

セミナーのお知らせ

演者 東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設 教授 斎藤 泉 先生

演題 CRISPR guide RNA 発現ユニット多重連結法の開発と供給 ～多数同時切断、off-target の解決、knock-in, アデノベクターへの応用の可能性～

CRISPR/Cas9 システムでは Cas9 酵素だけでなく guide RNA (gRNA) の導入法が重要です。異なる guide RNA を発現する数個のプラスミドの co-transfection で数個の遺伝子を同時にノックアウトできることが報告されています。しかし個々の細胞レベルで考えると、transfection では一つの細胞に複数の異なる gRNA 発現プラスミドの全てが導入されている確率は、数が増えれば幾何級数的に減少します。また 1 つの細胞へ導入されている相異なる gRNA 個数はばらばらで、ある gRNA は多数入り、別の gRNA は全く入っていません。この問題は gRNA の transfection に限らず、複数同時発現における本質的な問題と考えられます。もし全ての発現ユニットを 1 コピーずつプラスミドが作製できればこの問題は解決されると考えられますが、2 個を超える U6-gRNA 発現ユニットをもつプラスミドの作製は、ユニット間で相同組換えが大腸菌内で起き欠失してしまうため非常に難しく、それを安定かつ大量に作製することはこれまで不可能でした。

私達はラムダファージの in vitro パッケージングなどいくつかの工夫により相同組換えの問題を解決し、4 個あるいは 8 個の異なる gRNA 発現ユニット、Cas9/nickCas9 および knock-in に必要な donor DNA からなる「多重 gRNA 発現-(nick)Cas9-donor DNA 断片」を安定かつ大量に調製する方法を確立しました (特許出願済)。この作製法は技術的には特殊ではありますが、一旦確立されれば通常のプラスミド断片の作製と大差ない労力で次々と作製することが可能です。

本法を用いると一番切断効率が高い gRNA を選択する必要はなくなります (候補全てを同時に用いればよい)。多数標的の同時 knock-out や、より確実な切断は guide を多くできればより効果的ではないかと思われれます。また DNA をゲノムとするウイルスの確実な破壊にも有用かと考えられます。特に Cas9 変異型を用いて標的近傍の両鎖に nick を入れる off-target の解決法では、1 カ所の切断に 2 つの guide RNA が必要であり、また切断しても end-joining で元に戻ってしまうのを防ぐためには 2 カ所の同時切断が有効です。この両者を同時に行うには 4 つの gRNA を 1 つの細胞内で同時に発現させる必要があります。従って同時発現ユニットの数は少なくとも 4 個が望ましいと考えています。さらに donor DNA を組み込み、off-target のない効率的な knock-in ができるかもしれません。またこの 4 連ユニットをさらに 2 個連結した 8 ユニット連結の安定調製にも成功しています。8 連ユニットができれば切断 Cas9 の必要がなくなり、ほとんどが nickCas9 で行えることになるかもしれません。一方この技術により慈恵医大・鐘ヶ江裕美博士は、多数の gRNA 発現ユニットの同時発現 (現在 6 個に成功しています)、および Cas9/nickCas9 を高発現する安定な アデノウイルスベクターの作製に成功しており、in vivo の実験への応用も視野にいられています。多重連結法は色々な応用が考えられる基礎技術です。

現在のところこの方法は開発されたばかりで、Cas9 が利用されている様々な場面において現在行われている方法より優れているか否かはそれぞれの分野の研究者に実際に使っていただいて検討する必要があります。そこで当研究室では、そのまま実験に用いるのに充分量 (数百 μg) の DNA を共同研究ベースで受託作製供給を行うため専任の研究補助員を配置し、様々な分野の研究者との共同研究を募集しております。本セミナーでは gRNA 多重発現法の紹介と、その応用の可能性および供給について論じたいと思います。

日時: 8月5日 (水) 午後4時から

場所: 微研本館 1 階 微研ホール

連絡先: 分子ウイルス分野 松浦 (内線 8340)

このセミナーは医学系研究科修士・博士課程の単位認定セミナーです