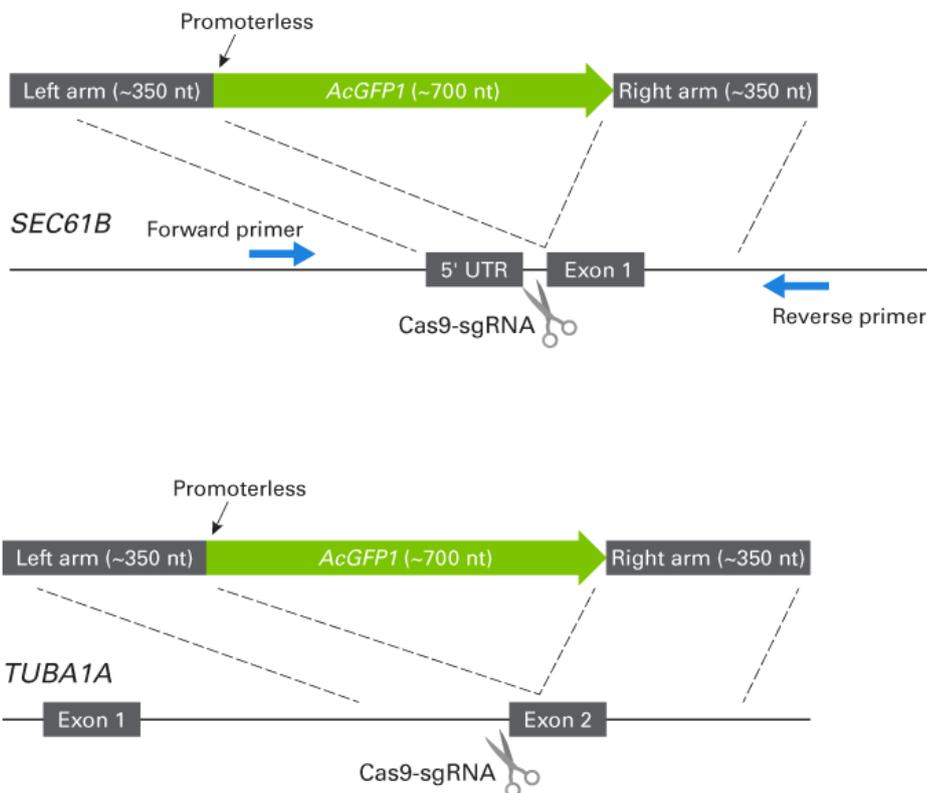


図 2. Cas9 による切断部位と、*SEC61B* および *TUBA1A* 遺伝子座における AcGFP1 ノックインのための ssDNA

TECH NOTE

各 ssDNA テンプレートは、AcGFP1 コード配列の左右を、350 nt のホモロジーアームで挟むように設計した。*SEC61B* 遺伝子座に挿入された AcGFP1 配列を検出するために使用した PCR プライマーの位置を青い矢印で示す。各 ssDNA テンプレートにはプロモーター配列を含んでいないため、AcGFP1 融合タンパク質は、*SEC61B* および *TUBA1A* 遺伝子の内在性プロモーターによって発現される。

ヒト iPS 細胞への ssDNA のエレクトロポレーションは dsDNA よりも顕著に細胞低毒性

Guide-it Recombinant Cas9 (3 µg/µl) とエレクトロポレーション装置 Neon Transfection System

(Thermo Fisher Scientific 社) を用いて、プロトコールに従って Cas9/sgRNA 複合体 (RNP) と HDR テンプレート (ssDNA または dsDNA) を同時に iPS 細胞へ導入しました。RNP は、組換え Cas9 タンパク質と *SEC61B* または *TUBA1A* の遺伝子座を標的とする sgRNA をインキュベートすることによって調製し、dsDNA または ssDNA (センス鎖またはアンチセンス鎖) などの HDR テンプレートと組み合わせて使用しました。次に、様々な RNP-HDR テンプレートの組み合わせと、HDR テンプレートを含まない RNP (ネガティブコントロール) を、標準条件下において Cellartis® human iPS cell line 18 (ChiPSC18) 細胞にエレクトロポレーションを行って導入しました。48 時間後、各細胞集団に対してイメージングを行い、それぞれの RNP-HDR テンプレートの組み合わせにおける相対的な毒性を評価しました (図 3)。 ssDNA または dsDNA の HDR テンプレートを、RNP とともにエレクトロポレーションによって導入した場合、RNP 単体導入時と比較すると毒性を示しましたが、dsDNA を使用した際の毒性は、ssDNA の使用よりもはるかに高い結果でした。これは、タカラバイオの結果や他研究者の結果と合致しています (Roth *et al.*, 2018)。

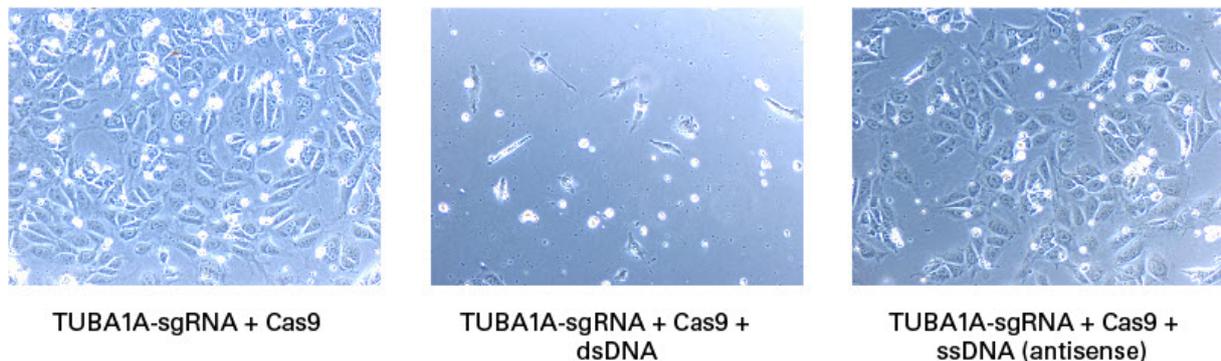


図 3. iPS 細胞への dsDNA または ssDNA エレクトロポレーションの毒性比較

HDR テンプレート (dsDNA または ssDNA) の非存在下または存在下において、ChiPSC18 細胞に、*TUBA1A* 遺伝子座を標的とする Cas9/sgRNA 複合体をエレクトロポレーションで導入した後、48 時間培養した。その結果、Cas9/sgRNA 複合体を単独で導入した場合に比べて毒性が増加すること、さらに ssDNA は dsDNA に比べて毒性が低いことが明らかとなった。

フローサイトメトリーによる AcGFP1 ノックイン効率の解析

ゲノム編集を行った細胞群をフローサイトメトリーで解析しました（図4）。この分析において、蛍光を示す細胞の割合はノックインに成功した割合（すなわち、ノックイン効率）と考えられます。各遺伝子座において、センス鎖またはアンチセンス鎖の ssDNA テンプレートを使用したところ、ノックイン効率に差が見られました。例えば、*SEC61B* の場合、センス鎖のテンプレートはアンチセンス鎖のテンプレートよりもノックイン効率が高いのに対し（12%：7%、図4参照）、*TUBA1A* の場合では、アンチセンス鎖のテンプレートの方がノックイン効率は高い結果でした（2.7%：1.3%、図4参照）。現在、200 nt 以上の ssDNA テンプレートについて、センス鎖またはアンチセンス鎖のどちらを優先して使用すれば良いかに関する明確なルールはありませんが、特に短い一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ssODN）の場合は、テンプレートの方向性が、ゲノム編集効率に影響を与えることが明らかとなっています（Bollen *et al.*, 2018）。

さらに、フローサイトメトリーによって AcGFP1 発現を確認した細胞を、限界希釈法で単一細胞へ分離し、[Cellartis iPSC rCas9 Electroporation and Single-Cell Cloning System](#) を用いてクローン細胞株を作製しました。

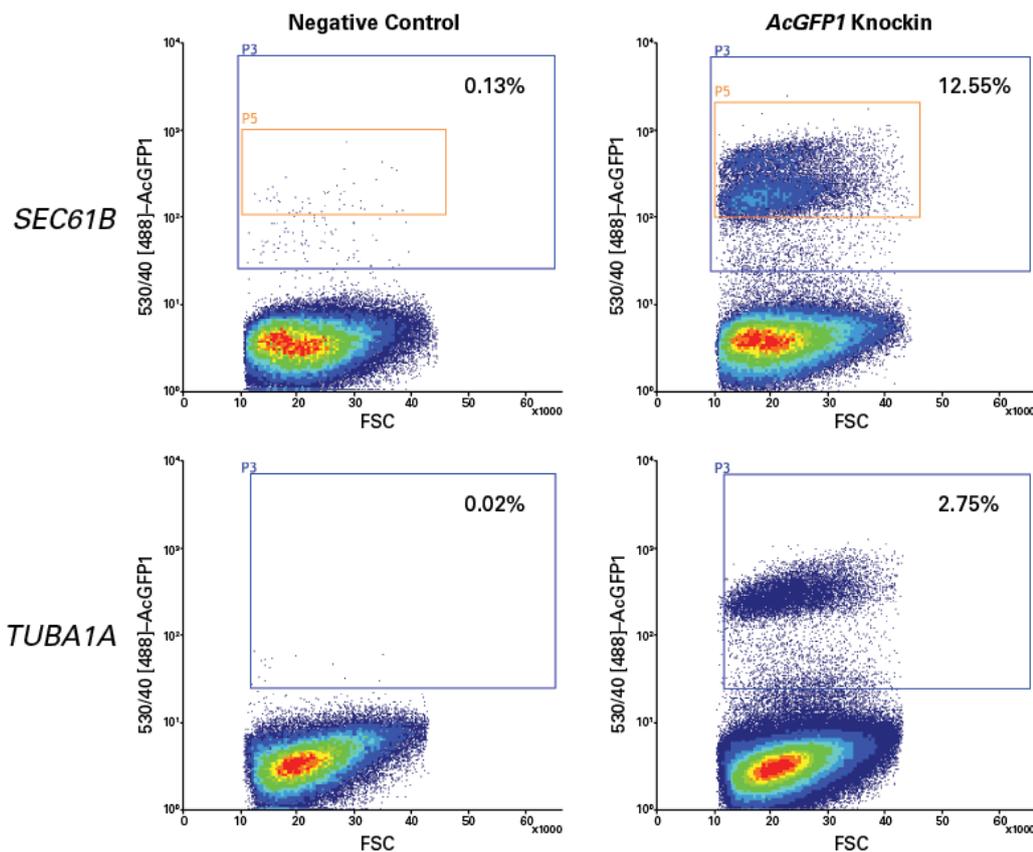


図4. フローサイトメトリー解析を用いた iPS 細胞における *SEC61B* 及び *TUBA1A* に対する ssDNA のノックイン効率の比較

エレクトロポレーション後に培養を行い、ゲノム編集細胞とネガティブコントロール細胞について、AcGFP1 の発現をそれぞれフローサイトメトリーによって解析し、各集団における蛍光細胞の割合を測定することによって、ノックイン効率

TECH NOTE

を求めた。*SEC61B*ではセンス鎖の ssDNA を用いた場合 13%、*TUBA1A*ではアンチセンス鎖の ssDNA を用いた場合 2.75%のノックイン効率を示した。

PCR による単一アレルまたは両アレルのノックインの検出

ゲノム編集後のクローン細胞株の特性を明らかにする重要なステップとして、ノックイン遺伝子が単一アレルであるか両アレルで起こっているかを定めることがあります。挿入された配列が、AcGFP1 の様に十分な長さがある場合、HDR テンプレートの上流と下流に位置するゲノム領域に対応するプライマーを設計し PCR 増幅することにより、どのようなノックインとなったかを簡単に評価することができます (図 5)。この解析では、野生型遺伝子を PCR 増幅した場合、AcGFP1 でノックインされたアレルよりもサイズが小さい増幅産物が得られます。*SEC61B*に AcGFP1 をノックインした細胞クローンのジェノタイプを調べるため、いくつかの細胞クローンからゲノム DNA を抽出し PCR を行いました。増幅産物の電気泳動から、多くのクローン株は、両アレルとも AcGFP1 がノックインされており、センス鎖とアンチセンス鎖、どちらの ssDNA テンプレートを用いても同様の結果を示しました (図 5)。

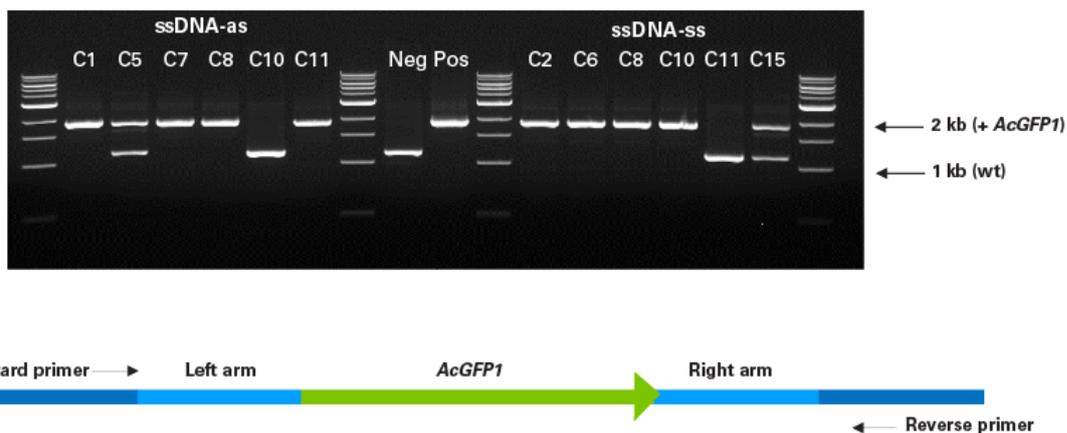


図 5. 標的部位の PCR 増幅による単一アレルまたは両アレル遺伝子ノックインの検出

ゲノム DNA を抽出し、HDR テンプレートと相同な配列を持つゲノム領域の上下流に結合するプライマーを用いて PCR を行った。ssDNA テンプレートにおいて、AcGFP1 とホモロジーアームをコードする配列をそれぞれ緑色と水色で示す。また、プライマーは AcGFP1 配列の挿入の有無によって、増幅産物長が異なるように設計された (1.9 kb と 1.2 kb)。電気泳動の結果、ssDNA-as のレーン C5 の様な 2 種類のバンド、あるいは ssDNA-as のレーン C1 の様な 1.9 kb に対応するバンドのみが確認できたことから、調べた細胞株の大部分は単一もしくは両アレルに AcGFP1 がノックインされていることが分かった。また、ssDNA-ss のレーン C11 の様に 1.2 kb に対応するバンドのみ確認できたことから、細胞株の中には野生型クローンが 2 つ含まれていたことが明らかとなった。

蛍光顕微鏡による AcGFP1 融合タンパク質局在化の解析

単離・培養した AcGFP1 発現細胞株について、蛍光顕微鏡観察を行いました (図 6)。各クローン細胞において、AcGFP1 の蛍光は、ゲノム上の標的遺伝子 (*SEC61B*、*TUBA1A*) によってコードされるタンパク質の標準的な局在パターンと一致しました。*SEC61B* 遺伝子座を標的とした場合はエンドソーム区画、*TUBA1A* 遺伝子座を標的とした場合は微小管においてそれぞれ蛍光が確認されました。これらの結果から、*SEC61B* または *TUBA1A* を標的とする RNP と ssDNA テンプレートをエレクトロポレーションによって導入した場合、標的遺伝子座に AcGFP1 がノックインされ、発現した融合タンパク質は内在性標的タンパク質と同様の局在化が起こることが示唆されました。

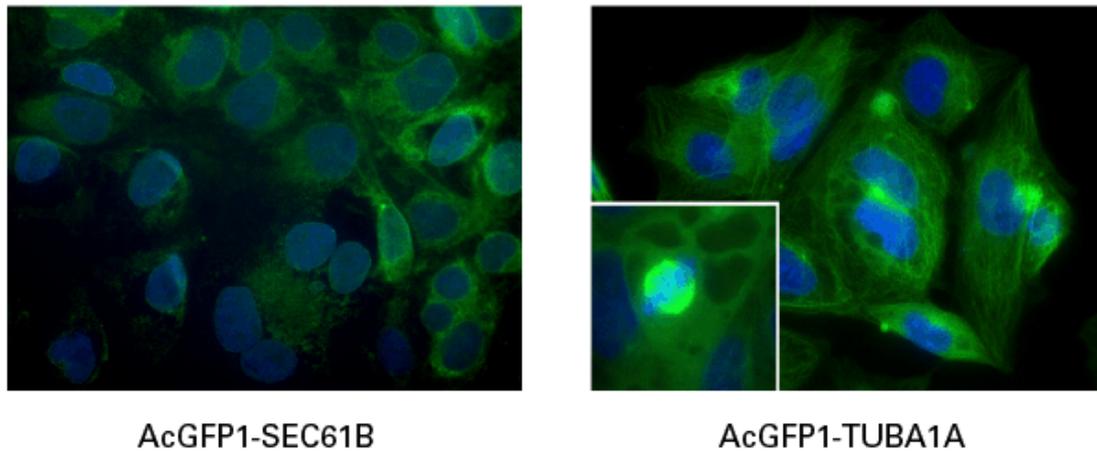


図 6. ゲノム編集後のクローン細胞における AcGFP1 の局在解析

ゲノム編集を行った細胞由来の AcGFP1 発現細胞株を固定後、DAPI に対比染色し、蛍光顕微鏡で観察した。いずれの場合も、AcGFP1 は内在性タンパク質と同様、エンドソーム区画 (*SEC61B*) あるいは微小管 (*TUBA1A*) にそれぞれ局在化していた。

結論

CRISPR/Cas と HDR テンプレートを組み合わせることにより、様々な実験に対応できる画期的なゲノム編集技術が誕生しました。しかし、この手法によるゲノム編集効率は、細胞種や標的となるゲノム遺伝子座によって大きく異なり、また毒性やオフターゲット効果を最小限に抑えることが長年の課題となっていました。今回紹介した実験では、Cas9/sgRNA 複合体 (RNP) と Guide-it Long ssDNA Production System を用いて作製した ssDNA をエレクトロポレーションでヒト iPS 細胞に導入することにより、毒性を最小限に抑え、長鎖テンプレートを効率的かつ正確にノックインすることが可能であることが示されました。本手法は、比較的シンプルで費用対効果も高いため、今後も CRISPR/Cas9 による正確で効率的なゲノム編集に貢献することが期待されます。

参考文献

TECH NOTE

Bollen *et al.*, How to create state-of-the-art genetic model systems: strategies for optimal CRISPR-mediated genome editing. *Nuc. Acids Res.* **46**, 6435–6454 (2018).

Hsu *et al.*, Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* **157**, 1262–1278 (2014).

Li *et al.*, Design and specificity of long ssDNA donors for CRISPR-based knockin. bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/178905> (2017).

Richardson et al., CRISPR-Cas9 genome editing in human cells occurs via the Fanconi anemia pathway. *Nat. Gen.* **50**, 1132–1139 (2018).

Roth *et al.*, Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nat. Lett.* **559**, 405–409 (2018).