

トランスフェクション最適化、および CRISPR-Cas9実験条件の継続的モニタリングのための Edit-R™ Lethal crRNAコントロール

Edit-R Lethal crRNA Control #1および#2は、CRISPR-Cas9システムを用いたゲノム編集実験（アレイ化crRNAライブラリースクリーニングを含む）において、crRNAの導入条件の最適化とトランスフェクション効率のモニタリングのために開発されました。これらのcrRNAコントロールは、ゲノム内の何千もの箇所を一度に標的とすることによって細胞を死滅させるように設計されており、アポトーシスを引き起こすことが分かっている二本鎖切断を引き起こします（論文1、2）。観察された細胞死はCas9およびガイドRNA依存性であるため、これらのcrRNAコントロールを用いてCas9の機能性とcrRNA導入効率の両方をモニターすることができます。細胞死の表現型は、目視検査や、標準的な生存率インジケータ（トリパンブルーまたはヨウ化プロピジウム）を用いた染色、レサズリンアッセイによって容易に評価することができます。この細胞死表現型は、crRNAコントロール導入から48時間以内の発現が可能であり、次のアッセイを実施する前に、crRNA導入の成功の是非を評価することができます。

Edit-R Lethal crRNA control #1は非常に強力な細胞死を誘導し、Edit-R Lethal crRNA control #2は中等度の細胞死を誘導します（Figure 1）。これらの2つのcrRNAコントロールは、幅広いダイナミックレンジに対応しており、様々なヒト・マウス細胞においてcrRNA導入条件の最適化が可能です。

crRNA導入のための最適化条件（例えば、トランスフェクション試薬の最適化）は、Edit-R Lethal crRNA controlを用いて細胞集団の目視検査（Figure 1）によって容易に決定することができます。ゲノム編集後の変異導入確認用アッセイ（ミスマッチ検出アッセイなど）とは異なり、これらのcrRNAコントロールは追加のサンプル調製および分析を必要としません。

Edit-R Lethal crRNA controlの導入が細胞生存率に与える効果を定量化し、他のポジティブコントロール（PSMD7 crRNA）およびネガティブコントロール（Edit-R crRNA non-targeting control）が細胞生存率に与える効果と比較しました。レサズリンアッセイによって決定された細胞生存率のデータから、Edit-R Lethal crRNA control #1は非常に強力な細胞死を誘導し、Edit-R Lethal crRNA control #2は中等度の細胞死を誘導することが確認できました（Figure 2A）。このグラフは、1ウェル当たり0.13 μg のDharmaFECT 4トランスフェクション試薬の使用が、最も強力な細胞死の表現型を与えることを示しています。この時に、Edit-R crRNA non-targeting control (NTC) では、細胞生存率にいかなる影響も見られませんでした。

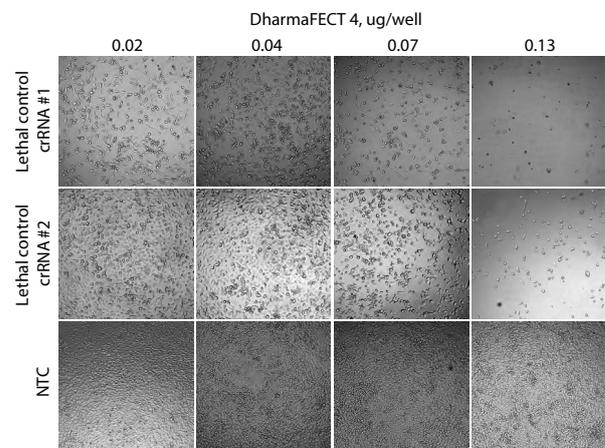


Figure 1. 位相差画像：Edit-R Lethal crRNA controlで処理したCas9発現細胞における細胞生存率の明らかな低下を示す。

ヒト変異ユビキチン（Gly76Val）をN末端に融合したEGFPおよびCas9を発現するU2OS細胞（U2OS Ubi [G76V]-EGFP-Cas9細胞）（論文3）を96ウェルプレートに1ウェル当たり10,000細胞で播種しました。24時間後、1ウェル当たり0.02~0.13 μg のDharmaFECT 4トランスフェクション試薬を用いて25 nMのcrRNA: tracrRNA複合体を細胞にトランスフェクトしました。細胞生存性について視覚的に評価しました。

NTC = Edit-R crRNA Non-targeting control

Edit-R Lethal crRNA controlによって同定された最適化条件が、特定の細胞アッセイにおける表現型と相関するかどうかを決定するために、一例としてプロテアソーム依存性の表現型も試験しました（Figure 2B）。ヒト変異ユビキチン（Gly76Val）をN末端に融合したEGFPおよびCas9を発現する遺伝子組換えU2OS細胞（U2OS Ubi [G76V]-EGFP-Cas9細胞）においては、通常は、ヒト変異ユビキチン-EGFP融合タンパク質がプロテアソームによって分解されます。プロテアソーム経路が、PSMD7のような重要なプロテアソーム関連遺伝子の機能的ノックアウトによって破壊されると、ヒト変異ユビキチン-EGFP融合タンパク質が蓄積し、EGFP蛍光が高くなります。PSMD7 crRNAによるプロテアソーム依存性の表現型と、Edit-R Lethal crRNA controlによる細胞生存率の比較は、以下に述べるように、crRNAの導入条件の最適化のためにEdit-R Lethal crRNA controlを使用することが有効であることを明らかにしました。DharmaFECT 4トランスフェクション試薬を1ウェル当たり0.02 μg および0.04 μg 用いてPSMD7 crRNA（細胞プロテアソームの機能を破壊する）を細胞に導入した場合、プロテアソーム破壊の弱い表現型（EGFPが低発現）が見られましたが、これは、同一のトランスフェクション条件でEdit-R Lethal crRNA controlを細胞に導入

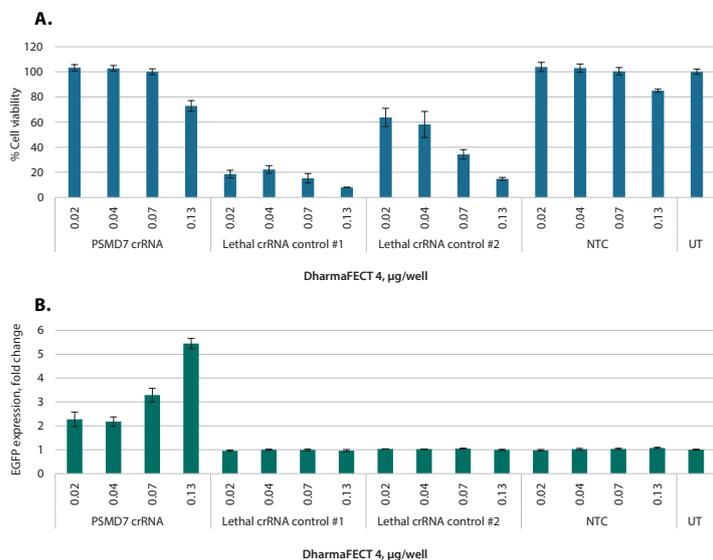


Figure 2. Edit-R Lethal crRNA controlによる細胞死、および、プロテアソーム関連遺伝子 (PSMD7) をターゲットとするcrRNAによるプロテオソーム依存性の表現型は、最適なトランスフェクション条件と相関する。

A. U2OS Ubi [G76V]-EGFP-Cas9細胞に、様々なトランスフェクション条件下でcrRNAを導入した時の細胞生存性について、レザズリンアッセイを用いて分析しました。Edit-R Lethal crRNA controlは、DharmaFECT量の増加と共に細胞死を引き起こしました。

B. 蛍光測定法を用いて細胞のEGFP発現 (プロテアソーム系が破壊されると上昇する) を分析しました。EGFPを高発現するトランスフェクション条件は、細胞生存率を用いて検討したトランスフェクション最適化条件と一致しました (すなわち、1ウエル当たり0.13 μg のDharmaFECT 4トランスフェクション試薬の使用)。U2OS Ubi [G76V]-EGFP-Cas9細胞を96ウエルプレートに1ウエル当たり10,000細胞で播種しました。プレートの24時間後、1ウエル当たり0.02~0.13 μg のDharmaFECT 4トランスフェクション試薬を用いて25 nMのcrRNA: tracrRNA複合体を細胞にトランスフェクトしました。全ての結果は、トランスフェクションの72時間後にUTに対して正規化しました。

UT = 未処理細胞、NTC = Edit-R crRNA Non-targeting control

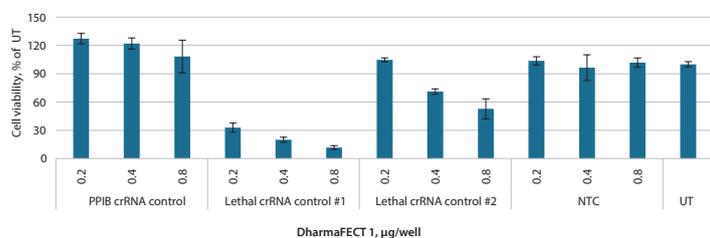


Figure 3. Edit-R Lethal crRNA control: tracrRNA複合体のHUVEC細胞への導入条件の最適化

HUVEC細胞を96ウエルプレートに1ウエル当たり5,000細胞で播種しました。プレートの24時間後に、DharmaFECT1トランスフェクション試薬を1ウエル当たり0.2、0.4および0.8 μg 用いて、50 nMのEdit-R Lethal crRNA control: tracrRNA複合体および25 nMのEdit-R Cas9 Nuclease protein NLSを細胞にトランスフェクションしました。トランスフェクションの72時間後にレザズリンアッセイを用いて細胞生存性について分析しました。

UT = 未処理細胞、NTC = Edit-R crRNA Non-targeting control

した際に観察された弱い細胞死効果に対応しています。DharmaFECT 4トランスフェクション試薬を1ウエル当たり0.07 μg 用いてPSMD7 crRNAを細胞に導入した場合、プロテアソーム破壊の表現型がよりはっきりと見られました (EGFPが中程度に発現)。最も強い表現型は、DharmaFECT4トランスフェクション試薬を1ウエル当たり0.13 μg 用いてPSMD7 crRNAを細胞に導入した場合には見られました。これは、同一のトランスフェクション条件でEdit-R Lethal crRNA controlを細胞に導入した際に観察された最も強い細胞死効果に対応しています。PSMD7 crRNA およびEdit-R crRNA non-targeting controlは、この量のDharmaFECT4トランスフェクション試薬では顕著な細胞生存率の低下を示さなかったことから、細胞死はEdit-R Lethal crRNA controlの特異的な作用に起因することを示しています。

Edit-R Lethal crRNA controlは、Cas9 mRNAおよび proteinと共にガイドRNAを導入する際にもコントロールとして使用可能です。例えば、Edit-R Cas9 Nuclease mRNAあるいはEdit-R Cas9 Nuclease protein NLSを、Edit-R synthetic sgRNA あるいは crRNA:tracrRNAと共に細胞に導入することにより、完全にDNA-freeのゲノム編集実験が可能です。

crRNA: tracrRNA複合体をEdit-R Cas9 Nuclease protein NLSと共にHUVEC細胞に導入する際にDharmaFECT1トランスフェクション試薬を1ウエル当たり0.8 μg 用いた場合、Edit-R Lethal crRNA Control #1あるいは#2を導入した実験区において最も強い細胞死の表現型が生じました (Figure 3)。重要なこととして、PPIB crRNA およびEdit-R crRNA non-targeting controlは、この量のDharmaFECT1トランスフェクション試薬では顕著な細胞生存率の低下を示しませんでした。

結論

Edit-R Lethal crRNA controlは、ゲノム全体の何千もの複数の場所でCRISPR-Cas9システムを介した二本鎖切断を引き起こすことで細胞死をもたらすユニバーサルなポジティブコントロールです。これらのcrRNAコントロールは、ミスマッチ検出アッセイまたは塩基配列決定のような労力と時間を要するアッセイを必要とせずに、細胞死の表現型を迅速かつ容易に評価することができます。

Edit-R Lethal crRNA controlで観察された細胞死の表現型は、Cas9およびガイドRNAの細胞への導入の程度と相関します。これらの簡単に使用可能なcrRNAコントロールは、遺伝子を標的とするcrRNAと同様に使用でき、様々なCas9タイプと互換性があり、多くのCRISPR-Cas9遺伝子ノックアウトアプリケーションにおけるコントロールとして有効です。

References

- Pandey, M. and Raghavan, S.C.: DNA double-strand break repair in mammals; *J Radiat Cancer Res* **2017**;8:93-7 DOI: 10.4103/jrcr.jrcr_18_17
- Morgens, D.W; Wainberg, M. *et al*; Genome-scale measurement of off-target activity using Cas9 toxicity in high-throughput screens; *Nature Communications* **2017**; 8: 15178 DOI: 10.1038/ncomms15178 (2017)
- Anderson, E.M; Haupt, A. *et al*; Systematic analysis of CRISPR-Cas9 mismatch tolerance reveals low levels of off-target activity; *Journal of Biotechnology* **2015**; 211:56-65 DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.06.427

For more information

ホライゾン・ディスカバリー株式会社
horizondiscovery.com/contact-us

©2022 Horizon Discovery Group Ltd and its affiliated companies. All rights reserved.

PerkinElmer is a trademark of PerkinElmer, Inc., registered in the United States and other countries. Horizon Discovery is a trademark mark of Horizon Discovery Ltd. Dharmacon is a trademark of Dharmacon, Inc.. All PerkinElmer, Inc., Horizon Discovery Ltd and Dharmacon, Inc. trademarks are used with permission. Other product names and brand names may be trademarks or registered trademarks of their respective owners.

B013-1904-v3

horizon
 a PerkinElmer company