

実験講座



CRISPR/Cas9 による遺伝学的スクリーニングシステムの開発

樽本 雄介 遊佐 宏介

Key words: CRISPR, 遺伝学的スクリーニング, ゲノムワイドライブラリー, 機能ドメイン標的ライブラリー

近年のゲノム編集技術の発達により、多くの生物種において遺伝学的な解析が可能となった。なかでも、CRISPR/Cas9 を利用したシステムはガイド RNA の配列を変更するだけで多数の遺伝子を標的とすることが可能であり、扱いが簡便で汎用性が高いことから広く普及している。本稿では、CRISPR/Cas9 を用いたノックアウトによる順遺伝学的スクリーニングに関する知見を中心に解説する。

I. CRISPR/Cas9 システム

CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein) は、細菌や古細菌における外来の遺伝性因子 (ファージやプラスミド) に対する獲得免疫機構である。その構成タンパク質によって幾つかのクラス・サブタイプに分けることができ、II 型 CRISPR/Cas システムの 1 つを構成する Cas9 が遺伝子工学的に現在最も利用されている。Cas9 はエンドヌクレアーゼであり、ガイド RNA と複合体を形成することでその RNA と相補的な配列を持つ DNA を切断する。Cas9 が DNA に結合するためには標的配列に続いて PAM (protospacer adjacent motifs) 配列の存在が必須であり、由来する細菌種や Cas の種類によって決まっている。例えば、化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*)

由来 Cas9 の PAM は “NGG” (G はグアニン, N はどの塩基でもよい) という単純な配列であり、制約はあるもののゲノム DNA の多くの領域を標的にできる。最近では、異なる PAM 配列に対しても活性を持つ Cas9 変異体の開発が進んでおり、標的配列の制約は更に少なくなると期待される¹⁾。

Cas9 によって二本鎖切断された DNA は非同末端結合によって修復され、そのときランダムに短い挿入欠失や変異が起こることでフレームシフトや未成熟終止コドンが誘発され、標的遺伝子のタンパク質機能が損なわれる (図 1A)。RNA 干渉法 (RNAi) と比較すると、CRISPR はゲノム DNA に変異を導入することで遺伝子の機能を完全に失わせることができると期待され、また RNAi よりもオフターゲット効果 (目的とする遺伝子以外が標的になってしまうこと) が少ないことが報告されている²⁾。そのため、CRISPR による遺伝子ノックアウトは、表現型観察によって遺伝子機能を解析するための重要な研究手法として多くの実験系で採用されている。

また、Cas9 がガイド RNA の標的配列に特異的に結合することを利用して、遺伝子ノックアウト以外にも CRISPR/Cas9 システムが拡張されている。例えば、ヌクレアーゼドメインに変異を導入した不活性型 Cas9 (dCas9, nuclease-deficient Cas9) を蛍光タンパク質や様々な酵素ドメインと

Development and improvement of high-throughput CRISPR-Cas9 genetic screening

Tarumoto Yusuke, Yusa Kosuke: 京都大学ウイルス・再生医科学研究所幹細胞遺伝学分野 (〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町 53)

0370-9531/12/¥500/ 論文/JCOPY

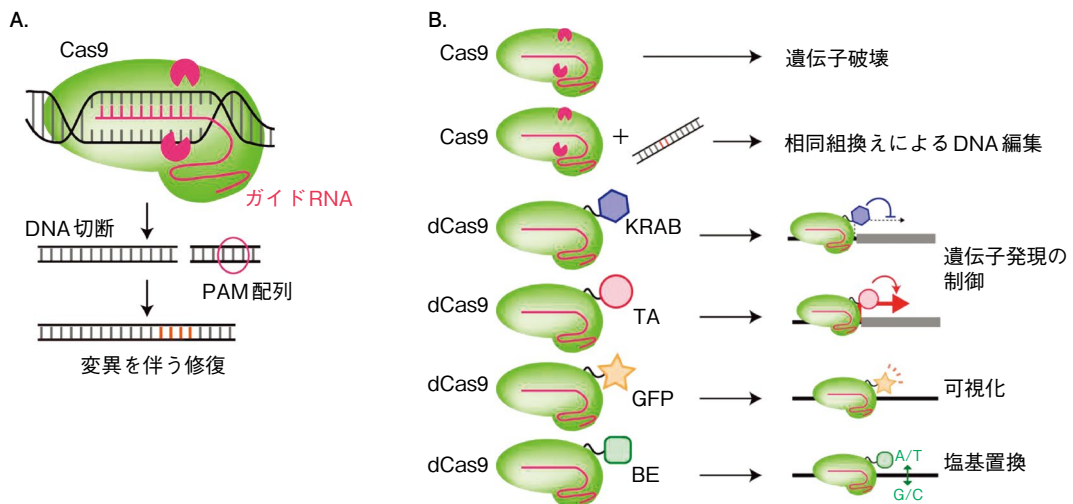


図 1 CRISPR によるゲノム編集とその応用

A. CRISPR/Cas9 による遺伝子編集。

B. CRISPR/Cas9 システムの様々な利用方法。KRAB：転写抑制ドメイン，TA：転写活性化ドメイン，BE：塩基編集ドメイン

融合させることで、特定の DNA 領域にそれらの分子を結合させ、遺伝子発現の亢進や抑制、塩基の編集、顕微鏡下での可視化などが可能となっている (図 1B)。

II. CRISPRを用いたハイスループットノックアウトスクリーニング

CRISPR を用いた強力な研究手法の一つが、ハイスループットな遺伝学的スクリーニングによって表現型と遺伝型の相関をバイアスなく網羅的に解析することである。異なる遺伝子 (あるいは遺伝子調節領域) 配列に標的を持つ多数のガイド RNA をプールして 1 つのライブラリーとし、それを 1 細胞あたり 1 ガイド RNA となるように細胞集団に導入することで、それぞれ異なる遺伝子がノックアウトされた変異細胞の集団を作製することができる。この変異細胞集団に対して様々な選択圧をかけ、集団中での割合 (頻度) が変化したガイド RNA を調べることによって、どのガイド RNA の標的遺伝子が選択圧に対する細胞の応答に関与したか同定することができる。

図 2A は CRISPR スクリーニングの 1 例であり、細胞の生存・増殖に必要な因子を同定する実験の一般的な流れを示す。① まず、スクリーニング

に用いる細胞に対して Cas9 発現ベクターをレンチウイルスなどによって導入し、Cas9 発現細胞を樹立する。② その細胞にガイド RNA 発現ベクターのライブラリーをレンチウイルスによって導入し、変異細胞の集団を作製する。③ ここで細胞集団の一部を回収し、コントロール群とする。④ 残りの細胞集団は継代を続け、一定期間継代したのちに回収し、実験群とする。⑤ コントロール群と実験群の細胞からゲノム DNA を抽出し、ガイド RNA 領域を PCR で増幅したのちに次世代シーケンサーを用いて配列を特定する。⑥ それぞれの細胞集団に含まれるガイド RNA の数を比較する。ただし、細胞の生存に必要な遺伝子の場合には、コントロール群回収の前にそれを標的とするガイド RNA が減少することが予想されるため、プラスミドライブラリーに含まれるガイド RNA の数と実験群の細胞集団中のガイド RNA の数を比較することも行われる。

これはネガティブセクションと呼ばれるもので、増殖速度による選択を行ったのちに変異細胞集団中で頻度が減少したガイド RNA を調べることによって、細胞の生存・増殖がどの遺伝子に依存しているのかを明らかにすることができる。増殖を指標とするスクリーニングの他の例として、

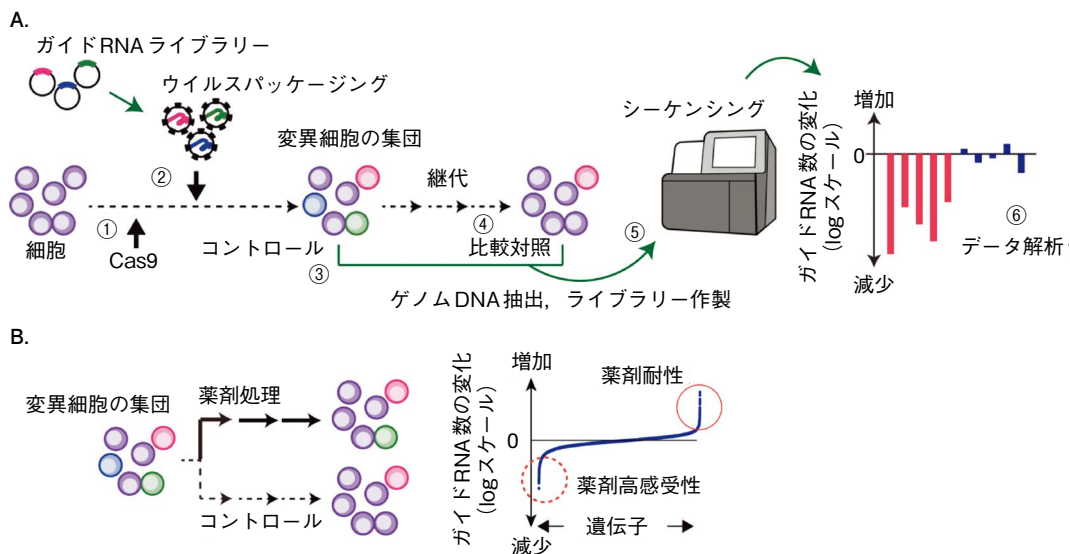


図2 細胞の生存・増殖を指標としたCRISPRスクリーニング

A. CRISPR ノックアウトスクリーニングの流れ。図中の番号は本文参照。

B. 薬剤への感受性に影響を与える因子のスクリーニング。

変異集団を作製したのちに集団を2つに分け、薬剤を処理した細胞集団と、未処理の細胞集団を比較する実験系があり、薬剤への抵抗性に関与する遺伝子を探索するために行われる(図2B)。薬剤の作用機序にもよるが、用いる薬剤の濃度によってポジティブセレクション(ガイドRNAが増加=ノックアウトすることによって細胞が薬剤耐性になる遺伝子)とネガティブセレクション(ノックアウトすることによって細胞が薬剤高感受性となる遺伝子)の両方のスクリーニングが可能である。例えば、がん細胞の治療に使う薬剤に対する抵抗性獲得の分子機構の解明や、相乗効果を示す薬剤標的の探索につながるスクリーニングなどが行われている。

また、細胞の増殖を指標とする代わりに、レポータータンパク質などの遺伝子発現の変化や細胞の形態変化などを指標とし、フローサイトメトリー(FACS)を用いて特定の細胞集団をスクリーニングすることも可能である。

Ⅲ. CRISPRスクリーニングを実施するうえでのポイント

実際にスクリーニングを行ううえで、幾つか押さえておくべき点を以下に述べる。より詳細な手

順はほかにも参照されたい³⁾。

①まず、CRISPRスクリーニングによって高感度に候補因子を検出するためには、Cas9による遺伝子編集効率の高い細胞を樹立することが非常に重要である。特にネガティブセレクションスクリーニングの場合には、編集がうまくいかず野生型の遺伝子を発現する細胞が集団中に混じると、検出感度が大きく低下してしまう。原理的にはCas9とガイドRNAを1つのベクターに組み込んだ(シングルベクターシステム)ライブラリーを細胞に導入することも可能であるが、細胞ごとのCas9の発現のばらつきが大きくなりノイズが増えてしまう。Cas9発現細胞を樹立したのちにガイドRNAライブラリーを導入したほうが、感度が高く再現性のあるスクリーニング結果につながると考えられる。ただし、Cas9発現株の樹立が困難な初代培養の細胞や一部の細胞株の場合には、シングルベクターシステムを検討することもできる。細胞株を用いる場合、Cas9発現細胞は必ずしも単一のクローンである必要はなく、十分な編集効率が確認できるようであれば、抗生物質あるいはFACSによる選択で樹立したヘテロな細胞集団を用いても問題ない。

一方、効率が十分でないならば編集効率のよい

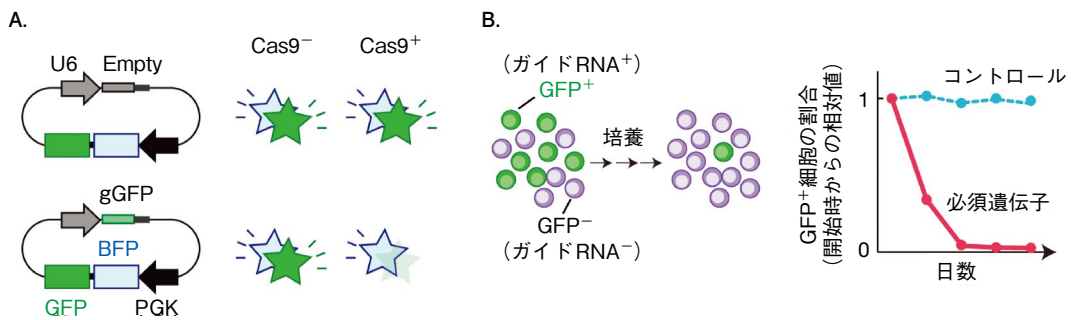


図 3 細胞内の Cas9 活性の測定方法

A. Cas9 活性を調べるレポーターコンストラクト。導入した細胞の Cas9 活性が高ければ BFP のみ陽性に、Cas9 活性が低ければ BFP/GFP ともに陽性になる。gGFP : GFP を標的とするガイド RNA。

B. GFP とリンクしたガイド RNA を細胞に導入後、集団中の GFP の割合の変化を測定することで、必須遺伝子がノックアウトされた細胞が効率よく集団中から除去されるか確認する実験系。

クローンを選択して実験に用いる。細胞内での Cas9 による編集効率は、例えば図 3A に示すようなレポーターベクターを導入することで FACS を用いて測定できる⁴⁾。また、細胞周期の進行や DNA 複製に重要な因子といった必須遺伝子を標的としたガイド RNA を導入したときに、強い増殖阻害の表現型が観察できるかといったことでも確認できる(図 3B)。後者の実験は、その細胞で実際に必須遺伝子をノックアウトした際に観察される表現型を知ることで、スクリーニングで取得する候補遺伝子をノックアウトした際に期待される表現型を推測できるようになるという点で有用である。Cas9 の発現も一般的な導入遺伝子と同様、長期間培養すると遺伝子サイレンシングなどにより Cas9 発現量の少ない細胞が現れる場合があるため、スクリーニングに使用する前に Cas9 の編集効率を確認したほうがよい。

②ガイド RNA ライブラリーを細胞に導入する際には、1つの細胞に1つのガイド RNA が導入されるように調節し、1遺伝子のみがノックアウトされた細胞集団を作製する。これは、ウイルスによる形質転換効率が30%前後になるように感染させることで達成できる。スクリーニングを始める前に、異なるウイルス量を用いて細胞に感染させ、形質転換効率を測定しておく。筆者らのベクターのように、蛍光タンパク質がベクターに含まれている場合には、FACS 解析によって感染効率を判断できる⁴⁾。一方、抗生物質耐性遺伝子の

みがベクターに含まれている場合には、薬剤選択後の細胞の生存率から計算する⁵⁾。FACS や抗生物質を用いて非感染細胞を除き、ガイド RNA が導入された細胞集団に対して目的のスクリーニングを行う。

③スクリーニングのすべての作業ステップで、十分な数の細胞および DNA 分子数を維持することが重要である。通常、CRISPR ライブラリーのサイズ(全ガイド RNA 数、Representation)の300-500 倍程度を維持することが多い。プラスミドライブラリーの増幅、細胞へのウイルス感染、細胞の継代、シーケンスライブラリーの作製といったそれぞれの過程でこの数を下回らないように維持しないと、各ステップで増幅されたノイズを含むばらつきの大きな結果を招いてしまう。高い Representation を維持したほうが実験ごとのノイズは少ないが、培養スペースの確保や費用の問題が伴うため、きちんと研究計画を練る必要がある。実験条件によっては低い Representation で複数回実験を行う(レプリケートをとる)ことでもしっかりしたデータとなる。筆者らはウイルス感染時に100×Representation、細胞継代時に500×Representation を維持し、2-3 回のレプリケートをとったデータをあわせることで信頼性の高いスクリーニング結果を得ている⁶⁾。

IV. CRISPR ガイド RNA ライブラリー

スクリーニングで用いられるガイド RNA ライ

ブラリーには次のようなものがある。筆者らの作製したライブラリーを含め、これまでに論文で発表された CRISPR ライブラリーの多くは Addgene のウェブサイト (<https://www.addgene.org/crispr/libraries/>) にまとめられており、入手可能である。

1. ゲノムワイドライブラリー

網羅的な遺伝学的スクリーニングを実施する場合には、全遺伝子を標的としたガイド RNA ライブラリーを用いる。これまでにヒトやマウスなどのゲノムワイドライブラリーが複数の研究室において報告されており、筆者らも独自のゲノムワイドガイド RNA ライブラリーを作製済みである⁴⁾。筆者らの最新のライブラリーは、初期に設計されたライブラリーを用いたスクリーニングデータをもとにしてガイド RNA の設計を最適化してある。また、発現ベクターにもガイド RNA がより安定的に発現するような改良が加えてあり、それまでのゲノムワイドライブラリーと比較してネガティブセレクションの効率が大幅に改善された。マウスゲノムワイド CRISPR ライブラリー (v2) は 18,424 遺伝子を標的とし、95% 以上の遺伝子で 5 つ以上のガイド RNA が設計してあり、合計 90,230 のガイド RNA から構成されている。ヒトゲノムワイド CRISPR ライブラリーも同様の設計で 18,010 遺伝子を標的とし、合計 90,709 のガイド RNA を含んでいる。

筆者らは、このゲノムワイドライブラリーを用いてがん細胞 30 種 324 株を対象とした CRISPR ノックアウトスクリーニングを実施し、各がん細胞株における生存・増殖に必須な遺伝子のデータを大規模に取得した⁶⁾。これをもとに様々なコンピューター解析を行うことで、それぞれのがん種ごとの必須遺伝子や、がん遺伝子変異の有無と相関関係を示す必須遺伝子の同定および有効な分子標的薬の候補の探索を行った。このスクリーニング結果から構築したがん細胞株の遺伝子依存性データベースは公開しており (Cancer Dependency Map, <https://depmap.sanger.ac.uk/>)、ブロード研究所の DepMap データベース (<https://depmap.org/portal/>) とあわせて^{7,8)}、多くのがん研究者・製薬会社に有用な情報を提供するものと

期待している。

2. サブライブラリー

ゲノムワイドライブラリーは含まれるガイド RNA の数が多い (ライブラリーサイズが大きい) ため、研究対象によってはスクリーニングに十分な細胞数の確保が困難となる。この場合は、研究の目的に応じて事前に標的を絞り込むことで、小さなサイズのライブラリーを用いたスクリーニングが可能になる。特定の細胞機能に重要な遺伝子群を対象にしたサブライブラリーが設計され、公開されている。また、自分たちが興味を持つ遺伝子のみを標的とするガイド RNA ライブラリーも、合成オリゴ DNA をガイド RNA 発現ベクターにクローニングするだけで容易に作製することができる。

3. 機能ドメイン標的ライブラリー

CRISPR を用いて遺伝子を完全にノックアウトしようとする場合、挿入・欠失や変異に伴って生じる早期終止コドンによってそれ以降のアミノ酸が発現しなくなることを期待するため、標的遺伝子の 5' 側エクソン (開始コドン直下など) に対してガイド RNA を設計する場合が多い。しかし、CRISPR による変異はランダムに起こるため、ある確率でフレームシフトを伴わない変異 (インフレーム変異) となる。これは、もし遺伝子の 3' 側にタンパク質の機能ドメインがコードされている場合に、機能的なタンパク質が発現し続けることを意味する。クローニングして解析する場合には、正しくノックアウトされた細胞を選択すればその後の解析に支障はでないが、スクリーニング時にインフレーム変異を持つ細胞を選択的に除くことは困難であり、ネガティブセレクションスクリーニングでの検出感度を低下させる原因となる。一方、タンパク質の機能ドメインを選択的にガイド RNA の標的とすることで、インフレーム変異が起こった場合でもタンパク質の機能を欠損させることができること、それによって集団中の機能的な変異の割合が増加して、高感度に候補因子を同定できることが示された (図 4A, B)⁹⁾。筆者らはこの機能ドメイン標的戦略を更に発展させ、キナーゼや DNA 結合ドメインなどを標的としたガイド RNA ライブラリーを独自に構築し

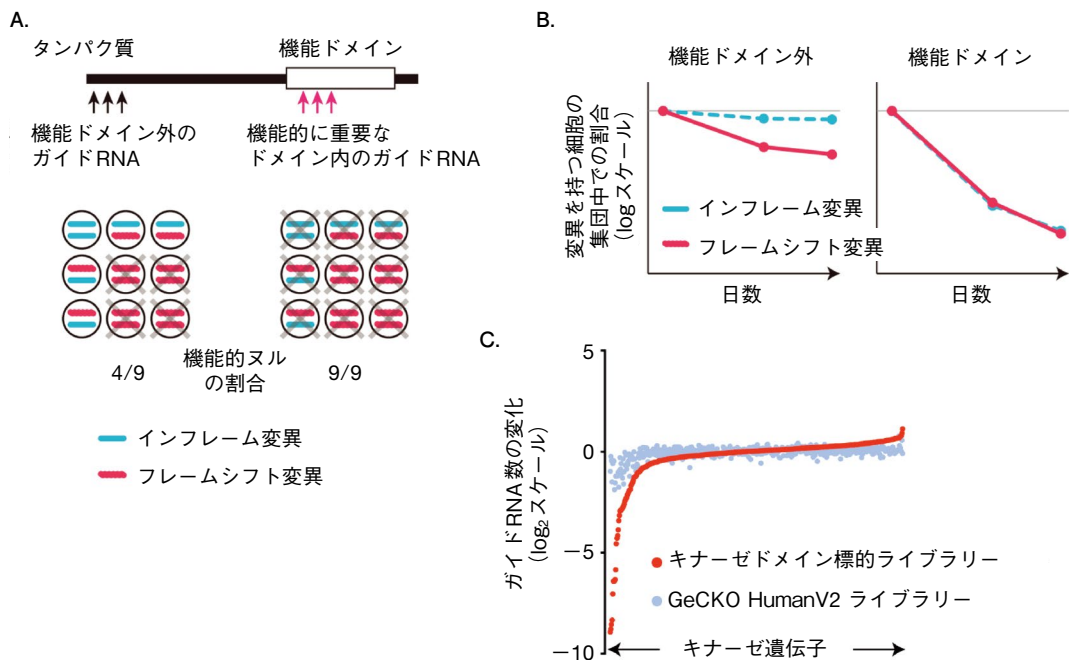


図 4 機能ドメインを標的とする CRISPR ノックアウト戦略

- A. ガイド RNA をタンパク質の機能ドメイン外に設計した場合、二倍体細胞では集団中の 5/9 の細胞がインフレーム変異を持つ機能的なタンパク質を発現し得る。機能ドメインを標的とすることで機能的ヌルの割合が高まる。
- B. 変異導入された細胞の集団中での継時的な割合（文献 9 を参考に作成した模式図）
- C. 各ライブラリーを用いたスクリーニングの実際の結果。GeCKO はキナーゼ遺伝子のデータのみを抽出

た。実際にキナーゼドメインを標的としたスクリーニングでは、従来のライブラリーと比較して高感度でがん細胞の必須遺伝子を同定することが可能となっている（図 4C）。筆者らは、これまでに複数のがん細胞株において機能ドメイン標的のノックアウトスクリーニングを実施しており、急性骨髄性白血病（AML）細胞では必須遺伝子として新規のキナーゼおよび転写調節因子を見いだしている^{10,11)}。

おわりに

CRISPR/Cas9 による遺伝子編集技術は広く普及して誰でも手軽に扱えるものとなっているが、実際に大規模なスクリーニングを行うには多少の準備が必要である。本稿が、未知の分子機構を明らかにするうえで強力な遺伝学的解析ツールとなる CRISPR スクリーニングの技術を身近に感じてもらえる手助けになることを期待する。

●文 献

- Walton RT, Christie KA, Whittaker MN, Kleinstiver BP : *Science*. 2020 Mar 26. pii : eaba8853. doi : 10.1126/science.aba8853. [Epub ahead of print]
- Smith I, Greenside PG, Natoli T et al : *PLoS Biol*. 15 : e2003213, 2017
- Yu JSL, Yusa K : *Methods*. 164-165 : 29-35, 2019
- Tzelepis K, Koike-Yusa H, De Braekeleer E et al : *Cell Rep*. 17 : 1193-1205, 2016
- Sanjana NE, Shalem O, Zhang F : *Nat Methods*. 11 : 783-784, 2014
- Behan FM, Iorio F, Picco G et al : *Nature*. 568 : 511-516, 2019
- Meyers RM, Bryan JG, McFarland JM et al : *Nat Genet*. 49 : 1779-1784, 2017
- Dempster JM, Pacini C, Pantel S et al : *Nat Commun*. 10 : 5817, 2019
- Shi J, Wang E, Milazzo JP et al : *Nat Biotechnol*. 33 : 661-667, 2015
- Lu B, Klingbeil O, Tarumoto Y et al : *Cancer Cell*. 34 : 970-981.e8, 2018
- Tarumoto Y, Lu B, Somerville TDD et al : *Mol Cell*. 69 : 1017-1027.e6, 2018