

Edit-R CRISPR-Cas9 ゲノム編集アプリケーション概要

Horizon Discovery社では、下記3つのアプリケーションに合わせて、CRISPR-Cas9システムによるゲノム編集に必要なコンポーネントであるガイドRNA(guide RNA)・Cas9ヌクレアーゼ・ドナーDNA(donor DNA)をご用意しています。

➤ 遺伝子ノックアウト

ガイドRNAとCas9ヌクレアーゼを使用して、ターゲット遺伝子の機能をゲノムDNAレベルで欠損させる手法です(A)。この手法は、塩基配列は既知だが機能のよくわかっていない遺伝子を研究する際に用いられます。RNA干渉によるmRNAレベルでの遺伝子ノックダウンでは表現型の違いが検出されない遺伝子の機能研究に有効です。

➤ 遺伝子ノックイン&塩基配列の挿入・欠失・置換

ガイドRNA・Cas9ヌクレアーゼ・ドナーDNAを使用して、ゲノム上のターゲット部位に、タンパク質をコードする遺伝子を導入したり、塩基配列の挿入・欠失・置換を行う手法です(B)。

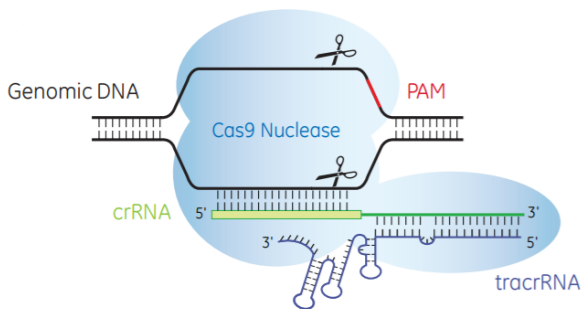
➤ 遺伝子の転写活性化

ガイドRNAと改変Cas9ヌクレアーゼを使用して、ターゲット遺伝子の転写を活性化させる手法です(C)。この手法では、遺伝子過剰発現用プラスミドの使用を回避しつつ、内在性の遺伝子の転写活性化を実現します。RNA干渉による遺伝子ノックダウンや、遺伝子ノックアウトによる機能欠損では表現型の違いが検出されない遺伝子の機能研究に有効です。

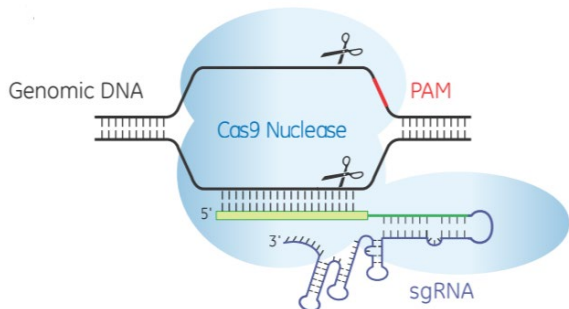
A. CRISPR-Cas9 システムによる遺伝子ノックアウトのメカニズム

Cas9ヌクレアーゼが、ターゲット配列に相補的なガイドRNAと複合体を形成してゲノムDNAのターゲット配列を認識し、PAM配列より上流の二本鎖DNAを切断します。切断されたゲノムは修復機構が働いて再結合しますが、切断されたゲノムの末端は高頻度で欠損あるいは変異します。したがって再結合してもDNAのフレームがシフトし、切断個所の遺伝子がノックアウトされます。ガイドRNAとしてCRISPR RNA (crRNA) : trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) ハイブリッドを用いる方法と、シングルガイドRNA(single guide RNA, sgRNA)を用いる方法があります。

A. crRNA : tracrRNA ハイブリッドを用いる方法



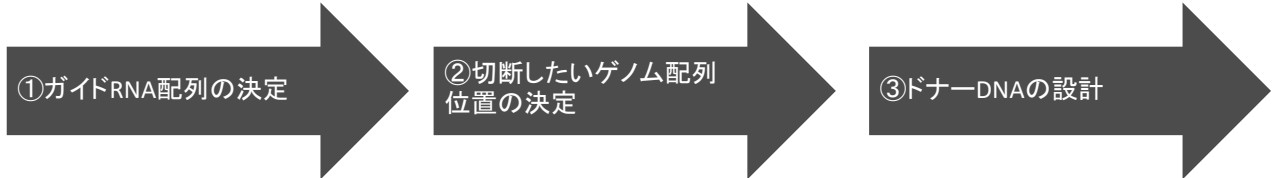
B. sgRNAを用いる方法



B. CRISPR-Cas9 システムによる遺伝子ノックインや塩基配列の挿入・欠失・置換

CRISPR-Cas9による二本鎖切断に続いて起こる相同組み換え修復 (homology-directed repair: HDR) は、特定のゲノム改変位置に隣接した配列に相同性を持つドナーDNA (donor DNA) を必要とする修復経路です。適切に設計されたドナーDNAを使用することで、遺伝子ノックインや塩基配列の挿入・欠失・置換を正確に行うことができます。Horizon Webサイト (<https://horizondiscovery.com/>) のWebツールであるEdit-R HDR Donor Designerの使用により、ヒト・マウス・ラットの遺伝子について、ドナーDNAの設計を直感的で簡便に行うことができます。

ドナーDNA設計ワークフロー



CRISPR Design Tool でカスタム設計。

一本鎖DNAドナーオリゴを使用して塩基配列 (長さ50 nt以下) を挿入・欠失・置換する場合
Edit-R HDR Donor Designer – oligo に、ステップ①で決定したガイドRNA配列を入力し、切断位置および挿入・欠失・置換する配列を設計。

ドナープラスミドを使用して、蛍光レポーター遺伝子あるいは塩基配列 (長さ50 nt以上) を挿入する場合
Edit-R HDR Donor Designer – plasmid に、ステップ①で決定したガイドRNA配列を入力し、挿入位置を決定。

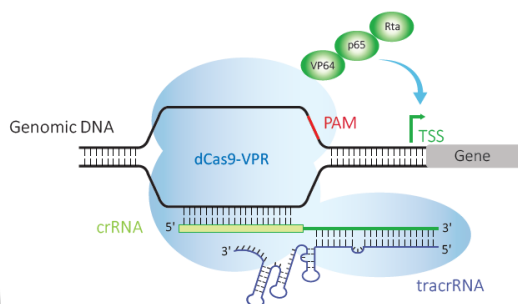
一本鎖DNAドナーオリゴを使用して塩基配列 (長さ50 nt以下) を挿入・欠失・置換する場合
ステップ②で設計した一本鎖DNAドナーオリゴの配列が自動で設計されるので注文へ。

ドナープラスミドを使用して、蛍光レポーター遺伝子あるいは塩基配列 (長さ50 nt以上) を挿入する場合
ステップ②で決定した遺伝子挿入位置を反映した、ドナープラスミド作製時に必要なホモロジーアームPCRプライマーの配列が自動で設計されるので注文へ。

C. CRISPR-Cas9 システムによる遺伝子の転写活性化のメカニズム

Edit-R CRISPR-Cas9システムを使用した遺伝子の転写活性化 (CRISPR activation, CRISPRa) は、野生型のCas9ヌクレアーゼの持つDNA切断活性を欠失させたdead Cas9 (dCas9) に3種類の転写活性化因子 (VP64、p65、Rta) を融合させた改変Cas9ヌクレアーゼ (dCas9-VPR) と、ターゲット遺伝子のプロモーターあるいは転写開始点 (TSS) に近接した領域に配列設計したガイドRNA (guide RNA) を細胞内に導入し、ターゲット遺伝子の転写を活性化する方法です。dCas9-VPRは、ターゲット配列に相補的なCRISPR RNA (crRNA) : trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) ハイブリッドあるいは、シングルガイドRNA (single guide RNA、sgRNA) と複合体を形成してゲノムDNAのターゲット配列に結合します。そして、ターゲット遺伝子の転写開始点に転写活性化因子が作用することで転写を活性化します。

A; crRNA : tracrRNA ハイブリッドを用いる方法



B; sgRNA を用いる方法

