

222 不活性型Cas9を用いた新規相同組換え修復因子の探索	加藤 朋子
--------------------------------	-------

【目的】 CRISPR-Cas9 を中心としたゲノム編集技術は、遺伝性疾患に対する効果的な治療法として注目されている。特に疾患の原因となる変異の修復が高精度に実現されれば、生体内で直接ゲノムを編集することが可能となり、医療応用への期待を更に加速させる。ゲノム編集はゲノム DNA の二本鎖切断後に、ドナーDNA を用いた相同組換えを介して正確な修復を行う HDR と、ランダムな欠失や挿入を伴いながら修復を行う NHEJ によって生じる。しかし、一般的な条件では、HDR に比べて NHEJ がはるかに強く誘導されてしまうことが、医療応用の実現に向けて大きな障壁となっている。本研究では、他の細胞に比べて HDR 活性が高い HEK293T 細胞由来 cDNA ライブラリを用いて、過剰発現により、CRISPR-Cas9 が誘導する HDR を亢進する因子のスクリーニングを行う。本研究で見出された新規の HDR 因子は、疾患ゲノム変異を正確に修復するための医療技術にも応用できることが期待される。

【方法】 本研究では FACS ソーティングが必要になるため、ヒト白血病由来 K562 細胞を用いた。HDR と NHEJ の同時活性測定が可能な Traffic Light レポーター、Tet 発現誘導型 Cas9 及び gRNA のそれぞれを Nucleofection により導入し、薬剤選択によって単一クローンを得た。樹立した細胞にドナーDNA を Nucleofection すると同時に、HEK293T 細胞由来の cDNA Library (Lentivirus として導入) と Cas9 の発現を ON にするための doxycyclin を添加した。1 週間後に顕微鏡下で蛍光観察を行い、FACS ソーティングにより HDR が生じている細胞 (EGFP 陽性細胞) と NHEJ が生じている細胞 (mCherry 陽性細胞) をそれぞれ分取した。分取した細胞からゲノムを抽出し、レンチウイルスベクター特異的なプライマーを用いて PCR により増幅し、その配列を Sanger sequence により確認した。

【結果】 K562 細胞に Traffic Light レポーター、Tet 発現誘導型 Cas9 及び gRNA を Nucleofection し、薬剤選択により単一クローン化した細胞 (K562-TLRiWTCas9-EGFPgRNA 細胞) を樹立した。この細胞は、doxycyclin 存在下で HDR 及び NHEJ 活性を誘導することができた。この細胞を用いてドナーDNA の Nucleofection、Lenti-HEK293TcDNA Library 及び doxycyclin の添加を行った上で FACS ソーティングを行ったところ、EGFP 陽性細胞と mCherry 陽性細胞をそれぞれ分取できた。また、これらの細胞のゲノムを抽出し、レンチウイルス特異的なプライマーを用いて配列を確認したところ、それぞれの集団で特異的な遺伝子配列を見出すことができた。

Cas9 の利用における問題点と Tet 発現誘導型 Cas9 を用いて目指す本研究の課題

