

98 相同性組換えを誘導するCas9変異体の取得への挑戦	松本 大亮
------------------------------	-------

**【目的】** CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集の方法として、Cas9 による二本鎖切断導入後に、細胞の持つ DNA 修復機構を介して DNA 配列を改変する。この時の修復過程には非相同末端結合 (Nonhomologous End Joining : NHEJ) と相同組換え修復 (Homology Directed Repair : HDR) の 2 つの経路がある。HDR は鋳型 DNA を加えることで修復後に生成する配列を制御でき、より精密なゲノム編集ができる。HDR は細胞周期の S/G2 期に活性が高いことが知られ、NHEJ は細胞周期全体で活性がある。そのため、細胞周期の S/G2 期に DNA 切断を活性化できれば、HDR を介した修復を優先的に引き起こせる。これまでに、細胞周期依存的な Cas9 の活性化による HDR 効率の向上ができることを示した。また、オフターゲット作用も低減できたが、依然として数%のオフターゲット変異が検出された。そこで、これまでに報告されたオフターゲット作用が低い Cas9 変異体に関する網羅的な HDR 効率の評価及び細胞周期依存的な活性化による相乗効果の検討と HDR を引き起こした細胞を回収するスクリーニング系を構築することで HDR を誘発する Cas9 変異体を取得し、HDR を優先的に引き起こすために重要な因子の探索を目的とする。

**【方法】** ヒト胎児腎細胞 (HEK293 細胞) を用いて 10 種類の SpCas9 変異体に関して HDR 効率を評価した。鋳型 DNA として制限酵素 HindIII の認識配列を持つ一本鎖オリゴ DNA (ssODN) を用いた。エピソーマルベクター上に各種 Cas9 変異体を搭載し、リポフェクション法にて HEK293 細胞に導入した。ハイグロマイシンによる選抜後に *EMX1* 遺伝子を標的とした sgRNA をコードするプラスミドと ssODN を導入した。ゲノム抽出後に標的配列周辺を PCR で増幅し、PCR 産物を HindIII 処理することで、HDR 効率を算出した。ジフテリア毒素に対する耐性を指標としたスクリーニング系では、野生型 Cas9 と EGFP を自己切断ペプチド (P2A) で連結させた遺伝子をレンチウイルスベクターに乗せて、HEK293 細胞に感染させた。FACS を用いて EGFP 陽性細胞のみ分取した。この細胞をレポーター細胞として条件を最適化した。レポーター細胞に鋳型 DNA のみをエレクトロポレーション法で導入し、鋳型 DNA によるノックインが起こらない DNA 量を検討した。その後、最適な鋳型 DNA 量に固定した際の最適な HBRGF 標的 gRNA の量を検討した。ノックイン効率は鋳型 DNA 上に赤色蛍光タンパク質 (*mCherry*) 遺伝子が組み込まれるような設計をしたため、蛍光顕微鏡観察及びフローサイトメトリーによって *mCherry* 陽性細胞を評価した。

**【結果】** 10 種類の SpCas9 のうち、3 種類の Cas9 変異体に関して、*EMX1* 遺伝子を標的とした際に HDR 効率が向上することがわかった。また、その中でも SpCas9-HF1 を細胞周期依存的な活性化を行うことで、HDR 効率の向上とオフターゲット作用の低減の両立が可能であることがわかった。スクリーニング系の最適化において、2.5  $\mu\text{g}$  の鋳型 DNA と 1.5  $\mu\text{g}$  の *hHBEGF* 標的 gRNA プラスミドを導入することによって、Cas9 による DNA 二本鎖切断後に HDR を介したノックインが誘発された。エレクトロポレーションによる鋳型 DNA と gRNA の導入から 48 時間後に DT を添加し、細胞死誘導を評価した結果、3 日以上 DT 処理により、HDR 修復後の細胞のみが選抜されることがわかった。さらに、網膜由来の hTERT 不死化細胞株である hTERT RPE-1 細胞を用いてスクリーニングを実施した。その結果、取得された Cas9 変異体において、野生型の Cas9 よりも高い HDR 活性を示した。

細胞周期依存的な CRISPR-Cas9 活性

