

CRISPR-Cas9 リボヌクレオタンパク質複合体の切断効率に影響を与える crRNA の配列特徴とそれに基づいた crRNA の活性予測

Key sequence features of CRISPR RNA for CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes and feature-based crRNA activity prediction

1245095 青木 伽奈枝
Kanae Aoki

CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein (RNP) 複合体は、CRISPR RNA (crRNA) と trans-activating crRNA (tracrRNA) がハイブリダイズした guide RNA (gRNA) と Cas9 タンパク質から構成されており、crRNA と相補的な配列に加えて隣接した PAM 配列を持つ DNA を切断する。そのため、crRNA を変更することで任意のゲノム領域を切断することができ、遺伝子のノックアウトやノックインに幅広く活用されている。しかし、CRISPR-Cas9 の切断効率は crRNA の配列に大きく影響を受けるため、その選択がゲノム編集の成功には重要である。従来は crRNA と tracrRNA を融合した single guide RNA (sgRNA) が広く利用されてきたが、in vitro 転写反応により合成される sgRNA は 5'末端が GG となるため標的配列の選択に制限をかけるだけでなく、CRISPR-Cas9 の切断効率を大幅に低下させることが報告された。そのため、そのような制限がない化学合成された gRNA がゲノム編集には有利であり、化学合成が容易になるようにターゲット特異的な crRNA と普遍的な tracrRNA から構成された dual guide RNA (dgRNA) の利用が広がっている。しかし、CRISPR-Cas9 の大部分の研究は sgRNA を用いて進められており、従来の研究で特定された切断効率に影響を与える sgRNA の特徴や、gRNA 設計ツールが dgRNA を構成する crRNA に対して適用できるかは不明である。また、現在の予測ツールの多くは培養細胞を用いたデータに基づいており、それ以外の条件では適用出来ない可能性がある。

そこで、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いて 51 個の crRNA の切断活性を調べた。SpCas9 タンパク質あるいは特異性が向上したバリエーションである High Fidelity SpCas9 タンパク質と dgRNA から構成される RNP 複合体をゼブラフィッシュ胚に顕微注入し、受精後 1 日胚のゲノム DNA を調製した。CRISPR-Cas9 の標的部位をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で増幅し、サンガーシーケンスを行った。得られた波形データより Inference of CRISPR Editing (ICE) を用いて、CRISPR-Cas9 の DNA 切断反応によって誘発された挿入・欠失を分析し、切断効率を求めた。その切断効率と標的配列の関連を k-mer probability logo (kpLogo) プログラムを用いて各位置におけるヌクレオチドの切断効率に応じた出現頻度の統計的有意性を求めたところ、crRNA の切断効率に影響を与える配列特徴が見いだされた。

さらにこの研究では、51 個の crRNA の切断効率より得られた塩基ポジションごとの各塩基の P 値を積算したスコア (CRISPR-kp) が、別の crRNA の活性を予測できるかを調べた。その結果、このスコア値は、新たに設計した 27 個の crRNA の切断効率とよく相関することがわかった (図 1)。既存の予測ツールとの比較では、一般的によく用いられている予測ツールである Doench Rule Set2 や、ゼブラフィッシュ胚で sgRNA を用いたデータに基づく CRISPRscan のスコアよりも予測精度が高かった。CRISPR-kp スコアは、RNP 複合体をゼブラフィッシュ胚に顕微注入することにより得られた配列特徴に基づいているため、RNA の安定性の影響の多くは排除されていると考えられる。実際、gRNA と Cas9 mRNA を顕微注入し、in vivo で RNP 複合体を形成させた場合の切断活性は、CRISPR-kp スコアとは高い相関を示さなかった (図 2)。

また、切断効率が高・中・低の区分より各 2 つの crRNA を選び、RNP 複合体の量が切断効率に及ぼす影響を調べた。その結果、RNP 複合体の量を変更することで、各 crRNA の相対的活性をさらに正確に評価できることがわかった。

本研究で得られた結果は、ゼブラフィッシュ胚における CRISPR-Cas9 を用いたより確実なゲノム編集技術の確立に応用されることが期待される。

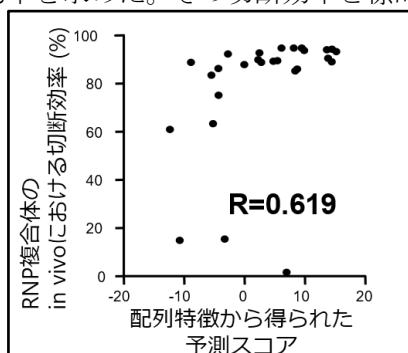


図 1. in vivo で得られた 27crRNA の切断活性と予測スコアとの相関

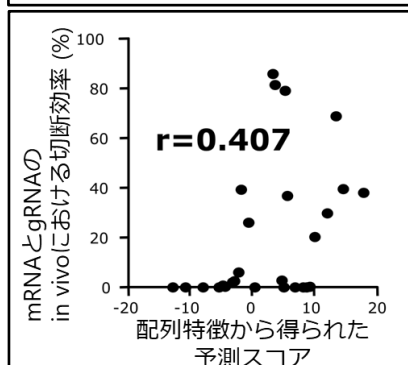


図 2. mRNA Cas9 の切断活性と予測スコアとの相関 (図 1 と同じ 27crRNA のセット)