

■受領No.1351

CRISPR/Cas9 を使った高精度網羅的非コード RNA ノックアウトスクリーニング法



代表研究者

関 元昭

千葉大学医学部附属病院がんゲノムセンター 特任助教

1. 研究目的

近年、超並列シーケンサーを用いたRNAシーケンス技術の進歩とトランスクリプトームデータの蓄積によって、ヒトでは60,000種類近くの長鎖非コードRNA (以下lncRNA) が存在し、組織特異的あるいは腫瘍特異的な発現パターンを示すことが明らかになってきたが、機能の判明したlncRNAはごく一部分に過ぎない。従来lncRNAの機能解析に用いられてきたsiRNAやアンチセンスDNAは、スループットが低いため多種類のlncRNAを網羅的に解析できなかった。また、コーディング遺伝子の網羅的な機能解析に用いられるshRNAライブラリーは、細胞核内で転写調節に関与するlncRNAなどは抑制効果が低かった。近年登場したCRISPR/Cas9システムはORFに数塩基の挿入・欠失を生じさせることでフレームシフトを誘導し、タンパク質の機能欠損を実現している。全遺伝子に対応するガイドRNA (Cas9をゲノム上の標的領域へ誘導するためのRNA) をプールし、レンチウイルスによって一挙に細胞へと導入する遺伝子ノックアウトライブラリーが開発されているが、ORFを持たないlncRNAについては機能を阻害できる可能性が低い。以上のように、これまでに効率的かつゲノムワイドにlncRNAの機能を解析する技術は確立されていないことから、本研究では、効率的かつゲノムワイドにlncRNAをノックアウトする技術の確立を目指した。

2. 研究内容

2.1 2本のガイドRNAによってプロモーター欠損を誘導するlncRNAノックアウト法

ORFを持たないlncRNAのノックアウトを実現するために、lncRNAのプロモーター領域を欠損させることでlncRNAの転写を抑制することを目指した。本研究ではまず、大腸癌細胞株にて発現亢進がみられたlncRNA (BNCRとする) について、転写開始点を含むプロモーター領域に約300bp隔てて2種類のガイドRNAを設計し、Cas9と共に大腸癌細胞株SW480にて強制発現させた。遺伝子発現解析からプロモーター欠損株におけるBNCRのノックアウトが確認され、さらに通常の培養条件およびマウスゼノグラフトモデルにおいてBNCRノックアウトによる増殖抑制効果が観察された。このことから、lncRNAのノックアウト細胞の樹立やその細胞の機能解析において、プロモーター領域の欠損が有効な手段であると確認された。

2.2 2本のガイドRNAを発現するレンチウイルス用プラスミドベクターの開発

プロモーター欠損によるlncRNAのノックアウトスクリーニングをゲノムワイドに行うためには、2種類の配列からなるガイドRNAペアを大規模に合成し、ペアの組み合わせを維持したまま単一のレンチウイルスベクターにクローニングする必要がある。本研究では、DNAマイクロチップ技術に

よるDNA合成長の上限を考慮し、200塩基以下の合成DNAからガイドRNAペアを発現するプラスミドを構築するクローニング方法およびそのためのベクター設計を行った。評価のためにガイドRNAはAzamiGreenとmCherryのORFを標的としたペアとし、AzamiGreenおよびmCherryを恒常的に発現するHEK293細胞をノックアウト効率測定用の細胞株とした。まず、先行研究であるZhuらと同様の設計でガイドRNAペアおよびCas9を発現させ、フローサイトメトリーによって蛍光タンパク質の消失を観察したところ、63~71%のダブルノックアウト効率を示した。次に、DexitらあるいはDatlingerらによってCRISPRによるノックアウトとシングルセルトランスクリプトームを同時に解析する技術Perturb-seqあるいはCROP-seqなどが報告されたことから、このCROP-seqで使われたベクターにガイドRNAペアをエンコードし、ノックアウト効率を測定した。その結果、ダブルノックアウト効率は30~31%と低く、直列に配したガイドRNAペアのうち、特に5'側のガイドRNAの標的蛍光タンパク質がノックアウトされていないことが明らかとなった。細胞からゲノムDNAを回収し、レンチウイルスによって挿入された配列をPCRによって確認したところ、5'側のガイドRNA領域が欠失しており、ガイドRNAペアの両プロモーター間での組換えによって脱落したものと考えられた。そこで、さらにガイドRNAの配置、あるいはウイルスベクターの構成要素である末端反復配列 (LTR) や薬剤耐性マーカー遺伝子の配置について検討を行い、最終的に71~75%のダブルノックアウト効率を示すガイドRNAペア発現用レンチウイルスベクターを開発した。

2.3 ガイドRNAライブラリスクリーニングのための解析パイプラインの構築

ガイドRNAペアライブラリを用いてゲノムワイドなlncRNAのノックアウトスクリーニングを行うにあたり、まず従来型のガイドRNAライブラ

リを用いてノックアウトスクリーニングにおける解析パイプラインの構築を行った。膵臓癌細胞株であるPanc1へ、18,053遺伝子に対する71,090種類のガイドRNAライブラリ (Toronto Knock-Out library version 3; TKO-v3) をレンチウイルス感染によって導入した。これらを薬剤選択によってノックアウト細胞群を樹立し、低酸素、低栄養、低pHのそれぞれの条件下で培養した。各培養条件下で最大38日間に渡って経時的に細胞を回収し、細胞集団に含まれるガイドRNA群について超並列シーケンサーを用いて解析した。まずスクリーニング系の確認として無処理群の細胞、0日目 (刺激開始日) と34日目を比較した。5%FDRを基準とすると、428遺伝子あるいは4遺伝子に対するガイドRNAが培養後34日でそれぞれ減少あるいは増加しており、オントロジー解析からミトコンドリア遺伝子の発現調節に関わる遺伝子群が濃縮されていた。さらに428遺伝子のうち29遺伝子がHartらの報告によるCore Essential Genes 2.0に該当しており、生存必須遺伝子とされる遺伝子群を抽出することができた。次に、無処理群と各刺激処理群とを比較したところ、それぞれの刺激特異的なパスウェイが抽出されこれらの詳細については現在解析中である。以上より、ノックアウトスクリーニングのための解析パイプラインが構築され、lncRNAのノックアウトスクリーニングにおいても適用できると考えられる。

以上より、CRISPRを用いた非コードRNA ノックアウトスクリーニング法の各要素技術について構築することができた。今後、ゲノムのアノテーション情報を元にガイドRNAペアを設計し、本研究で開発した技術群に適用することで、非コードRNAの高精度かつ網羅的な機能解析が実現すると考えられる。

3. 発表 (研究成果の発表)

Masoudy M, Seki M, Yazdanparast R, Yachie N,

Aburatani H. A genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screening reveals SH3D21 as a sensitizer for gemcitabine. (2019) *Scientific Reports* 9, 19188,
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-55893-2>