

Dharmacon Edit-R 化学合成crRNAペアを用いた CRISPR-Cas9システムによる ヒトmicroRNA (has-miR-221) の機能的ノックアウト

John A. Schiel, Angela Schoolmeesters, Eldon T. Chou, Elena Maksimova, Travis Hardcastle and Melissa L. Kelley Dharmacon, A Horizon Discovery Group Company, Lafayette, CO, USA

はじめに

Streptococcus pyogenes由来のCRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) - Cas9 (CRISPR-associated 9) システムで は、Cas9ヌクレアーゼが、ターゲット配列に相補的なガイドRNA (guide RNA)と複合体を形成してゲノムDNAのターゲット配列を認識 し、PAM (protospacer adjacent motif) 配列より上流の二本鎖DNAを切断 します。ガイドRNAとしてCRISPR RNA (crRNA): trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) ハイブリッドと用いる方法と、シングルガイドRNA (single guide RNA: sgRNA) を用いる方法があります。切断されたゲノムは修復機 構が働いて再結合しますが、切断されたゲノムの末端において高頻度で 塩基配列の挿入が起こったり欠失が生じたりします。したがって、再結合し てもDNAのフレームがシフトし、切断個所の遺伝子がノックアウトされま す。タンパク質をコードする遺伝子を標的としてCRISPR-Cas9システムを用 いる場合、遺伝子全体に渡って多数のPAM配列(S. pyogenesではNGG)が 存在しているため、それらの中からガイドRNAを一つ選択するのが通常で す。CRISPR-Cas9システムを用いた大抵のゲノム編集実験では、遺伝子の 機能的なノックアウトのためには一つのガイドRNAの使用で十分です。し かしながら、幾つかのアプリケーション、例えば、より大きな塩基欠失を生じ させることで確実な遺伝子ノックアウトを実現したり、エクソン・長鎖noncoding RNA (IncRNA)・転写制御因子を除去したりするために、2つのガイ ドRNAを同時に使用するほうが良い場合があります(論文1)。

microRNAの機能を完全にノックアウトするアプリケーションにおいても、2つのガイドRNAを同時に使用する方法が有効です。

内在性のmicroRNAは、細胞内に存在する短鎖のnon-coding RNAで、mRNAからタンパク質への翻訳の阻害やmRNAの分解を通して、遺伝子の発現調節に関与しています(論文2)。microRNAは、ステムループ構造をもつ分子として転写され、その後、いくつかの酵素によって、成熟(標的)鎖を1つまたは2つ有する機能的成熟型microRNAにプロセスされます。これらのステムループ構造は、バルジまたはミスマッチのために二次構造を有

することが知られており、通常相補的ではありません。CRIPSR-Cas9システムを使用してmicroRNAをノックアウトするためには、microRNAのステムループ領域をターゲットとなるようにガイドRNAを設計する必要がありますが、それらの領域は短く(60~90 bp) (論文3)、ガイドRNAの認識するPAM配列が限られています。また、CRISPR-Cas9システムを用いてmicroRNAのステムループ内に導入した小さい塩基挿入・欠失が、microRNAの機能を効果的にノックアウトするほど破壊的であるかどうかは不明です(論文4)。これらの限界を克服するために、1つのガイドRNAを使用するよりも、2つのガイドRNAの同時使用が、成熟microRNAをコードするゲノム領域により大きな欠失を起こすことが示されています(論文5)。

本アプリケーションノートでは、ヒトmicroRNAの一つであるhsa-miR-221をコードするゲノム配列を切り出してノックアウトクローン細胞株を作製する際に最適なcrRNAペアを決定した事例をご紹介します。

結果と概要

ゲノム編集細胞を作製するには、Cas9ヌクレアーゼおよびcrRNA:tracrRNAが、できるだけ多くの細胞に導入されるようにトランスフェクション条件を至適化することが重要です。そうすることによって、目的の変異の導入されたゲノム編集細胞を選択する際に、解析に必要な細胞数を減らすことができます。私共と他の研究者らは、CRISPR-Cas9システムによる二本鎖DNA切断後の非相同末端結合修復では、標的配列の近くまたは内部のゲノムにおいて比較的小さい塩基挿入・欠失を生み出すため、microRNAの機能をノックアウトするのに十分ではない可能性があることを見出しています(論文6)。本研究では、Dharmacon CRISPR Design Tool (dharmacon.horizondiscovery.com/gene-editing/crispr-cas9/crispr-design-tool/)を用いて、アノテーションされたhsa-miR-221前駆体配列の各末端にcrRNAを複数設計し、化学合成crRNAペアを用いてゲノムDNAに欠失を生じさせることを試みました(図1)。

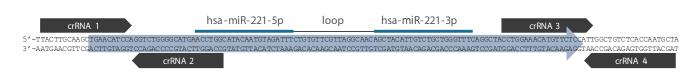


図1. 成熟型microRNAおよびcrRNA標的配列を含むmiR-221ゲノム配列

Cas9ヌクレアーゼを安定的に発現するU2OS細胞に、異なる

crRNA:tracrRNAペアをトランスフェクションしました。トランスフェクション から72時間後に回収した細胞集団に対してミスマッチ検出アッセイを行っ て編集効率を評価し、どのcrRNA: tracrRNAペアが最も効率よく塩基挿入・ 欠失を生み出すかを評価しました(図2)。4組のcrRNA:tracrRNAペアをト ランスフェクションしたところ、同等の遺伝子編集効率が得られたことから(図3)、crRNAの向きやターゲット配列は実験結果にほとんど影響しないこと が判明しました。そこで、代表例として、crRNA2およびcrRNA 4のペアを細 胞にトランスフェクション後(それによって102 bpの欠失を生じる)、96ウェ ルプレートの48ウェルへ展開して単一コロニー増殖を試み、そのうち9つを さらなる分析のために無作為に選択しました。Cas9切断部位を含む領域を PCRにより増幅し、得られたPCR産物をアガロースゲル上で電気泳動しまし た(図4)。non-targeting crRNAネガティブコントロールでトランスフェクト したU2OS細胞についても同様にPCRおよび電気泳動を行いました。9つの クローン細胞株のうち5つは、単一の低分子量PCRバンドが見られたことか ら、この細胞株に存在する全てのhsa-miR-221対立遺伝子についてホモ接 合性欠失が示唆されました(図4、青い星印)。一方、他の2つの細胞株は、さ まざまな長さのヘテロ接合型欠失が示唆されました(図4、青い疑問符)。9 つのクローン化した細胞株の全てについて、正確なゲノム欠失を決定する ためにサンガーシークエンシング解析による塩基配列決定を行いました。 クローン細胞株#1、#4、#5、#6および#9は予想される102 bpの欠失を

含んでいました(図5)。さらにクローン細胞株#3は、2つのcrRNA位置の間にヘテロ接合性の挿入・欠失がありましたが、細胞株#8は、crRNA 2およびcrRNA 4の両方のPAMの周りに小さな欠失を含んでいました(図5)。

hsa-miR-221の機能的ノックアウトのレベルを評価するために、上述の9つのクローン細胞株に、hsa-miR-221応答エレメントを含む二重ルシフェラーゼレポータープラスミドをトランスフェクトしました。hsa-miR-221の成熟型microRNAが細胞内に存在する場合、それはmicroRNA応答エレメントに結合し、ルシフェラーゼの翻訳を抑制します。hsa-miR-221がノックアウトされている場合には、ルシフェラーゼ発現は抑制されず、その発光強度を測定することができます。

hsa-miR-221についてホモ接合欠失をもつ細胞株 # 1、# 4、# 5、# 6および# 9において、ネガティブコントロール細胞(Edit-R Non-targeting crRNA control #1を導入した細胞)と比較して有意なレベルのルシフェラーゼ活性が測定されました(図6)。さらに、ヘテロ接合性の挿入・欠失をもつ細胞株# 3や、crRNAペアの両方に小さな欠失をもつ細胞株# 8についても、ネガティブコントロール細胞と比較して有意なレベルのルシフェラーゼ活性が測定されました(図6)。

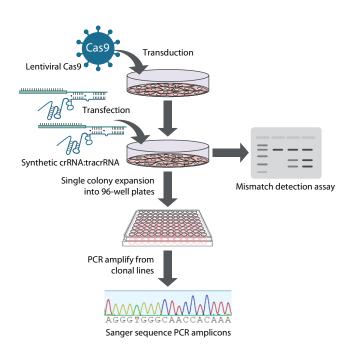


図2. crRNAペアを使用してクローン細胞株を作製するためのCRISPR-Cas9実験ワークフロー

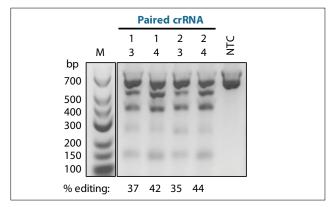


図3. crRNAペアを用いたhsa-miR-221遺伝子の編集

ゲノムDNAの特定の2か所をそれぞれターゲットとするように設計されたcrRNAペアを、U2OS-Cas9細胞にトランスフェクションしてから72時間後に、ミスマッチ検出アッセイを行いました。

NTC = Edit-R Non-targeting crRNA control #1

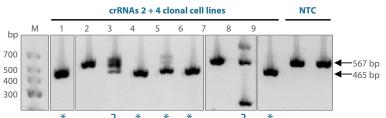


図4. hsa-miR-221を欠失させるために設計したcrRNAペアをU2OS-Cas9細胞にトランスフェクション後に単一細胞化したクローンの分析

Cas9切断領域を挟むようにPCRプライマーペアを設計し、個々のhas-miR-221クローン細胞株から得られたPCR産物を2%アガロースゲルを用いた電気泳動で分離しました。ホモ接合型の欠失は青い星印でマークされています。さまざまな長さのヘテロ接合型欠失は、青い疑問符でマークされています。

NTC = Edit-R Non-targeting crRNA control #1

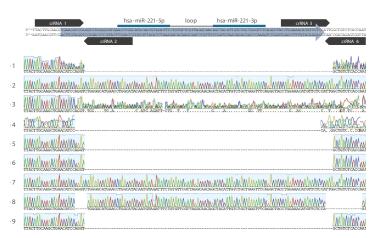


図5. hsa-miR-221を欠失させるために設計したcrRNAペアをU2OS-Cas9細胞にトランスフェクション後に単一細胞化したクローンのサンガーシークエンシング解析

9種類のクローンについてサンガーシークエンシング解析を行いました。(-) はホモ接合性欠失を表し、(.) はそれぞれのヌクレオチド位置での異なるヌクレオチドの出現を表します。

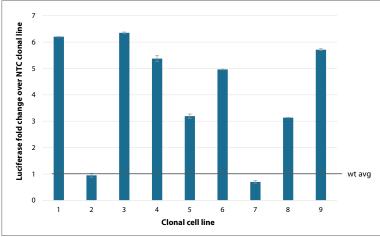


図6. hsa-miR-221の機能的なノックアウトを検出するためのルシフェラーゼレポータープラスミドの使用

hsa-miR-221を欠失させるために設計したcrRNAペアをU2OS-Cas9細胞にトランスフェクション後に単一細胞化したクローン細胞に、hsa-miR-221ルシフェラーゼレポータープラスミドをトランスフェクションし、72時間後にルシフェラーゼ活性を測定しました。未編集の野生型U2OS細胞にもプラスミドをトランスフェクトし、グラフ上のwt avg実線で示しました。

まとめ

microRNA遺伝子は、ガイドRNAの設計スペースが限られていたり、 (microRNA両鎖が完全には相補的ではないため)ステムループ内に導 入した小さい塩基挿入・欠失がmicroRNAの機能の完全な破壊に不十分 であったりするため、タンパク質をコードする遺伝子よりもCRISPR-Cas9シ ステムを用いてノックアウトすることが困難です。本アプリケーションノー トでは、microRNAノックアウトクローン細胞株をEdit-R CRISPR-Cas9試薬 を用いて効率よく作製できることを実証した事例を紹介しました。この事 例では、Cas9レンチウイルスを組み込んだ細胞株と化学合成したcrRNAペ アを用いました。サンガーシークエンシング解析によりクローン細胞株の 塩基配列を解析した結果、実験で使用したcrRNAペアから予想されるhsamiR-221遺伝子の様々な欠失が確認できました(いくつかの大きなホモ接 合性欠失を含む)。このワークフロー(図2)では、9つの無作為に選択したク ローン細胞株のうち7つについて、ゲノムDNAのhsa-miR-221遺伝子に欠 失があるか破壊されていました。このように、Dharmacon CRISPR Design Toolを使用することにより、U2OS細胞におけるmicroRNA (hsa-miR-221) の機能的ノックアウトに有効な化学合成crRNAを迅速に設計できることが 実証されました。化学合成crRNA:tracrRNAペアを用いたCRISPR-Cas9シス テムは、microRNAのようなノンコーディングゲノム標的の破壊に有用とい えるでしょう。

材料および方法

細胞培養: Edit-R Lentiviral Blast-Cas9 Nuclease particles (Horizon Discovery Dharmacon、カタログ番号VCAS10129) を用いてU2OS-CAG-Cas9 安定発現細胞を作製し、ATCC U2OS recommendations (ATCC、カタログ番号HTB-96)に従って標準増殖培地で維持しました。

crRNA: tracrRNAトランスフェクション: トランスフェクションの1日前に、U-2OS-CAG-Cas9安定発現細胞を1ウェルあたり10,000細胞で96ウェルプレートに播種しました。Edit-R化学合成crRNA (Horizon Discovery Dharmacon、カスタム合成)、Edit-R crRNA Non-targeting Control #1 (Horizon Discovery、カタログ番号U-007501-01-05) およびtracrRNA (Horizon Discovery、カタログ番号U-002000-20) を10 mM Tris-HCl pH7.5中で個別に再懸濁し、100 μ Mの濃度にしました。crRNAとtracrRNAを等モル比で混合し、10 mM Tris-HCl pH 7.5を用いて2.5 μ Mに希釈しました。最終濃度50 nMのcrRNA:tracrRNA複合体をトランスフェクションに使用しました。ウェル当たり0.4 μ LのDharmaFECT Duoトランスフェクション試薬 (Horizon Discovery Dharmacon、カタログ番号T-2010-03) を用いて細胞にトランスフェクトしました。hsa-miR-221遺伝子に対して設計したcrRNAのターゲット配列:

crrna 1: Tacttgcaagctgaacatcc
crrna 2: Ccaggttcatgccccagacc
crrna 3: Cctggaaacatgttctcat

crRNA 4: AGCATTGGTGAGACAGCCAA

クローン細胞株の単離:細胞の単離は希釈によって行いました。細胞を増殖させ、96ウェルプレート中のウェル当たり1細胞となるように希釈し、単一細胞増殖についてモニターしました。

ゲノムDNAの単離、DNAミスマッチ検出アッセイおよびサンガーシークエンシング解析:トランスフェクションの72時間後に細胞を、Phusion™HF buffer (Thermo Scientific、カタログ番号F-518L)・プロテイナーゼ K (Thermo Scientific、カタログ番号EO0491)・RNase A (Thermo Scientific、カタログ番号EN0531)中で56℃にて1時間直接溶解することによってゲノムDNAを単離しました。続いて96℃で5分間熱不活性化しました。Cas9切断部位を挟むように設計したPCRプライマー (Forward 5′-GCCCACG-TACCTACCAGTTT-3′、Reverse 5′-TCAGCTTTCTTGCGGTCCTT-3′)を用いてPCRを行いました。PCR産物 (500 ng)をT7エンドヌクレアーゼI (T7EI; NEB、カタログ番号M0302L)を用いて37℃で25分間処理し、2%アガロースゲルを用いて電気泳動でサンプルを分離しました。各サンプルにおける編集率は、ImageJソフトウェア (National Institutes of Health、メリーランド州ベセスダ)を用いて計算しました。精製したPCR産物の塩基配列はEurofinsにおいて決定しました。

ルシフェラーゼプラスミドのトランスフェクションおよび検出: ホタルルシフェラーゼ (Fluc) およびウミシイタケルシフェラーゼ (hRluc) 遺伝子を有するデュアルルシフェラーゼベクターpsiCHECK™-2 (Promega、カタログ番号C8021) において、hRluc遺伝子の3'非翻訳領域に位置するマルチクローニンヴサイトのXhol-Notl制限酵素認識部位間に、miR-221 microRNAの完全相補的な標的部位をクローニングしました。1ウェル当たり100 ngのレポータープラスミドを、1ウェル当たり0.2 μLのDharmaFECT Duoトランスフェクション試薬を用いて細胞にトランスフェクションしました。ホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼの発現は、Dual-Glo™ルシフェラーゼアッセイシステム (Promega、カタログ番号E2980) を用いてトランスフェクションの72時間後に測定し、ホタルルシフェラーゼの発現に対して標準化しました。標準化されたウミシイタケルシフェラーゼ発現をネガティブコントロー細胞におけるそれと比較しました (倍率変化)。

引用文献

- 1. Z. Liu, Y. Hui, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated versatile, predictable, and donor-free gene knockout in human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. **7**, 496-507 (2016).
- 2. S. Jonas and E. Izaurralde. Towards a molecular understanding of microR-NA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet.* **7**, 421-33 (2015).
- J. Krol, K. Sobczak, et al. Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/ short hairpin RNA design. J Biol Chem. 40, 42230-9 (2004).
- 4. W. Jing, X. Zhang, *et al.* CRISPR/CAS9-mediated genome editing of miR-NA-155 inhibits proinflammatory cytokine production by RAW264.7 cells. Biomed Res Int. Article ID 326042 (2015).
- 5. H. Yang, H. Wang, *et al.* One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas mediated genome engineering. *Cell.* **6**, 1370-9 (2013).
- D. Paquet, D. Kwart, et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. Nature. 533, 125-129 (2016)

For more information

