

新規dCas9融合タンパク質と化学合成ガイドRNAによるCRISPRを用いた遺伝子転写抑制

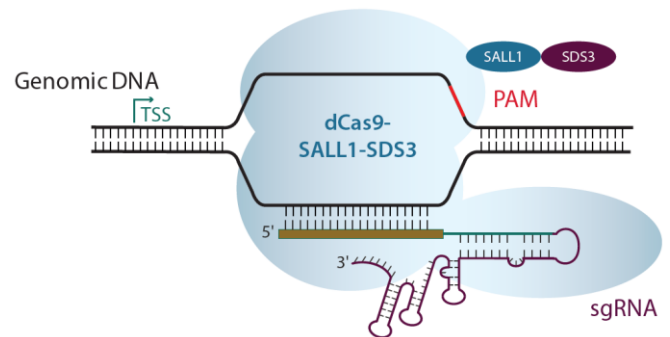
Clarence Mills, Ashleigh Keller, Amanda Haupt, Elena Maksimova, Hidevaldo Machado, Žaklina Strezoska, and Anja van Brabant Smith
Horizon Discovery, a PerkinElmer Company, Boulder, CO, USA

概要

ゲノム編集に一般的に使用される、化膿レンサ球菌由来のCRISPR-Cas9システムは、CRISPRa遺伝子転写活性化やCRISPR遺伝子転写抑制などの転写調節やエピジェネティックエンジニアリングにも利用されています。CRISPRiの場合、ガイドRNAは、1つまたは複数の転写抑制因子を融合したヌクレアーゼ不活性化Cas9 (dCas9と略称。D10AおよびH840A変異を含む)と複合体を形成します。ガイドRNAは、転写開始部位 (TSS) の近位かつ下流の領域を標的にして、ターゲット遺伝子の転写を抑制します。第1世代のCRISPRiシステムは、転写抑制因子としてジンクフィンガータンパク質10 (KOX1) のKrüppel関連ボックス (KRAB) ドメインをdCas9に融合したdCas9-KRABを利用します。このアプローチは、他の既存のテクノロジーよりもターゲット遺伝子の発現を特異的に抑制することが示されています。このCRISPRベースのアプローチでは、ターゲット遺伝子の転写抑制の程度が弱くなる可能性があるため、その抑制効率を改善する方法を特定する必要があります。

ここでは、2つのヒト転写抑制因子、Sal-like protein 1 (SALL1) および Sin3 histone deacetylase corepressor complex component SDS3 (SDS3またはSUDS3) 由来のドメインを、dCas9のC末端に融合したCRISPRi用の新規融合タンパク質について説明します。さまざまなアプリケーションと細胞タイプにわたってその有効性を調べます。dCas9-SALL1-SDS3を安定して発現する細胞に化学合成シングルガイドRNA (sgRNA) を導入した場合、dCas9-KRABを安定して発現する細胞を用いた場合よりも、一貫して大きい強力なターゲット遺伝子転写抑制を達成できることを示します。さらに、化学合成sgRNAを、*in vitro*で転写されたdCas9-SALL1-SDS3 mRNAとともに使用することにより、CRISPRiを用いた強力な遺伝子転写抑制を実現できることを示します。化学合成sgRNAガイドを使用するCRISPRiは、遺伝子機能の迅速な特性評価を可能にし、他の遺伝子機能喪失法を補完するとともに、複雑なエンドポイントアッセイの実行と幅広い表現型の検査を可能にします。

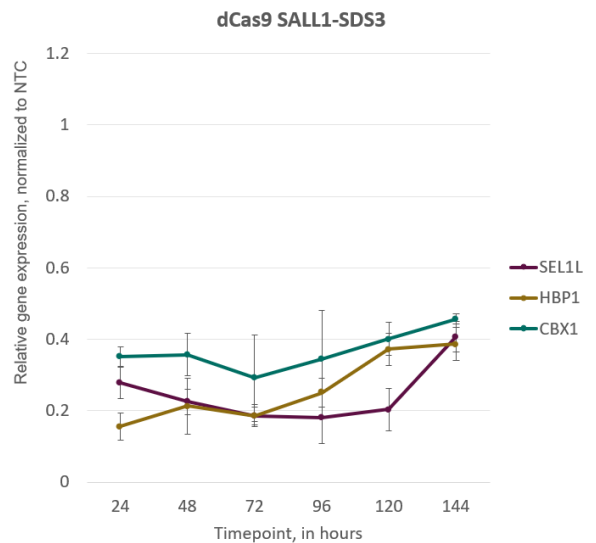
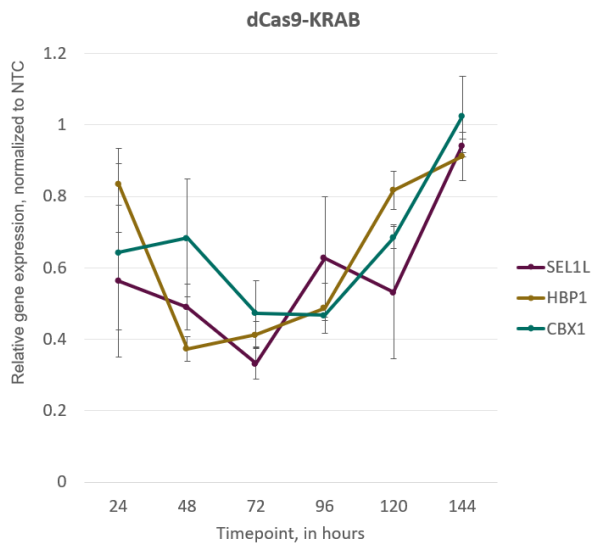
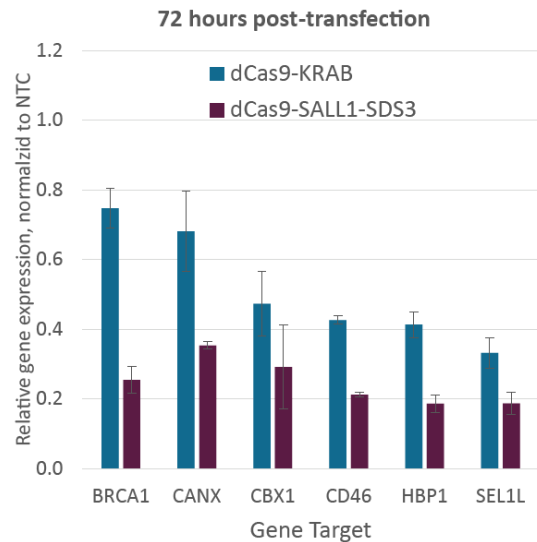
Horizonの新規CRISPRiシステム



HorizonのCRISPRiシステムは、転写抑制因子SALL1およびSDS3由来のドメインを、ヌクレアーゼ不活性化Cas9 (dCas9) に融合したdCas9-SALL1-SDS3を使用します。dCas9-SALL1-SDS3融合タンパク質とsgRNAとの複合体は、ターゲット遺伝子の転写開始部位 (TSS) のすぐ下流の領域に結合し、ターゲット遺伝子の転写を抑制します。

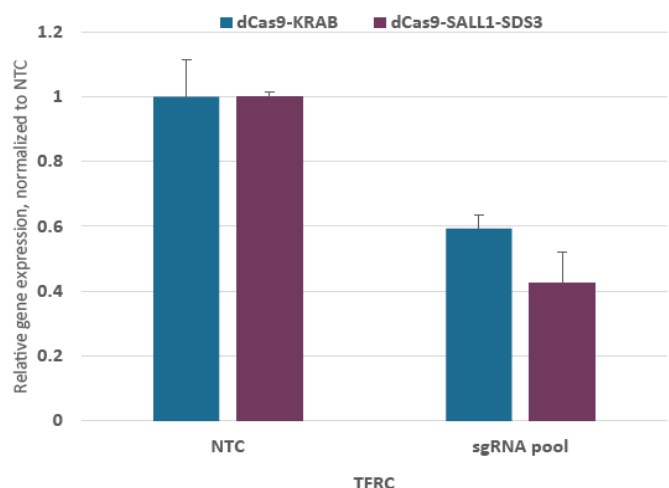
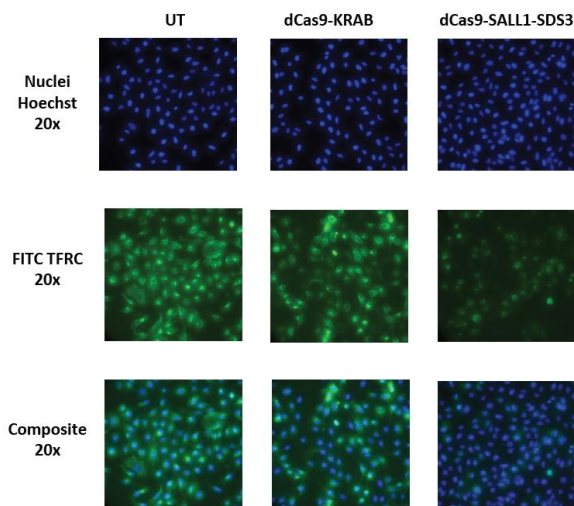
dCas9-SALL1-SDS3と化学合成sgRNAによる強力な転写抑制

dCas9-KRABまたはdCas9-SALL1-SDS3を安定して発現するU2OS細胞に、DharmaFECT 4トランスフェクション試薬を使用して化学合成sgRNAの混合物 (25 nM) をトランスフェクトしました。トランスフェクションの24、48、72、96、120、および144時間後に細胞を回収し、全RNAを単離し、RT-qPCRを使用して相対的な遺伝子発現を測定しました。各ターゲット遺伝子の相対的発現は、ハウスキーピング遺伝子としてGAPDHを用いた $\Delta\Delta Cq$ 法で計算し、non-targeting control (NTC) に対して正規化しました。dCas9-SALL1-SDS3は、dCas9-KRABよりも、すべての時点および遺伝子ターゲットにわたって一貫して強い転写抑制を実現しました。



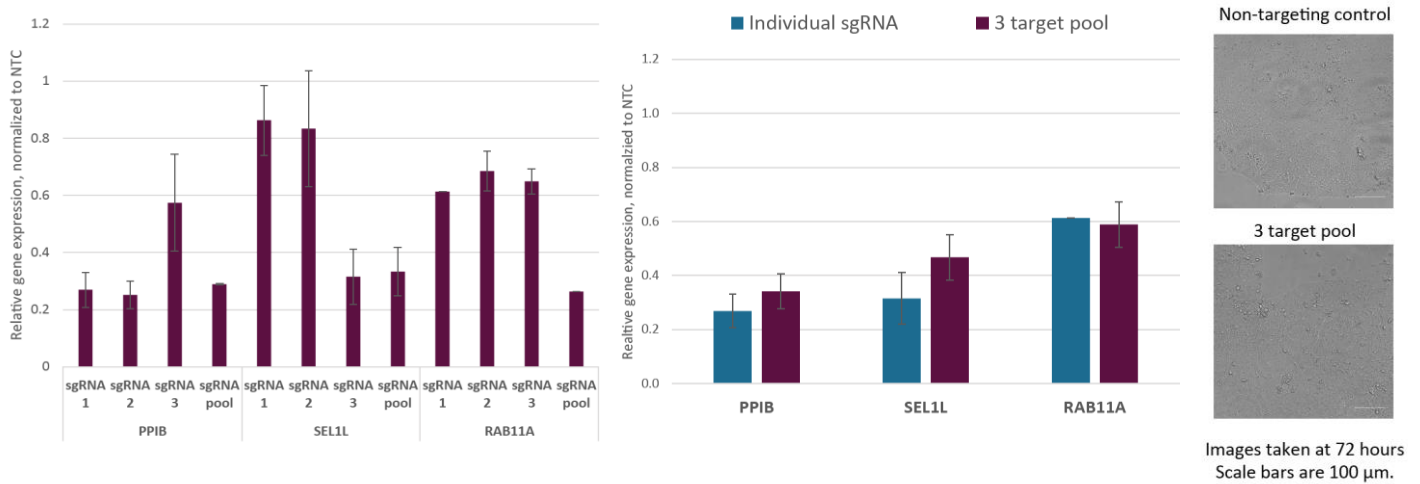
蛍光抗体分析はタンパク質レベルのノックダウンを示します

TFRC遺伝子の機能的ノックダウンを、hEF1 α プロモーターの制御下でdCas9-KRABまたはdCas9-SALL1-SDS3のいずれかを構成的に発現するU2OS細胞を用いて評価しました。TFRCを標的とする3つのsgRNAを含むsgRNA混合物 (25 nM) を、DharmaFECT 4トランスフェクション試薬を使用して細胞にトランスフェクトしました。トランスフェクションの72時間後に細胞を分割し、トランスフェクションの96時間後に細胞を固定し、TFRCを標的とする一次抗体とAlexa Fluor488標識蛍光二次抗体で染色しました。ヘキスト染色を使用して核を同定しました。複製プレートからRNAを単離し、RT-qPCRを使用して相対的な遺伝子発現を測定しました。dCas9-SALL1-SDS3を用いた場合、mRNAレベルとタンパク質レベルの両方でターゲット遺伝子のより強いノックダウンを実現できることが示されました。

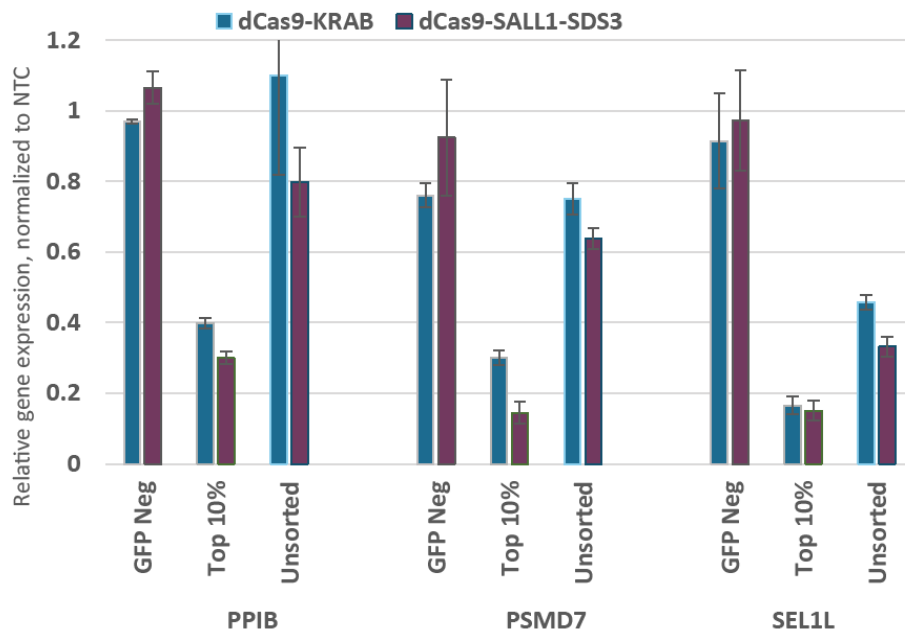


化学合成sgRNAの混合物の使用により、遺伝子転写抑制を強化したり、ヒトiPS細胞の複数の遺伝子を同時にノックダウンしたりすることができます

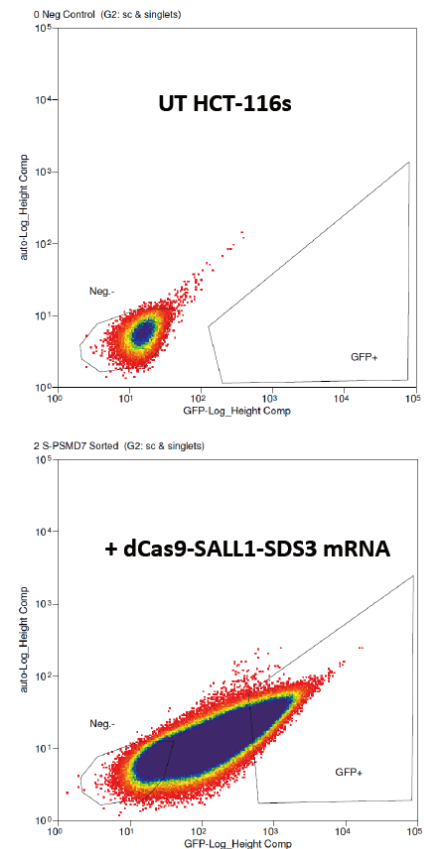
個々のCRISPRi用 sgRNAを混合して単一の試薬にしたプールを用いて、ターゲット遺伝子の転写抑制を強化したり、多重化して複数の遺伝子の同時転写抑制を可能にしたりすることができます。dCas9-SALL1-SDS3を安定して発現するWTC-11ヒトiPS細胞に、Lonza 96ウェルシャトルシステムを用いて、PPIB・SEL1LおよびRAB11Aを標的とする化学合成sgRNAを導入しました。各遺伝子ターゲットに対して最も有効なデザイン済みsgRNAを選択し、個別に、またはガイドRNAあたり3 μ Mの濃度でマルチターゲットプール（3つの異なる遺伝子をターゲットとするsgRNAの混合物）の一部として使用しました。ヌクレオフェクションの72時間後に細胞を回収し、全RNAを単離し、RT-qPCRを使用して相対的な遺伝子発現を測定しました。各ターゲット遺伝子の相対的発現は、ハウスキーピング遺伝子としてACTBを用いた $\Delta\Delta$ Cq法で計算し、non-targeting control (NTC) に対して正規化しました。3つの遺伝子は、発現抑制の程度が大幅に減少したり、細胞の生存率と形態が著しく変化したりすることなく、同時に発現抑制されました。



EGFP dCas9-SALL1-SDS3 mRNAは、トランスフェクションが困難な細胞モデルでのFACS濃縮を可能にします

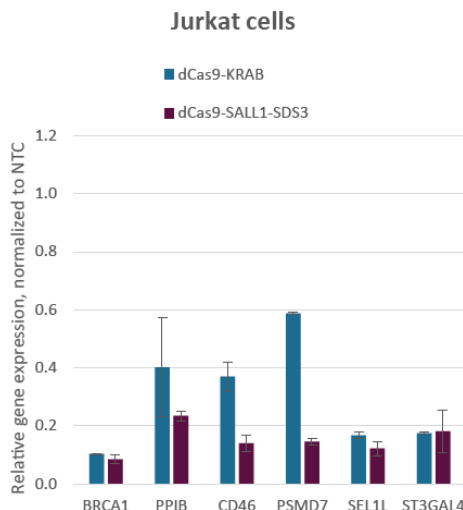
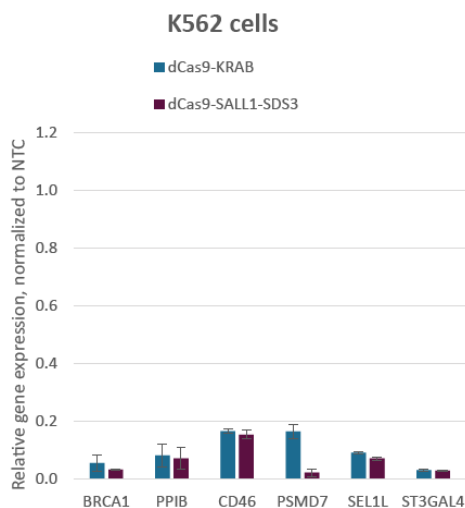
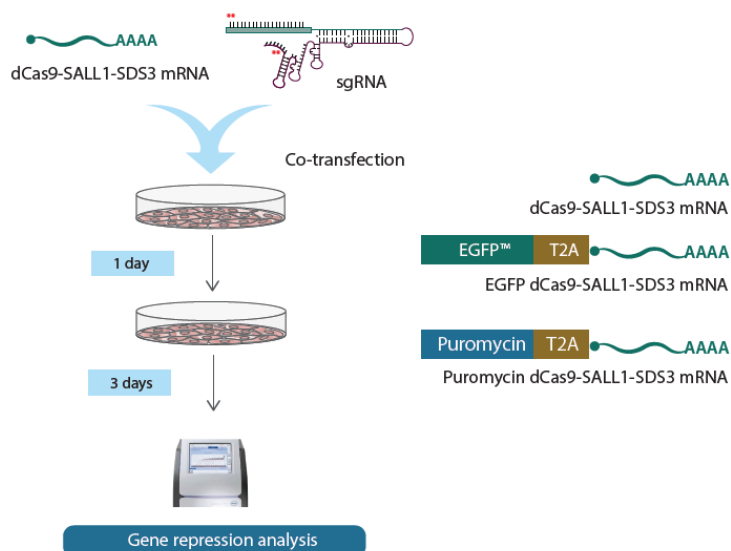


EGFP dCas9-KRAB mRNAまたはEGFP dCas9-SALL1-SDS3 mRNA (2.5 μ g) を、PPIB・PSMD7またはSEL1LをターゲットとするsgRNAの混合物 (25 nM) とともに、DharmaFECT Duoトランスフェクション試薬を使用してHCT-116細胞に共導入しました。導入から24時間後に細胞をトリプシン処理し、FACSを実行して、細胞をGFP陰性 (GFP Neg) と上位10% GFP発現 (上位10%) の2つのカテゴリーに分類しました。24時間後に細胞を回収し、全RNAを単離し、RT-qPCRを使用して相対的な遺伝子発現を測定しました。dCas9-SALL1-SDS3 mRNAを使用した場合、濃縮された集団とソートされていない集団の両方で、すべての遺伝子ターゲットにわたってターゲット遺伝子の発現抑制が増加しました。



dCas9-SALL1-SDS3 mRNAと化学合成sgRNAの同時導入によるCRISPRi遺伝子転写抑制

dCas9-SALL1-SDS3 mRNAは、複雑な細胞モデルにおいてCRISPRによる迅速な遺伝子転写抑制を可能にします。遺伝子転写抑制の強化は、EGFPまたはピューロマイシン耐性マーカーのいずれかを共発現するdCas9-SALL1-SDS3 mRNA試薬を使用して達成できます。Lonza 96ウェルシヤトルシステムを用いて、dCas9-KRAB mRNAまたはdCas9-SALL1-SDS3 mRNA (2μg) とともに、化学合成sgRNAの混合物 (5μM) をK562およびJurkat細胞に導入しました。K562細胞はヌクレオフェクションの48時間後に、Jurkat細胞はヌクレオフェクションの72時間後に回収しました。全RNAを単離し、RT-qPCRを使用して相対的な遺伝子発現を測定しました。



結論

- dCas9-SALL1-SDS3を用いて達成された転写抑制は、dCas9-KRABで達成されたものよりも一貫して大きくなっています。
- CRISPRiによるターゲット遺伝子の強力な発現抑制は、化学的に合成されたsgRNAを使用して達成でき、機能喪失の研究が可能になります。
- 化学合成sgRNAの使用は、複数の遺伝子の同時転写抑制または迅速なCRISPRi研究のためのdCas9-SALL1-SDS3 mRNAとの共導入に理想的です。
- EGFP dCas9-SALL1-SDS3 mRNAの使用により、トランスフェクションが困難な細胞モデルでノックダウンを濃縮することができます。

本資料は英語版Posterを元にした日本語版です。原文はこちらからご覧ください。

<https://horizondiscovery.com/-/media/Files/Horizon/resources/Posters/crispri-synthetic-sgRNA-poster.pdf>

ホライゾン・ディスカバリー株式会社

〒150-0001 東京都渋谷区神宮前4-18-6 イスルギビル #326
Tel: 03-6434-5410
rnai.jp@horizondiscovery.com
www.horizondiscoverykk.com

All trademarks are the property of Horizon Discovery Company unless otherwise specified. ©2021
Horizon Discovery Group Company—All rights reserved.

B047-2104-v1

horizonTM
INSPIRED CELL SOLUTIONS