

Technical Report

ゲノム編集分野における CELL PICKERとMCE-202 MultiNAの活用

Utilization of CELL PICKER and MCE-202 MultiNA in the field of genome editing

米山 鷹介¹、岡田 光加²、加地 徹²、熊谷 英郷²、江連 徹²、井上 隆志²

Abstract:

ゲノム編集技術はCRISPR/Cas9の登場により急速に普及しており、育種や医療分野等の広い分野で研究を推進させることが期待されています。この技術を用いた遺伝子改変法により、自然偶発的な組み換えを拠りどころとしていた従来法に比べ、飛躍的に改変効率を向上することができます。本テクニカルレポートでは、ゲノム編集を用いて遺伝子改変した細胞群から目的のクローンを樹立するフローの中で活用されるCELL PICKER™とMCE-202 MultiNA™の事例を紹介します。

Keywords: ゲノム編集、遺伝子改変、細胞、クローニング、自動化、電気泳動

1. はじめに

ゲノム編集は、ゲノム上の特定部位を切断できるように設計された人工制限酵素（人工ヌクレアーゼ）を用いて、ゲノム配列に任意の欠失、挿入、置換といった変異導入を行う遺伝子改変技術です。これまでZFN (zinc-finger nuclease)、TAL effector nuclease (Transcription activator-like effector nuclease)、そしてCRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein) といった人工制限酵素がゲノム編集ツールとして利用されており、特にCRISPR/Cas9は標的配列の設計が容易なことから急速に普及しています。この技術は、自然偶発的な組み換えを拠りどころとしていた従来法に比べ、飛躍的に改変効率を向上することができます。これらの特長から、育種や医療といった広い分野で研究を推進することが期待されています。

その一方で、意図する遺伝子改変をゲノム編集によって導入するためには、多くの煩雑な作業が介在しており、より効率的な方法が求められています。本テクニカルレポートでは、ゲノム編集を用いた細胞に対する遺伝子改変フローの中で、CELL PICKERやMCE-202 MultiNAの活用例について紹介します。

2. ゲノム編集を用いたクローン樹立フロー

ゲノム編集を用いた、目的細胞のクローン樹立にいたる概略フローをFig. 1に示します。フローでは、①ゲノム編集による遺伝子改変、②Aコロニー分離法によるクローン化、②B限界希釈法によるクローン化、③培養、④変異導入の確認、⑤遺伝子の確認、⑥クローンの樹立といったステップがあります。このステップの中で、②Aコロニー分離法によるクローン化でCELL PICKERを④変異導入の確認でMCE-202 MultiNAが活用できます。

CELL PICKERは、従来手作業で行われている、ピペッターを用いた細胞コロニーのピッキング・リムーブ作業を自動で行うことができます。

MCE-202 MultiNAは、微細流路が形成されたマイクロチップを用いた全自動電気泳動装置であり、DNA/RNAのサイズや量を迅速・簡便に確認できます。

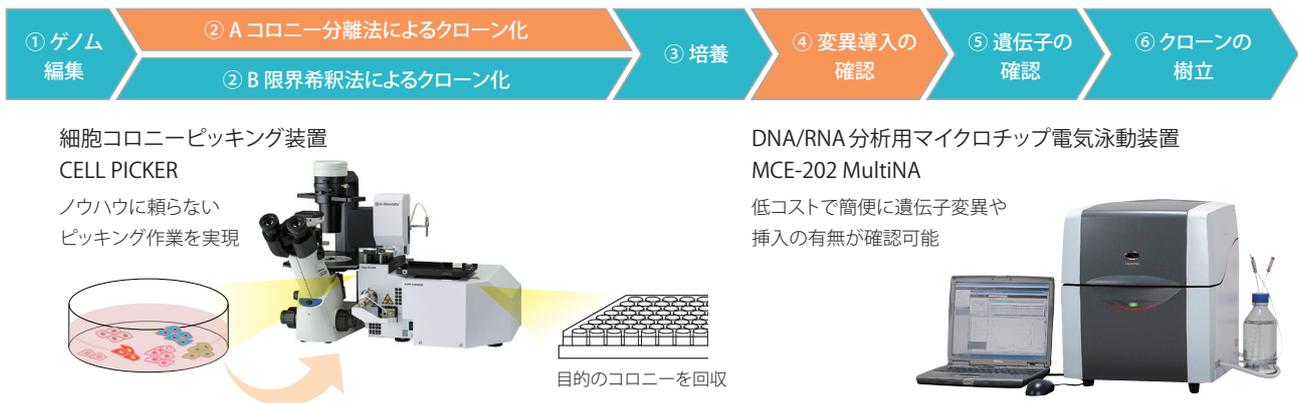


Fig. 1 ゲノム編集を用いた目的細胞のクローン樹立概略フロー

3. iPS細胞へのゲノム編集技術の活用

患者由来の体細胞ヘリプログラミング因子を導入することで樹立されるiPS細胞は、さまざまな臓器の構成細胞へと分化させることによって、病態の解析や治療薬の開発などの多岐にわたる分野で盛んに活用されています。これらの患者由来iPS細胞を用いた疾患モデルの作製においては、目的の細胞種への分化誘導や、患者が保有する遺伝子変異の影響の検証を目的として、しばしばゲノム編集技術が用いられています。前者の場合は、分化マーカーや機能性マーカーなどの標的遺伝子座に、蛍光タンパク質などのレポーター遺伝子を導入することで、目的細胞種へと分化したことを蛍光で判別可能なレポーター iPS細胞株の樹立が行われています。また、後者については、患者iPS細胞に対して疾患の原因変異を修復したり、健康者iPS細胞に疾患関連変異を導入したりすることで、着目している遺伝子変異と病態との因果関係を検証するための解析が可能となっています。

4. クローン獲得の課題

ヒトiPS細胞に対するゲノム編集においては、目的のゲノム編集がなされたクローンを単離することが必要です。すなわち、iPS細胞に対して、ゲノム編集に必要な核酸など（例えば、CRISPR-Cas9システムにおけるガイドRNAやCas9をコードするプラスミド、RNA、精製タンパク質、修復用テンプレートのDNAなど）を導入後、コロニー分離法、限界希釈法、あるいはセルソーターによってクローン化が行われます。

いずれのクローン化方法も煩雑でスキルが必要であることに加え、ヒトiPS細胞は単細胞化した後の扱いが難しく、限界希釈法やセルソーターでは著しい生存率の低下が避けられないことが多い点も、ヒトiPS細胞のゲノム編集作業を困難にしていた要因でした。

そこで次項では、ゲノム編集によるヒトiPS細胞へのレポーター遺伝子のノックインを題材として、目的クローンの単離にいたるフローでCELL PICKERを活用しコロニー分離法を効率化した例を紹介します。

5. CELL PICKERを用いた目的クローンの単離

遺伝子座Xに対するCRISPR-Cas9プラスミドと、蛍光レポーター遺伝子を搭載した修復用テンプレートのプラスミドをヒトiPS細胞へエレクトロポレーション法で導入しました。遺伝子導入2日後から、レポーター遺伝子に付加されている選抜薬剤で約1週間培養することで、ゲノム編集されたiPS細胞のみに濃縮しました。次に、この細胞を $1.0\text{-}5.0 \times 10^3$ cells/wellとなるように6-wellプレートへ播種し、約6日かけてコロニーを形成させました。蛍光レポーターの発現を蛍光顕微鏡で確認すると、間隔をもった状態でコロニーが形成され、レポーター遺伝子が発現したコロニーが存在することを確認できました (Fig. 2)。

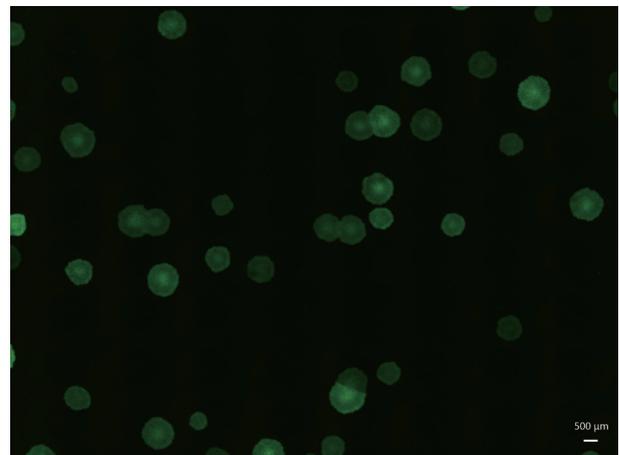


Fig. 2 コロニー単離前のウェル中のiPS細胞

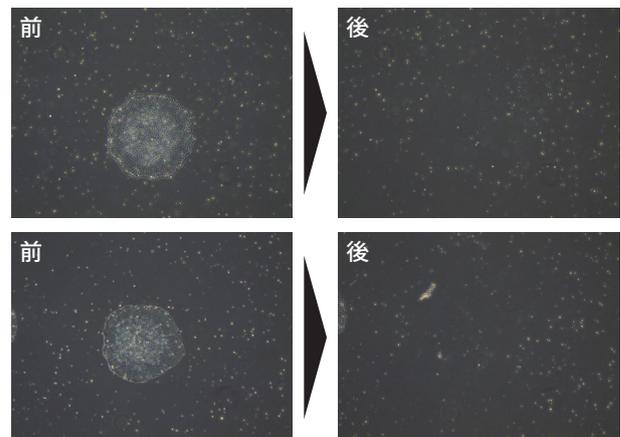


Fig. 3 ピッキング前後のiPS細胞の様子

この状態の細胞に対して、CELL PICKERを用いてiPS細胞コロニーを回収しました。専用ソフトウェアで対象を探し、採取したいコロニーを決め、操作ボタンでCELL PICKERを操作しコロニーをピッキングしました (Fig. 3)。

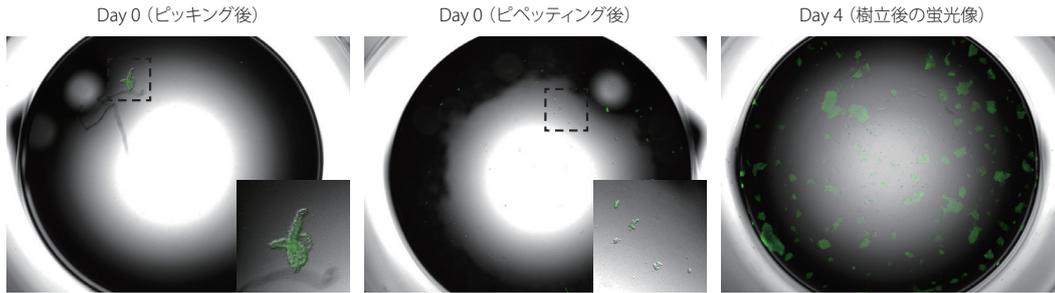


Fig. 4 コロニーピッキング後のゲノム編集ヒトiPS細胞の様子

CELL PICKERで96-wellプレートに播種しました(Fig. 4左)。ピペッティングで細胞塊を軽くほぐし(Fig. 4中央)、その後、問題なく培養することができました。培養4日後、最終目的であるレポーター遺伝子を発現するヒトiPS細胞を樹立することができました(Fig. 4右)。

このように、コロニー分離法は、ピッキングしたコロニーの大多数が生存可能なこと、1つのコロニーから複数細胞を回収するため回収後の細胞が安定して増殖し、限界希釈法やセルソーティングに比べて培養期間を短縮することができます。

さらに、通常手作業で行われるコロニー分離法は、顕微鏡を覗きながら作業するため肉体的に疲労を感じますが、CELL PICKERを使用することで、非常に楽にピッキング作業を実施することができます。

6. MCE-202 MultiNAによる変異導入の確認

Fig. 1のゲノム編集を用いたクローン樹立フローの④変異導入の確認工程では、目的とする遺伝子変異が導入されていることを確認する必要があります。ここでは、MCE-202 MultiNAを用いたヘテロ二本鎖移動度分析(HMA: Heteroduplex Mobility Assay)

による効率的な変異導入の確認方法について紹介します。

遺伝子ノックアウトを目的とした非同相末端結合での変異導入では、1塩基~数十塩基の微小な欠失や挿入が生じます。この変異を確認するためには変異導入部のDNA塩基配列解析が不可欠となりますが、一般的にDNA塩基配列解析は労力・費用を要するため、先に検体を選別の方が効率的です。その選別方法として、変異近傍領域のPCRと電気泳動だけで実施できるヘテロ二本鎖移動度分析は、簡便かつ有用な方法です。

二本鎖DNAを電気泳動した場合、完全相補的なホモ二本鎖DNAは分子量に依存した移動度を示します。しかしながら、一部にミスマッチが起きているヘテロ二本鎖DNAは、ミスマッチ部位における立体構造がホモ二本鎖DNAと異なるため泳動速度が遅くなります。ヘテロ二本鎖移動度分析では、この現象を利用して変異の有無を検出します。

Fig. 5に示されるように、変異導入後のサンプルに対し標的配列の近傍領域にPCRを実施し、増幅産物に熱変性と再アニールを行うことで、野生型ホモ、変異型ホモ、およびヘテロ型の遺伝子型に応じた再アニール産物が得られます。その後、再アニール産物をMCE-202 MultiNAで電気泳動分析することで、泳動パターンから遺伝子型を識別することができます。

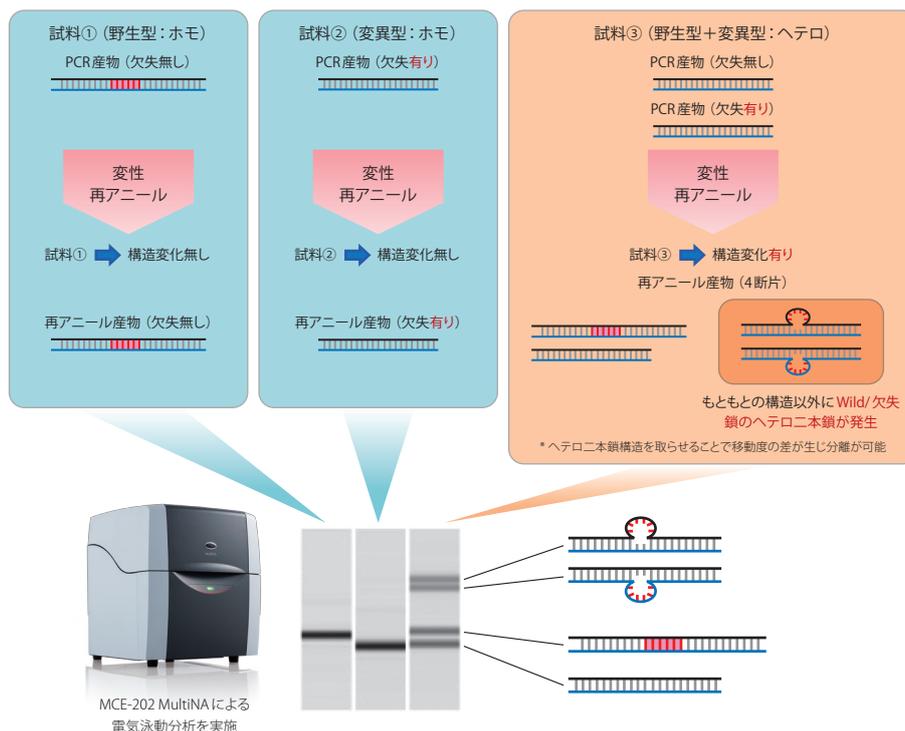


Fig. 5 MCE-202 MultiNAを用いたヘテロ二本鎖移動度分析

一般的な電気泳動法では結果が目視判定に依存していますが、本機では客観的な数値データを簡単に得ることができます (Fig. 6)。また、高い分離能と高感度検出を特長としており、従来法では検出困難なサンプルも分析することが可能です。

このようにMCE-202 MultiNAをヘテロ二本鎖移動度分析に活用することで、簡便にゲノム編集による変異導入の確認 (Fig. 7) を行うことができます。

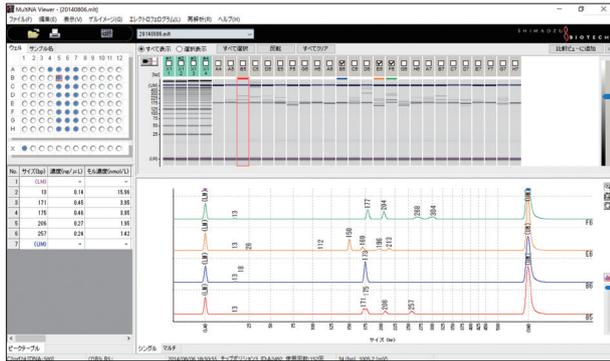


Fig. 6 分析結果

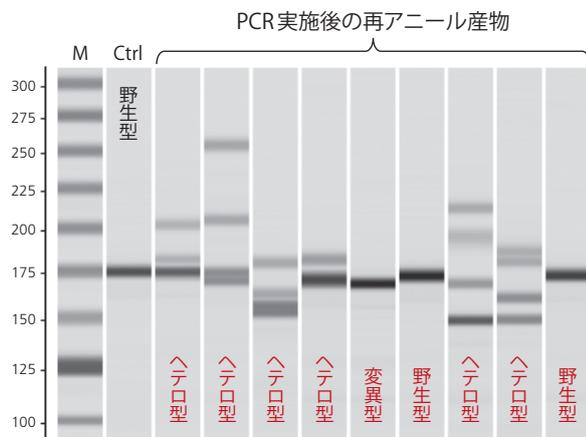


Fig. 7 ゲノム編集によって変異導入されたサンプルの選別例

複数のバンドが検出された場合はヘテロ型であり、バンドが一本であればバンドの検出位置によって野生型と変異型を識別できる。

CELL PICKERおよびMultiNAは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

本文に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。

なお、本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証等を受けておりません。

治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。

トラブル解消のため補修用部品・消耗品は純正部品をご採用ください。

外観および仕様は、改良のため予告なく変更することがありますのでご了承ください。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <https://www.an.shimadzu.co.jp/>

7. まとめ

ゲノム編集ツールの革新的な進歩により、遺伝子改変自体は容易な作業とになってきました。一方で、遺伝子改変後の細胞のクローン化には、まだまだ習熟を要する作業と煩雑な作業が介在しています。本テクニカルレポートでは、煩雑なクローニング作業の効率化を支援する、当社のゲノム編集ソリューションについて解説しました。

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原作者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。

掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2019年10月
A改訂版発行：2021年11月
© Shimadzu Corporation, 2021