

Application Note

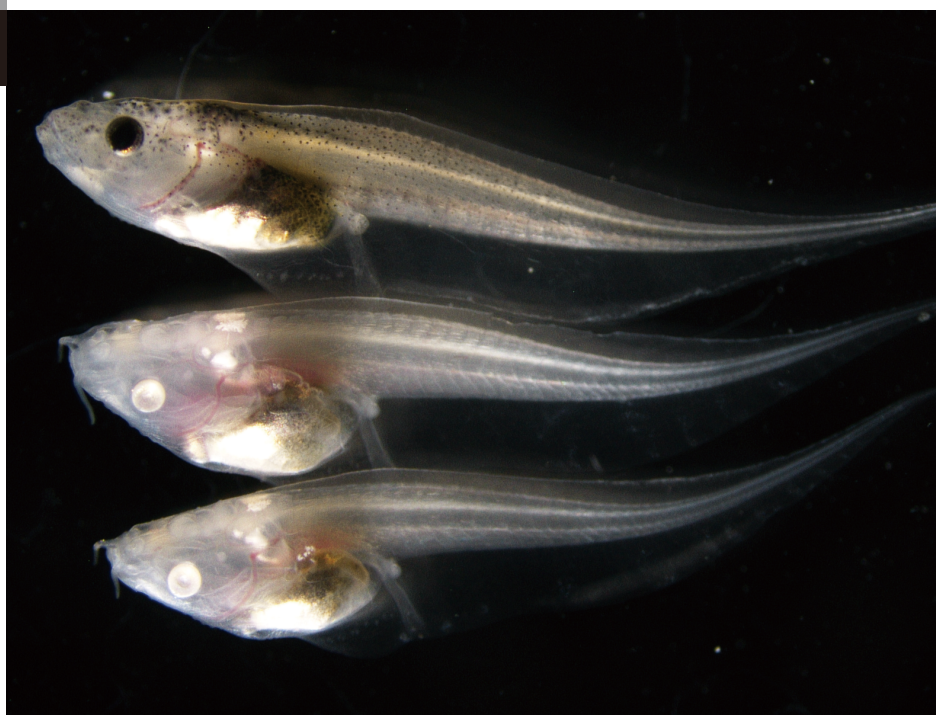
No.37

ライフサイエンス

ゲノム編集における RGEN-RFLP 法を用いた簡便で正確なジェノタイピング法 – MultiNA の活用 –

A Convenient and Accurate Genotyping for Mutations Using RGEN-RFLP in Genome Editing – Application of MultiNA –

重田美津紀^{*1}, 鈴木賢一^{*1}, 山本 卓^{*1}



Lifescience

1. はじめに

人工 DNA 切断酵素を基盤としたゲノム編集技術の発展は、現代生命科学においてパラダイムシフトをもたらした技術革新の一つであり、その進歩の大きな原動力となりつつあります。人工 DNA 切断酵素の中でも、その簡便さから世界中の研究者が利用しているのが CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) -Cas9 システムです¹⁾。このシステムは RNA 誘導型ヌクレアーゼ (RNA Guided Endonuclease; RGEN) である Cas9 と標的配列特異的な guide RNA (gRNA) によって構成されます。gRNA は CRISPR RNA (crRNA) と trans-activating crRNA (tracrRNA) を組み合わせた RNA であり、crRNA の 20 塩基 (プロトSpacer 配列) がゲノム上の標的配列の特異性を決定します。その際、このゲノム上の標的配列のすぐ 3' 側下流に Protospacer Adjacent Motif (PAM) と呼ばれる、NGG (N は任意の塩基; Streptococcus pyogenes Cas9 の場合) 配列が必要です。

gRNA と Cas9 タンパク質の複合体は PAM の 3 塩基上流で DNA 二本鎖切断 (DSB) を引き起こしますが、その際に生じる不正確な DNA 修復機構 (error-prone 修復) により、標的部位に挿入や欠失 (insertions/deletions; indels) が生じます^{2),3)}。その結果、標的部位に変異が導入され、コーディング領域にフレームシフト変異が生じた場合、その遺伝子は破壊 (ノックアウト) されます。

CRISPR-Cas9 システムの効率化は日々改良が進められていますが、培養細胞や受精卵への変異導入の際、トランスフェクションした培養皿全体の細胞や個体を構成するすべての体細胞に変異が導入されるわけではありません。したがって、gRNA 標的配列の選択、導入条件の最適化、実験成果の評価には簡便な変異の検出と正確な導入率の算出 (ジェノタイピング) が必要不可欠です。

*1 広島大学大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻 分子遺伝学研究室

2. 従来のジェノタイピング法

ゲノム編集技術を用いた実験において、標的部位（オンターゲット）への変異導入の有無はヘテロ二本鎖移動度分析（Heteroduplex Mobility Assay; HMA）で評価するのが最も簡便です⁴⁾。しかしながら、この方法では変異導入率を正確に算出することが困難です。変異導入率を算出するためには、これまでミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼを用いたアッセイが重宝されてきました。このアッセイは、野生型アレルと変異型アレルの PCR 産物由来のヘテロ二本鎖（デュプレックス）を選択的に切断することにより変異を検出し、変異導入率を算出する方法です。しかしながら、PCR 反応中及び反応後のヘテロデュプレックス形成効率が 100 % ではないうえ、ミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼが 100 % の効率でヘテロデュプレックスを切断するわけでもありません。そのため、このアッセイにより算出された値は、実際の変異導入率より低く見積もられます⁵⁾。制限酵素を用いた Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 解析は、野生型アレル由来の PCR 産物が制限酵素により 100 % 切断される一方、変異型アレル由来の PCR 産物は変異導入により切断され

なくなることを利用した方法です。この方法はヘテロデュプレックスを形成させる必要がないため簡便で精度の高い方法ですが、人工 DNA 切断酵素の標的配列に制限酵素サイトが存在しなければ使用できません。実際に何らかの制限酵素サイトが人工 DNA 切断酵素の標的部位に存在するケースは少ないため、汎用性の低さが最大の問題です。また PCR 産物をサブクローニングして、クローンをサンガー DNA シーケンスによって解析する方法は手間とバイアスがかかります。最も正確に変異導入率を算出できるのは次世代シーケンサーによるアンプリコン解析やデジタル PCR 解析ですが、多大なコストや手間がかかるため、普通の研究室でルーティンに使用するのは困難です。以上のように、現行のジェノタイピング法にはそれぞれ利点と欠点があるので、今後ますます盛んになる CRISPR-Cas9 システムを利用した研究に対応した、簡便かつ精度の高いジェノタイピング法の開発が必要です。そこで有用であると考えられるのが、Jin-Soo Kim らが 2014 年に報告した、リコンビナント Cas9 タンパク質をカスタマイズ制限酵素として利用する RGEN-RFLP 法です⁵⁾。

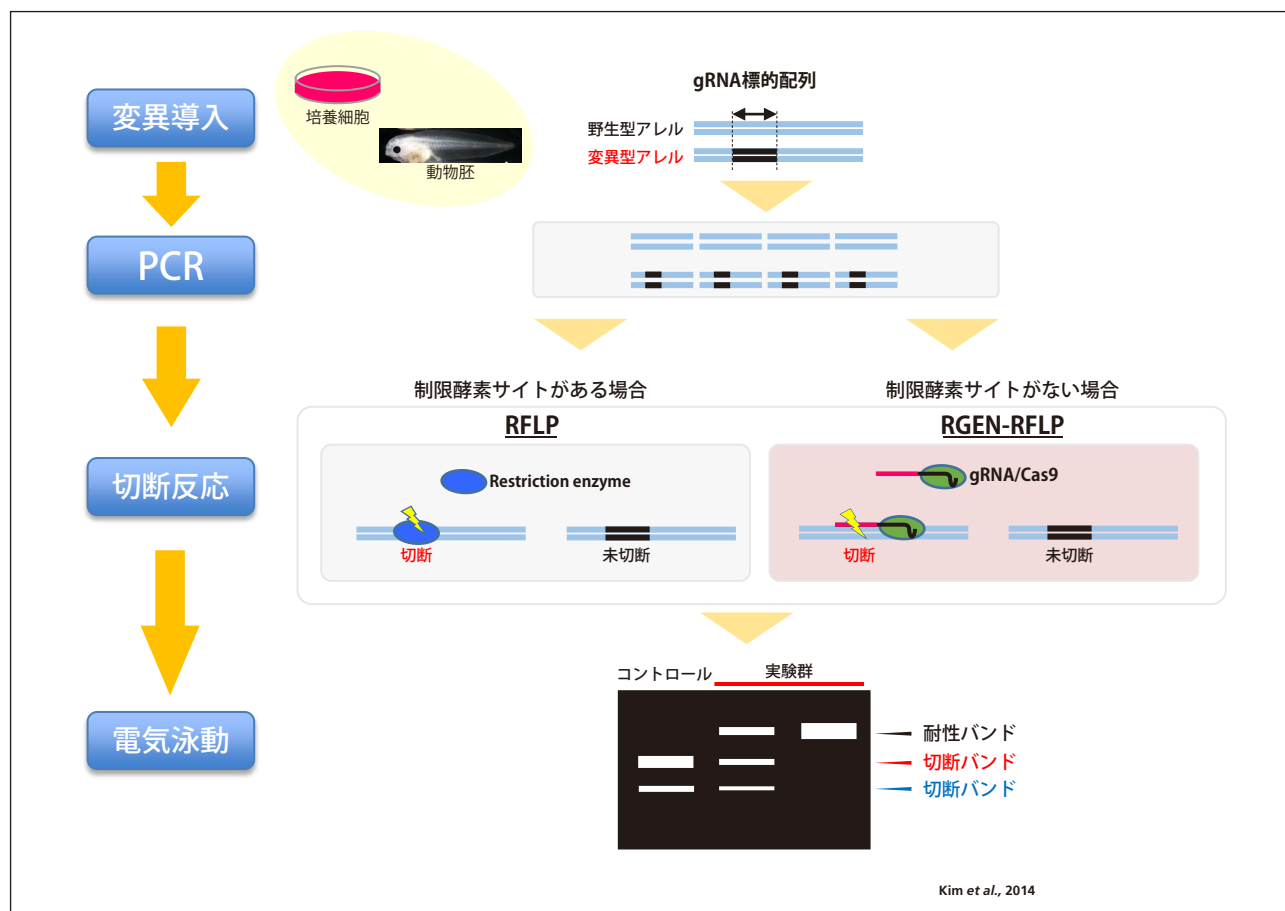


図 1 RFLP 法によるオンターゲット解析の原理

3. RGEN-RFLP 法の原理

RGEN-RFLP 法は、理論上 gRNA と Cas9 を用いて導入したすべての変異に対してオンターゲット解析が可能です。なぜならば、変異導入に使用した gRNA をそのままオンターゲット解析に流用可能だからです。簡単な原理（図 1）と実験ワークフローを説明します（図 2）。変異を導入した培養細胞や動物胚のゲノムに対して gRNA 標的部位領域を PCR により増幅します。その PCR 産物を変異導入で用いた gRNA 及びリコンビナント Cas9 タンパク質と共に in vitro でインキュベートすると、野生型アレルの PCR 産物は gRNA/Cas9 により切断されます（図 1、矢印赤と青）。一方、変異型アレルでは gRNA の認識配列が error-prone 修復により変化しているため、その PCR 産物は切断されません（図 1、矢印黒; Cas9 耐性バンド）。

これらの切断／耐性バンドのモル比から変異率を算出します。最近では、リコンビナント Cas9 タンパク質と in vitro 合成した gRNA を用いたクローニングフリーの変異導入が広く用いられているため、⁶⁾ シームレスにこのアッセイを適用できます。多くの動物胚（受精卵）への導入でも、in vitro 合成した gRNA をインジェクションするため、用いた gRNA をそのまま RGEN-RFLP に使用できます。gRNA と Cas9 を発現ベクターにより導入した場合には、gRNA を別途調整する必要がありますが、PCR により鋳型 DNA を作り、それを基に in vitro 合成すれば半日で gRNA を合成できます。また、最近では gRNA の化学合成も盛んに用いられており、RGEN-RFLP 法はまさに CRISPR-Cas9 時代に適したジェノタイピング法だと言えます。

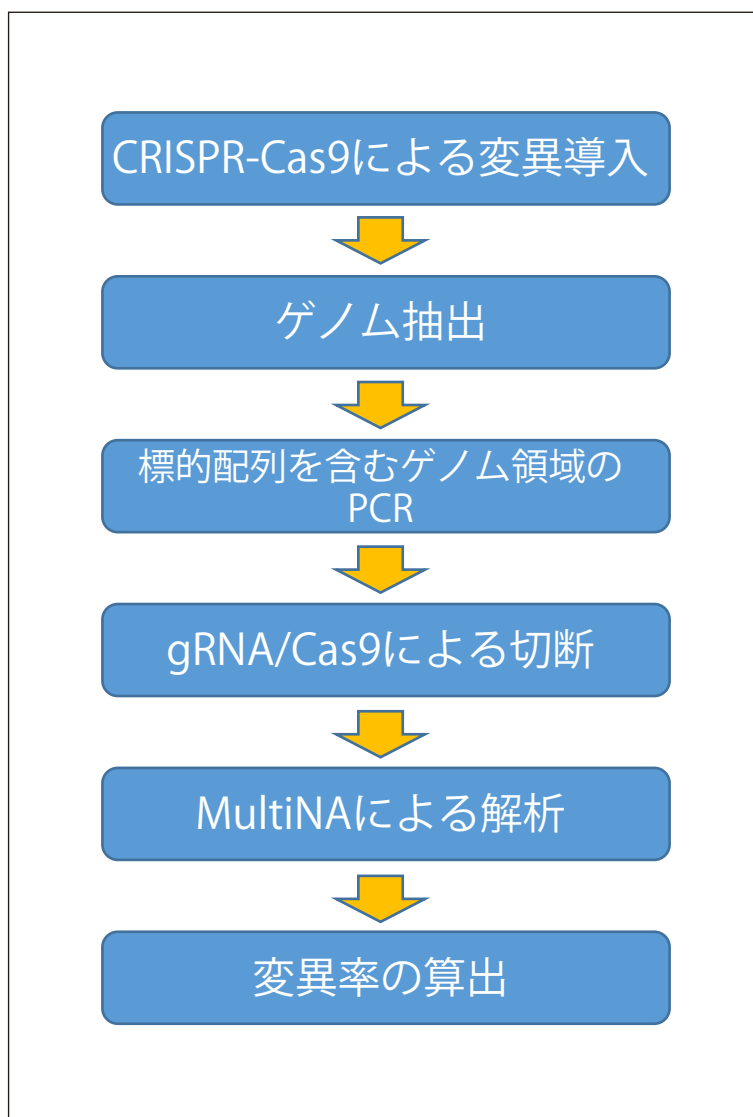


図 2 RGEN-RFLP を用いた変異率算出のワークフロー

4. ネットアイツメガエルにおける RGEN-RFLP 解析の実例

具体的な実験の流れについて説明します。変異を導入した細胞や個体からゲノム DNA を抽出し、標的配列を含むゲノム領域が 500 bp より短くなるようプライマーを設計して PCR により増幅します。もちろん、ゲノム PCR はエクストラバンドが出ない、目的の領域のみを増幅するプライマーセットが必要です。PCR 産物を精製し、変異導入に使用した gRNA とリコンビナント Cas9 タンパク質を加えて 30 ~ 37 °C でインキュベートします。その反応液を RNase 処理することにより gRNA を分解したのち、電気泳動により解析します。この際マイクロチップ電気泳動

装置 MultiNA と DNA-500 reagent kit (Shimadzu) を使用すると、図 3 のようにきれいなゲルイメージを得ることができます。黒の矢印が野生型アレル由来の PCR 産物（の位置）を示しています。この野生型アレル由来の PCR 産物は gRNA 標的配列の PAM から 3 bp 上流で切断され、赤と青の矢印が示す二つの DNA 断片が生成されます。コントロールゲノム (a, Cas9 (+)) の PCR 産物は完全に消化されますが、実験群 (b, Cas9 (+)) のレーンでは消化されないバンドが確認されます（黒矢印の位置）。これが変異型アレル由来の PCR 産物で、大部分は切断サイトから +/-10 bp に欠失を伴います。細胞内で起こった error-prone 修復により gRNA のプロトスペーサー配列や PAM に変異が導入されたため、in vitro で gRNA/Cas9 が切断できない状態になっています。この実験を行ううえで重要なポイントは、通常の RFLP 解析と同様、野生型アレルの PCR 産物が 100 % 切断される条件を設定することです。そのため、活性が高いリコンビナント Cas9 タンパク質を使用することが重要です。現在、様々なメーカーからリコンビナント Cas9 タンパク質が入手可能ですので、実験を行う際は各研究室で最初に検討が必要です。また、変異導入に用いた gRNA が in vitro では活性が低い場合、コントロール PCR 産物が完全消化できないことがあります。その際は gRNA を数 bp ずらしたり、逆鎖で作製したりするとうまく切断できる場合があります。

この結果から得られたデータを基に変異導入率を算出するのですが、MultiNA ではエレクトロフェログラム（波形データ）から自動でモル濃度が算出されるため、目的のバンドごとに算出されたモル濃度から計算できます。切断バンドのうち分子量の大きい方のピークを分子量から同定し、モル濃度の値をエクセルなどのソフトにエクスポートします。それぞれのモル濃度から

$$\text{体細胞変異率(\%)} = \left[1 - \frac{\text{切断バンド}}{\text{耐性バンド} + \text{切断バンド}} \right] \times 100$$

という計算式で変異導入率の算出が可能です。Cas9 により誘導された DSB と error-prone 修復により標的配列に長い indel が生じる場合があるので、エクストラバンドも Cas9 耐性バンドに含めます。これはあらかじめリコンビナント Cas9 タンパク質で切断したサンプルと未処理のサンプルを同時に MultiNA で解析しておき、indel アレルを判断します。

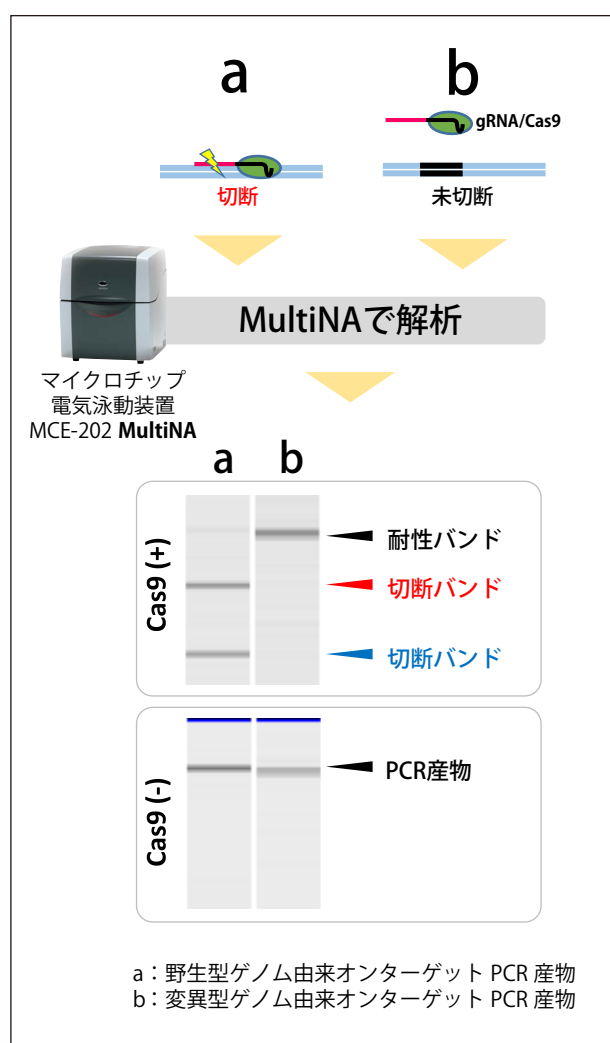


図3 RGEN-RFLP 解析の原理とゲルイメージ

実験例として、標的遺伝子へ変異を導入したネッタイツメガエル胚（当世代，F0）の RGEN-RFLP での解析をご紹介します⁷⁾。メラニン合成酵素である tyrosinase 遺伝子 (tyr) およびメラノソーム形成に関与する solute carrier family 45 member 2 (slc45a2) を標的とした gRNA を、一細胞期の受精卵へ Cas9 mRNA と共に顕微注射しました。胚はメラニン色素を欠失したアルビノの表現型を示しましたが、ほとんどの色素を欠失したほぼ完全なアルビノ胚が約 3 割程度得られました。tyr および slc45a2 の表現型個体由来のゲノム DNA を用いた RGEN-RFLP の結果を図 4 に示しています。コントロール個体のゲノムから増幅した PCR 産物は、標的部位が gRNA/Cas9 に認識され完全に切断されるためバンドが二本に分離されます（矢印赤 ▲ と青 ▼）。一方、表現型由来のゲノム PCR 産物はモザイク状に変異が導入されているた

め、野生型アレル由来のものは切断されますが、変異型アレル由来の PCR 産物は Cas9 耐性バンドとして確認されます（矢印黒 ▼）。実際にモル濃度から算出した変異率をゲルイメージの下に表示しています。このように MultiNA を使用することで、簡便に変異体の体細胞変異率（変異導入率）を算出することができます。今回紹介した slc45a2 では、in vivo で非常に高い変異導入率を示したにも関わらず in vitro の切断活性は低かったため、3 bp ずらした配列を標的とした gRNA を用いて RGEN-RFLP を行っています。驚くべきことに、シビアな表現型個体ではほぼ 100 % に近い変異導入率が確認されました。このことは、ネッタイツメガエル F0 胚のほとんどの体細胞において、両アレルの標的遺伝子をノックアウトすることが可能であることを示しています。

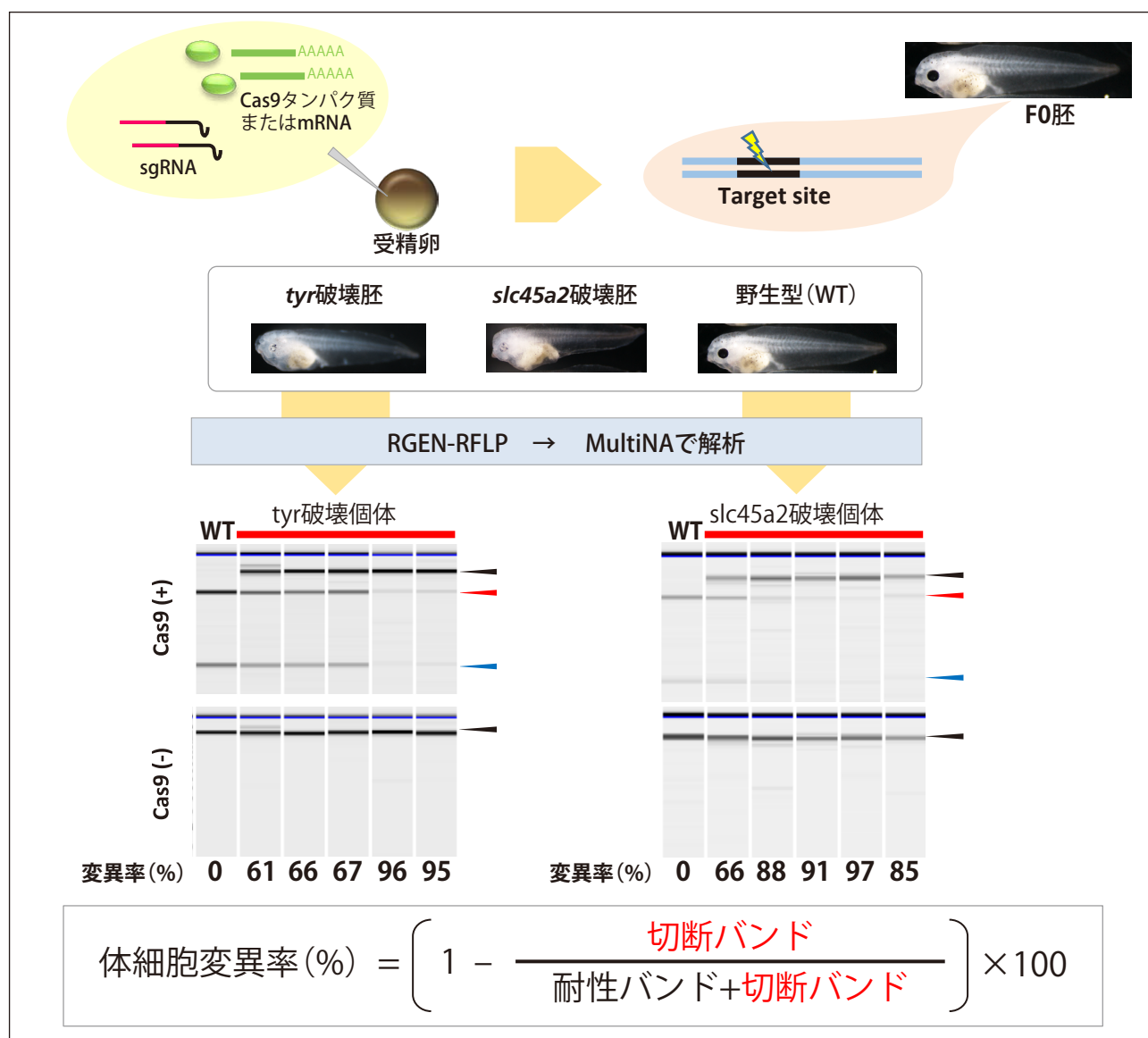


図 4 ネッタイツメガエルにおける RGEN-RFLP 解析を用いた体細胞変異率算出の実例

5. RGEN-RFLP 法とアンプリコンシーケンス解析との高い相関性

ネッタイツメガエル *tyr* 及び *slc45a2* 遺伝子を破壊した様々な表現型個体について、RGEN-RFLP と標的部位のアンプリコンシーケンス解析により得られた変異導入率を比較しました。*slc45a2* に関しては、標的部位に *BfaI* サイトが存在したため、比較のために RFLP 解析も行っています。二つの

ジェノタイピング法から算出した変異導入率は高い相関を示しました（図 5）⁷⁾。このことは RGEN-RFLP 法が、従来の RFLP 法の簡便さとアンプリコンシーケンス解析に匹敵する正確性を兼ね揃えた優れたジェノタイピング法であることを示しています。

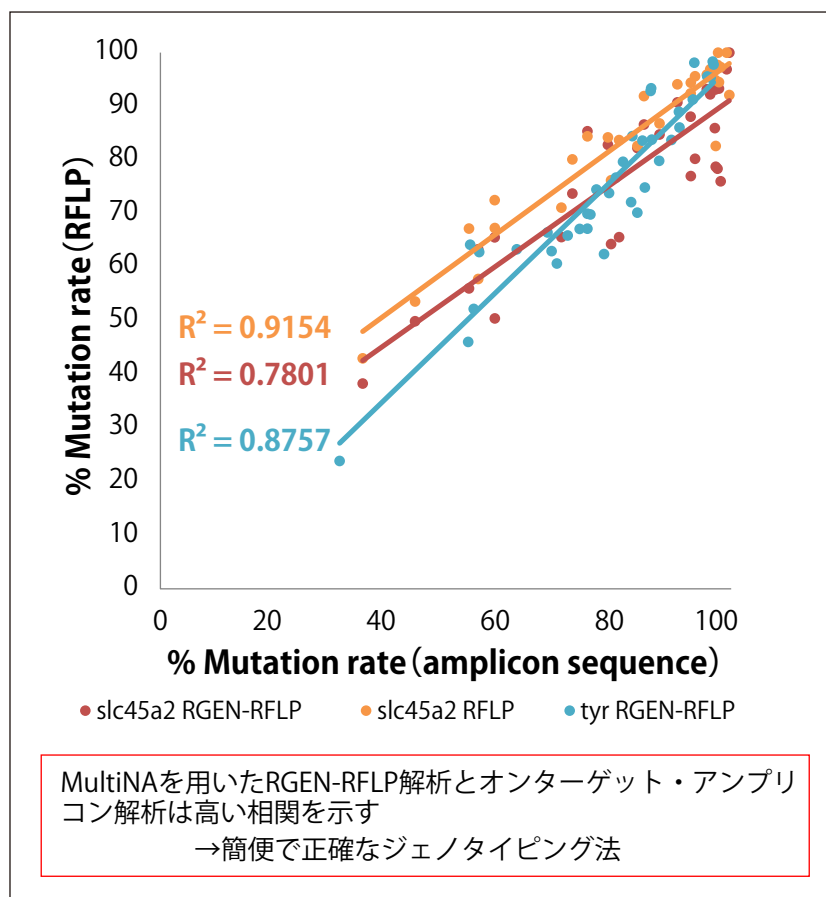


図 5 RGEN-RFLP 法とアンプリコンシーケンス解析との相関性

6. おわりに

標的配列に制限のない RGEN-RFLP 法を用いたジェノタイピングは汎用性が高く、簡便かつ正確に変異率を算出できます。また、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA との組み合わせにより、導入した培養細胞、生物個体及び gRNA のハイスループットな評価を可能とします。この方法は単純な遺伝子ノックアウトだけでなく、ssODN を用いた一塩

基置換のジェノタイピングにも応用可能です。リコンビナント Cas9 タンパク質が安価に購入できるようになった今、RGEN-RFLP 法と MultiNA を組み合わせたこのジェノタイピング法は、CRISPR-Cas9 システムを用いた実験系においてその威力を発揮することが期待されます。

引用文献

- 1) Doudna, J.A. & Charpentier, E. (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096.
- 2) Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S.L., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X.B., Jiang, W.Y., Marraffini, L.A. & Zhang, F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823.
- 3) Mali, P., Yang, L.H., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E. & Church, G.M. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823-826.
- 4) 木下政人, メダカへの変異導入と変異系統作製 - MultiNA の活用 - 島津 Application Note No.36
- 5) Kim, J.M., Kim, D., Kim, S. & Kim, J.S. (2014) Genotyping with CRISPR-Cas-derived RNA-guided endonucleases. *Nat. Commun.* 5, 3157.
- 6) Kim, S., Kim, D., Cho, S.W., Kim, J. & Kim, J.S. (2014) Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research* 24, 1012-1019.
- 7) Shigeta, M., Sakane, Y., Iida, M., Suzuki, M., Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Fujii, S., Yamamoto, T. & Suzuki, K.T. (2016) Rapid and efficient analysis of gene function using CRISPR-Cas9 in *Xenopus tropicalis* founders. DOI: 10.1111/gtc.12379.

表紙写真

(上) 野生型ネットアイツメガエル胚

(下) tyrosinase 遺伝子破壊アルビノ胚

マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA（マルチナ）”

アガロースゲル電気泳動法は試薬の調合、ゲルの作成、電気泳動、結果の画像取得、後片付けと一連の作業に多くの時間と手間を要します。さらにデータに関しては感度、分離、再現性、定量性など客観性に乏しいものです。

マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA” はアガロースゲル電気泳動の問題を解決します。



マイクロチップ電気泳動装置
MCE-202 “MultiNA”

高い分析性能

MultiNAによるマイクロチップ電気泳動分析では、アガロース電気泳動分析と比べて、より優れた分離能、感度、再現性、定量性を実現します。

最大108検体まで全自動分析

試料と試薬をセットするだけで、あとは最大108検体まで自動分析できます。分析前処理と分析泳動の並列処理により1分析あたりの時間はわずか80秒です※。

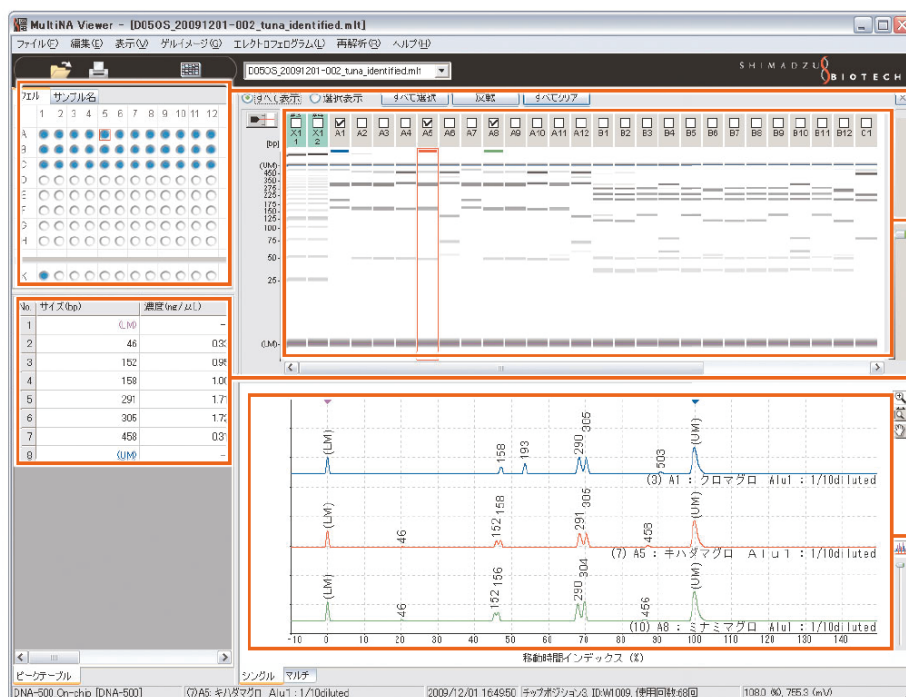
使いやすさを徹底追及

MultiNAによる分析操作は非常に簡便です。分析スケジュールを作成し、あとは試料と試薬をセットしてスタートボタンをクリックするだけです。

分析コストを低減

繰返し利用可能な高性能マイクロチップが安価なランニングコストを実現します。

※ DNA標準分析（DNA1000キット/プレミックス）でマイクロチップを4枚使用時。
ただし初期洗浄・あと洗浄の時間及び初回分析は含みません。



サンプルウェル表示

分析の進行状況を色で表示します。

ゲルイメージ

画像データ（JPG, BMP, TIF）として保存することができます。

ピークテーブル

サイズ推定値や濃度などCSVファイルとして出力することができます。

エレクトロフェログラム

画像データ（JPG, BMP, TIF）として保存することができます。

MultiNA Viewer の分析結果表示