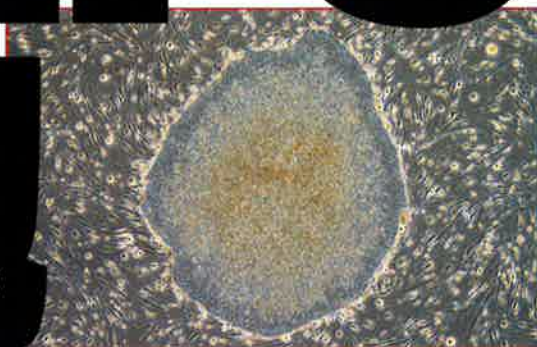


実験医学別冊

ES・iPS

細胞



実験スタンダード

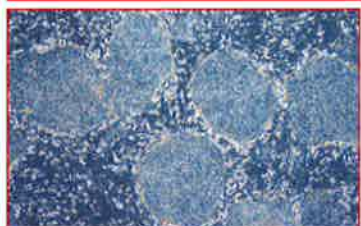
中辻憲夫

Norio Nakatsuji [京都大学物質-細胞統合システム拠点] ◆監修

末盛博文

Hirofumi Suemori [京都大学再生医科学研究所] ◆編集

再生・創薬・疾患研究のプロトコールと臨床応用の必須知識



Standard protocols on ES / iPS cells

 **羊土社**
YODOSHA

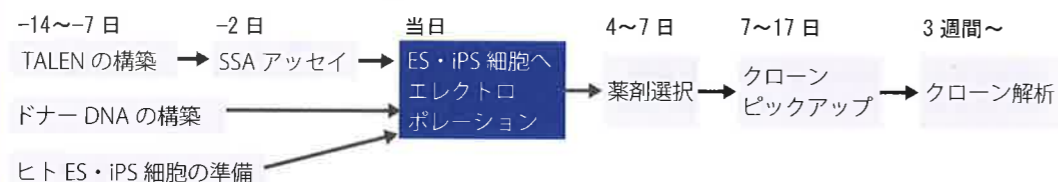
4

遺伝子改変法④ TALENによる遺伝子ターゲティング

李 紅梅, 佐久間哲史, 堀田秋津, 山本 卓

フローチャート

【TALENを用いた遺伝子ターゲティング】



はじめに

近年、遺伝子のノックアウトやノックインに利用可能な人工ヌクレアーゼのZFN (zinc-finger nuclease) やTALEN (transcription activator-like effector nuclease), RNA誘導型ヌクレアーゼのCRISPR/Casシステムが開発された。人工ヌクレアーゼによって任意のDNA領域にDNA二重鎖切断 (DSB) を導入し、非相同末端結合 (NHEJ) や相同組換え (HR) などの修復過程を介して遺伝子改変を行う。NHEJを介した修復では、挿入や欠失が導入されるため、標的遺伝子への変異導入が可能である一方、HRを介した修復では、ドナーベクターを共導入することで、遺伝子ターゲティングが可能である。これらの部位特異的ヌクレアーゼを用いることで、遺伝子改変が困難であった生物や細胞において標的遺伝子を狙った遺伝子改変 (ゲノム編集) が可能となり¹⁾²⁾、ヒトES・iPS細胞での遺伝子改変も競って進められている³⁾⁴⁾。

本項では、ターゲット部位設計の自由度が高く、配列認識特異性が高いTALENに焦点を合わせる。われわれが行っているヒト培養細胞でのシングルストランドアニーリング (SSA) アッセイ (図1) による組換え活性評価法と、ドナーベクターを用いたiPS細胞での遺伝子ターゲティング法について概説する。SSAアッセイによってTALENの活性を事前に確認することが、実験を効率的に進めるうえで重要である。

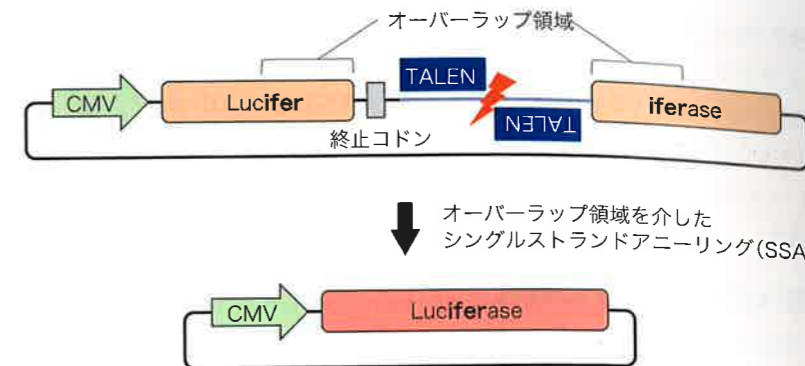


図1 SSAアッセイの概要

SSAアッセイでは、重複する配列をもたせて分断したルシフェラーゼ遺伝子配列の間にTALEN認識配列を挿入したレポーターベクターを構築し、TALEN発現ベクターとともに細胞に導入する。TALENによる切断が起こると、SSAによって分断したルシフェラーゼ遺伝子が修復し、活性が回復する。よって、ルシフェラーゼの化学発光の強度を測定することで、TALENの切断活性を算出することができる。

準備

1. プラスミドベクターの構築

- Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit 2.0 (Addgene)
TALEN発現ベクターの作製キット。
- pGL4-SSAベクター
Yamamoto Lab TALEN Accessory Pack (Addgene) に含まれる。
- pRL-CMV (プロメガ社, #E2261)
リファレンス用のウミシイタケルシフェラーゼ (Rluc) 発現ベクター。
- ドナーベクターの作製に必要なベクター類*1
・ Bsa I-HF (New England Biolabs社, #R3535S)
・ Kpn I (タカラバイオ社, #1068A)
・ In-Fusion® HD Cloning Kit (タカラバイオ社, #639648)
- クローニング試薬, PCR試薬, 各種制限酵素

2. SSAアッセイ

- HEK293T細胞 (ヒト胎児腎細胞) (ATCC, #CRL-11268)
- ポリ-L-リジンコートした不透明タイプの96ウェルプレート (イワキ社, #4860-040)
- 不透明タイプの96ウェルプレート
- D-MEM (ライフテクノロジーズ社, #11965-092)

*1 TALENの作製法については、参考文献1, 2などを参照されたい。ターゲットローカス1カ所につき2つ以上のTALENペアの作製を推奨する。ヒトES・iPS細胞でTALENを発現させる場合、CAGあるいはEF1αプロモーターを使用すべきであり、CMVプロモーターは不適である。なおSSAアッセイに用いるHEK293T細胞では、CAG/EF1α/CMVプロモーターのいずれも効率的に発現する。

- Opti-MEM (ライフテクノロジーズ社, #31985062)
- FBS (ライフテクノロジーズ社, #26140079)
- Lipofectamine® LTX (ライフテクノロジーズ社, #15338-500)
- Dual-Glo™ Luciferase Assay System (プロメガ社, #E2920)
ホタルルシフェラーゼ (Fluc) とウミシイタケルシフェラーゼ (Rluc) の基質を含む。

3. iPS細胞へのTALENの導入

- NEPA21 エレクトロポレーター (ネッパジーン社)
ヒト iPS 細胞への遺伝子導入は、FuGENE HD (プロメガ社) などを用いたりポフェクション法や、Neon (ライフテクノロジーズ社)、Nucleofector (ロンザ社) などのエレクトロポレーターも使用可能であるが、導入効率および導入後の生存率の点で NEPA21 が優れている。
- 2 mm gap キュベット (ネッパジーン社, #EC-002S)
- Y-27632 (ナカライテスク社)
ROCK 阻害剤。
- ヒト iPS 細胞培地 (他項参照)
- ヒト iPS 細胞剥離剤
TrypLE Select (ライフテクノロジーズ社), CTK 溶液, トリプシン/EDTA 溶液
- 薬剤耐性フィーダー細胞
ネオマイシン耐性 SNL 細胞, 四種薬剤耐性マウス*2由来マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) など。
- T7 Endonuclease I (New England Biolabs 社, #M0302S)
CEL-I (SURVEYOR Nuclease, Transgenomic 社) でも代用できる。

プロトコール

1. TALENの切断活性の評価法 (SSA アッセイ)

SSA レポーターベクターの作製

① pGL4-SSA ベクターを、Bsa I -HF を用いて 37°C で 1 晩消化する



② アガロースゲル電気泳動し、約 5.6 kb のバンドを切り出す。ゲル断片をマイクロチューブに回収し、DNA を抽出する



Regarding iPSC transfection, the lipofection method such as FuGENE, etc. or the electroporation method such as Neon, Nucleofector, etc. is effective, but using the NEPA21 electroporator is the best choice in respect of transfection efficiency and viability.

*2 Tg (DR4) 1Jae/J, ジャクソン研究所。ピューロマイシン、ハイグロマイシン、G418 と 6-チオグアニンの 4 種薬剤耐性のトランスジェニックマウスである。

③ TALEN の標的配列を含む DNA 断片を、合成オリゴ 2 本のアニーリング (A), または PCR 増幅 (B) によって作製する



④ DNA 断片の作製方法に応じた方法で、上記の Bsa I -HF 処理した pGL4-SSA ベクターに挿入する

④-A 合成オリゴを用いて挿入する場合

sense 鎖を 5'-gtcggat (標的配列の sense 鎖) aggt-3' とし、antisense 鎖を 5'-cggtacct (標的配列の antisense 鎖) atc-3' とする。これらをアニーリングして上記の線状化ベクターにライゲーションする。

④-B PCR 増幅して挿入する場合

Forward プライマーの 5' 側に ctaggtctctgtcggat を、Reverse プライマーの 5' 側に cctaggtctcacggtacct を、それぞれ付加する。PCR 産物を線状化した pGL4-SSA ベクターと混合し、In-Fusion® HD Cloning Kit で 50°C、15 分処理する。



⑤ 得られたプラスミドを Kpn I 処理し、アガロースゲル電気泳動を行う

うまく断片が挿入されていれば、約 3.8 kb と約 1.8 kb の 2 本のバンドがみられるはずである*1。

HEK293T 細胞へのトランスフェクション

① 100 mm ディッシュ 1 枚分の HEK293T 細胞を、70~80% コンフルエントになるように準備しておく*2



② 作製した SSA レポーターベクターと、pRL-CMV、および左右の TALEN 発現ベクターを混合した DNA 溶液を準備しておく*3



③ ポリ-L-リジンコート 96 ウェルプレートの各ウェルへ、Opti-MEM を 25 μL ずつ必要サンプル分加える*4



④ ② で準備した DNA 溶液を、③ で Opti-MEM を分注したウェルに加え、混合する



⑤ Lipofectamine® LTX を希釈するための Opti-MEM を、マイクロチューブに分注する*5



*1 シーケンスを確認する場合は、制限酵素 Nar I で切断してゲルを切り出し、精製した DNA 断片を鋳型として用いる。

*2 本プロトコールでは、前日にプレートへ細胞を播種しておく必要はない。

*3 ウェルあたり、SSA レポーターが 100 ng、pRL-CMV が 20 ng、TALEN 発現ベクターがそれぞれ 200 ng ずつとなるように調整するとよい。ここからの作業はクリーンベンチ内で行う。Opti-MEM は、血清を添加していない D-MEM でも代用できる。プレートはポリ-L-リジンコートでないものも使用可能だが、コート品を使用すればより良好な結果が得られる。

*4 ウェルあたり 25 μL 分の Opti-MEM が必要となるため、(必要サンプル数) × 25 μL を分注すればよい。ただし Lipofectamine® LTX は希釈すると時間が経つごとに活性が低下していくため、一度に希釈するのは 20 サンプル分程度とする。サンプル数がこれより多い場合は、複数のマイクロチューブに分注する。

- ⑥ 分注したOpti-MEMに、0.7 μ L/wellとなるようにLipofectoamine[®] LTXを加えてよく混ぜ、素早く各ウェルへ25 μ Lずつ加えて混合する*6
この作業を必要本数分繰り返し、そのまま室温でインキュベートする。
- ⑦ 100 mmディッシュの培地をアスピレーターで除き、15%のFBSを含むD-MEMを10 mL加え、電動ピペッターを用いてディッシュ上でピペティングする*7
- ⑧ 細胞数をカウントし、6 \times 10⁵ cells/mLに調整する
- ⑨ 最初のウェルにLipofectoamine[®] LTXを加えてから30分が経過した後に、準備した細胞懸濁液を100 μ Lずつ各ウェルへ加える*8
- ⑩ 37°CのCO₂インキュベーターで24時間培養する
- ### ルシフェラーゼアッセイ
- ① プレート回収する30分前に、あらかじめ凍結保存しておいたFlucの基質溶液を必要量取り出し、室温の水に浮かべて溶かしておく*9
- ② 24時間培養したプレートを取り出し、各ウェルの培地を75 μ Lずつ除く*10
- ③ 融解させたFlucの基質溶液を75 μ Lずつ加える
最後のウェルに基質を加え終えた時点で時間の計測を開始する。
- ④ Rlucの濃縮基質溶液とバッファーとを1:100で混合し、必要量(75 μ L/well)のRluc基質を調製する*11
- ⑤ Flucの基質を各ウェルに加えてから10分以上経過した後に、プレートリーダーを用いて発光強度を測定する
- ⑥ Rlucの基質溶液を75 μ Lずつ各ウェルへ加え、10分以上経過した後に発光強度を測定する*12

- *6 最初のウェルにLipofectoamine[®] LTXを加えた時点で時間の計測を始めるとよい。この後30分が経過するまでの間に細胞を準備する必要がある。間に合わないようであれば、あらかじめ下記⑦⑧の手順で調製した細胞懸濁液を準備してから、⑨以降の操作を行うとよい。
- *7 HEK293Tは弱接着性であるため、トリプシン処理をせずとも機械的なピペティングで容易に細胞を剥がすことができる。ただし細胞の凝集を解くために、ピペティングを何度も繰り返す必要がある。
- *8 希釈したLipofectoamine[®] LTXをウェルへ加えたスピードと同程度の時間を掛けて細胞懸濁液を加えていくと、サンプル間でのインキュベーション時間のばらつきがなくなり、安定した結果が得られる。
- *9 Dual-Glo[™] Luciferase Assay Systemに含まれるFlucの基質は、あらかじめ500 μ L~1 mL程度ずつマイクロチューブに分注し、-80°Cで保存しておくとうよい。-20°Cでは長期保存に耐えられないため注意が必要である。
- *10 各ウェルには150 μ Lの培地が入っており、ここで75 μ Lを除くと75 μ Lの培地が残る。ここに直接等量のFluc基質を加える。
- *11 Rlucの基質溶液は、必ず用事調製とする。
- *12 活性の評価の仕方は実験例で詳しく述べる。

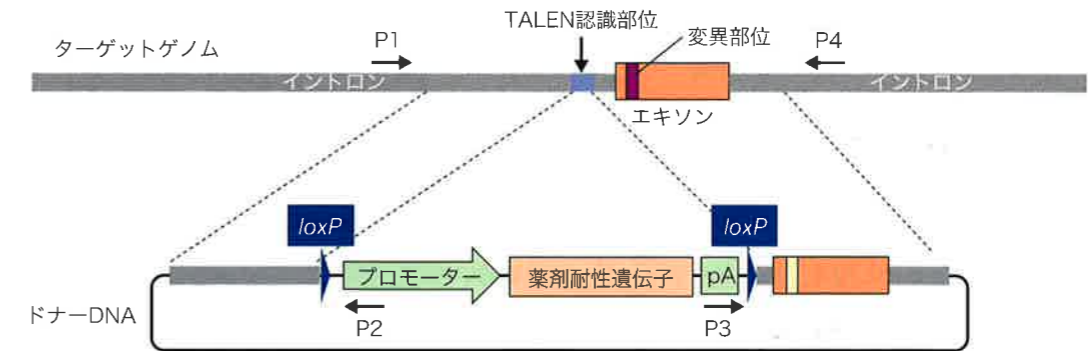


図2 ドナーベクターのデザイン例
ある遺伝子 (iPS細胞では発現していない) のエクソン上の変異を修復する場合を例に示す。TALEN認識部位は、修復部位に近い (< 100bp) 方が望ましい。相同アームの長さは0.8~1.0kb程度で充分である。ドナーDNAはTALEN結合配列を含まないように注意。含む場合は、塩基配列に変異を導入する。薬剤耐性遺伝子はピューロマイシン耐性またはネオマイシン耐性を推奨する。プロモーターはCAGまたはEF1 α プロモーターが望ましい。薬剤選択カセットは後にCre処理で除去できるように、loxP配列で挟んでおく。薬剤選択カセットは逆向きでも構わない

2. iPS細胞へのTALEN導入

ドナーベクターの構築

ドナーベクターのデザインについては図2を参照。はじめに薬剤選択カセットをもつ発現プラスミドベクターを準備し、その前後にPCR増幅した相同アーム配列をIn-Fusion反応で挿入すると簡単に構築できる。

NEPA21 エレクトロポレーション

筆者らは前述の通りNEPA21によるエレクトロポレーションを行っている(図3A)。複数のパルス波形を組み合わせることで遺伝子導入するのが特徴である(図3B)。

- ① ヒトiPS細胞培養培地中へY-27632を最終濃度10 μ Mで添加し、CO₂インキュベーター内で1時間以上培養する
- ② 別に用意した6穴プレートのフィーダー細胞に、Y-27632を10 μ M含むヒトiPS細胞培地を添加し、37°CのCO₂インキュベーターへ入れて培地を保温しておく
- ③ 60 mmディッシュのヒトiPS細胞を5 mL PBSで2回洗浄する

In-Fusion反応: In-Fusion反応は、両末端に15bp程度の相同配列をもつクローニングする方法である。たせることにより、目的断片のPCR産物をベクターに簡便かつ迅速に

- ④ CTK 溶液を 0.5 mL 添加し、細胞全体に行き渡らせてから、37°C で 1~2 分ほどインキュベートする *13
- ⑤ ディッシュを揺らし、フィーダー細胞が剥がれてきたら CTK 溶液ごとフィーダー細胞を吸引除去する
- ⑥ PBS を 5 mL 加え、なるべくフィーダー細胞を洗い流し吸引除去する *14
- ⑦ TrypLE Select (または 0.25% トリプシン/EDTA) を 0.5 mL 加え、37°C で 3~5 分処理し、ヒト iPS 細胞コロニーを剥がす *15
5 分でもコロニーがまだ接着していたら、さらに 2~3 分処理してから剥がす。
- ⑧ ヒト iPS 細胞培地 (+Y-27632) を 2 mL ほど加え、ピペティングで単細胞までバラバラにする *16
- ⑨ 遠心管に移し、室温で 800 rpm (120 G)、5 分間遠心する
- ⑩ 上清を捨て、細胞ペレットに Opti-MEM 培地を 5~10 mL 加え懸濁し、再び室温で 800 rpm (120 G)、5 分間遠心する
- ⑪ Opti-MEM 培地を適量 (~1 mL) 加えて懸濁し、細胞数を計測する
- ⑫ 4 条件分として、 4.0×10^6 細胞を新しい 1.5 mL に移し、遠心した細胞ペレットに Opti-MEM を 360 μ L 加えて懸濁する *17

< NEPA21 の基本パルス条件 >

表 1 にわれわれが主に使用している条件を示すが、事前に各自の細胞株において条件検討するのが望ましい。一般的に、穿孔パルスの電圧やパルス幅 (表中 ■ 部分) が高いほど導入効率が上がるが、細胞の生存率は下がる (図 3C)。一度条件を決めた後は、基本的に同じ電圧条件で導入可能である。

- *13 iPS 細胞コロニーが剥れないように、インキュベーション温度 (37°C または室温) と時間 (1~5 分) を調整する。
- *14 フィーダー細胞が混入すると DNA を吸収し、iPS 細胞への導入効率が下がる。
- *15 トリプシン/EDTA の方が剥離しやすい。Accutase または TrypLE Express も使用可能であり、株の接着強度により使い分ける。
- *16 細胞塊が残ると塊内部へは遺伝子導入されない。どうしても大きめの細胞塊が残る場合は、40~75 μ m ポアサイズの Cell Strainer やナイロンメッシュに通して細胞塊を除去してもよい。
- *17 キュベットあたり、 1.0×10^8 cells/90 μ L。

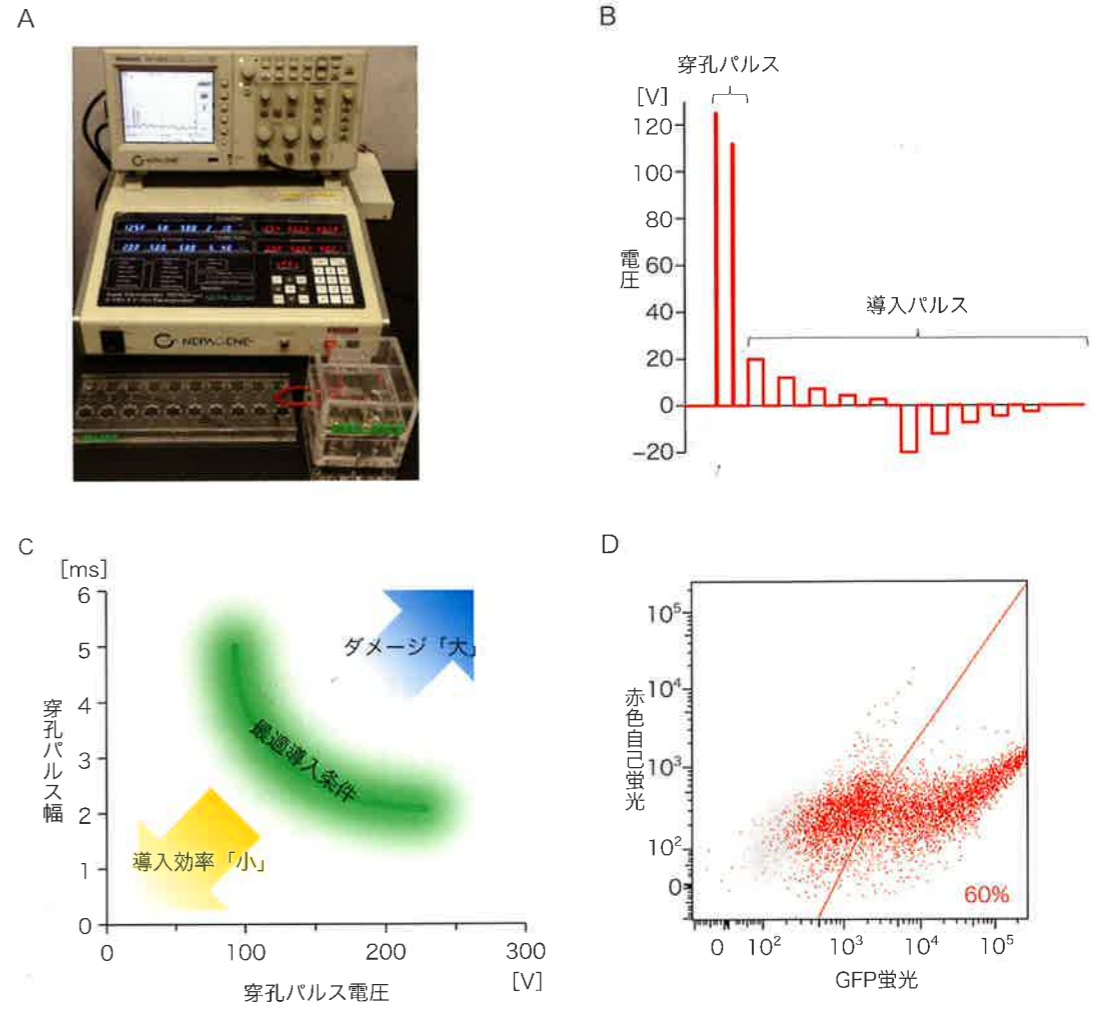


図 3 NEPA21 によるヒト ES・iPS 細胞への遺伝子導入
A) ヒト ES・iPS 細胞へ遺伝子導入する際に使用する NEPA21 エレクトロポレーター。B) NEPA21 エレクトロポレーターは穿孔パルスと導入パルスの二段構成で、かつパルス電圧が徐々に減衰設定可能であるのが特徴。C) 穿孔パルス電圧とパルス幅条件のイメージ図。一般的に、電圧とパルス幅を高くするほど導入効率は上がるが、細胞へのダメージも大きくなる。細胞株ごとに、最大の導入効率で、かつ許容範囲の細胞毒性を持つ条件を見つけることが重要である。D) GFP 発現プラスミドを導入した場合の一例

表 1 パルス条件

	電圧 (V)	パルス幅 (ms)	パルス間隔 (ms)	回数	減衰率 (%)	極性
穿孔パルス (Poring Pulse)	125	5	50	2	10	+
導入パルス (Transfer Pulse)	20	50	50	5	40	+/-

- ⑬ 1.5 mL チューブ 4 本に表 2 の要領でプラスミド溶液を 10 μ L ずつ用意し、そこに細胞懸濁液を 90 μ L 添加しよく混ぜる
ドナー DNA の直線化は必要ないようである。

表 2 分注例

No.	導入プラスミド DNA	DNA 重量
# 1	EGFP 発現ベクター	10 μ g
# 2	TALEN 発現ベクター Left TALEN 発現ベクター Right	5 μ g 5 μ g
# 3	TALEN 発現ベクター Left TALEN 発現ベクター Right ドナー DNA	5 μ g 5 μ g 5 μ g
# 4	バルスなしコントロール	-

- ⑭ 2 mm gap のキュベットに DNA と細胞の混合液 100 μ L を添加する *18

キュベットは室温がよい。

- ⑮ キュベット電極用チャンバーにキュベットをセットし、電気パルスを加える

- ⑯ 抵抗値をメモする

通常は 0.030 ~ 0.060 k Ω 付近。

- ⑰ ただちにフィーダー細胞と一緒に温めておいた iPS 細胞培地 (+ Y-27632) を 1 mL ほどキュベット内に添加し、細胞を吸い出して準備しておいたフィーダープレートに手早く播く

キュベット付属の先細ピペットを使用してもよい。⑭~⑰の操作を各キュベットで繰り返す。

- ⑱ 翌日または翌々日に培地交換

Y-27632 は 2 ~ 3 日間添加し続けた方が細胞の生存率がよい。表 2 # 1 のウェルを蛍光顕微鏡またはフローサイトメーターで観察し、EGFP の発現陽性細胞の割合を確認する。

薬剤選択および限界希釈による株選択

- ① エレクトロポレーションした細胞は、4 ~ 7 日間培地交換をしながら培養する (選択薬剤なし)

- ② iPS 細胞のコロニーが充分大きくなりセミコンフルエントに達したら、CTK 処理により細胞を継代する *19

このとき、それぞれのウェルの半分の細胞は、一部をペレットにして回収し、ゲノム DNA を抽出する。約半分の細胞を継代し、表 2 # 2 および # 3 のウェルは適切な薬剤選択を開始する。

- ③ 抽出したゲノム DNA において、# 2 のウェルは TALEN 認識サイトを含む領域を PCR 増幅する

PCR 産物を T7 Endonuclease I 処理 (T7EI アッセイ) もしくは TALEN のスパーサー直下にある制限酵素処理をすることで、切断活性を評価する。

- ④ ② で抽出したゲノム DNA について、# 3 のウェルは図 2 に示した 5' 側 (P1 と P2) および 3' 側 (P3 と P4) のプライマーで PCR を行い、バルク状態でドナー DNA のノックイン有無を確認する

ドナーなしのゲノムをネガティブコントロールとして用いる。

- ⑤ ② で薬剤選択を行う細胞については、1 ~ 2 日おきに選択薬剤を添加した培地交換を行い、4 ~ 7 日ほどで # 2 のウェルでは細胞が死滅し、# 3 のウェルではコロニーが回復することを確認する

- ⑥ 薬剤選択で生き残った細胞を Y-27632 処理後、CTK およびトリプシン溶液によって単細胞までバラバラにする (NEPA エレクトロポレーション③~⑤を参照)

- ⑦ フィーダー細胞を準備した 100 mm ディッシュ 3 枚に、それぞれ 100 個、200 個および 400 個程度の細胞を播種し、単細胞由来のコロニーを取得する

- ⑧ コロニーのコロニーが大きくなった時点でコロニーの一部を掻き取り、ゲノム DNA を回収し⁵⁾、④と同様の PCR でドナーがノックインされたコロニーを選択する

トランスフェクションなしのゲノムをネガティブコントロールとして用いる。

- ⑨ 5' 側および 3' 側の両方で目的サイズに PCR 増幅がみられたコロニーに対して、P1 プライマーおよび P4 プライマー (図 2) を用いて PCR を行い、ホモかヘテロかを検定する

*19 細胞を一部凍結保存してもよい。

*18 泡が入らないように注意。

この際、目的サイズ外のバンドがみられた場合や、野生型のバンド以外がみられない場合は、擬陽性である可能性が高い。

⑩ 選別した複数クローンにおいて、必要に応じてサザンプロットなどの解析を行う

⑪ 薬剤選択カセットを除去するためには、Cre発現ベクターをNEPA21にて導入し、一過性に発現させる

⑫ ⑥～⑦を繰り返し、P1、P4プライマーなどを用いて薬剤選択カセットが除去されたことを確認する

→TALENがiPS細胞内で充分機能していない可能性があり、CEL-IアッセイやT7E Iアッセイなどで確認する

→検定PCRの条件や、抽出したゲノムの品質を確認する
他のプライマーセットでもPCRを行う。

→遺伝子座やドナーのデザインによっては、100株以上スクリーニングが必要な場合もある

TALENとドナーの導入から繰り返し、なるべく複数クローンを取得する。

実験例

1. SSAアッセイ

ある遺伝子Xに対するTALENの発現ベクターを3種類構築し、SSAアッセイによる活性評価を行った(図4)。活性スコアはFluc/Rlucで算出するが、この値はトランスフェクション効率や細胞の増殖速度、基質の新鮮さなどのさまざまな条件の違いによって、同じTALENを用いても実験ごとに値が変わりうるため、絶対値として評価することはできない。よって、SSAアッセイを行う際には、必ずポジティブコントロールのTALENを加え、ポジティブコントロールの活性に対する相対活性として評価する必要がある。われわれは、参考文

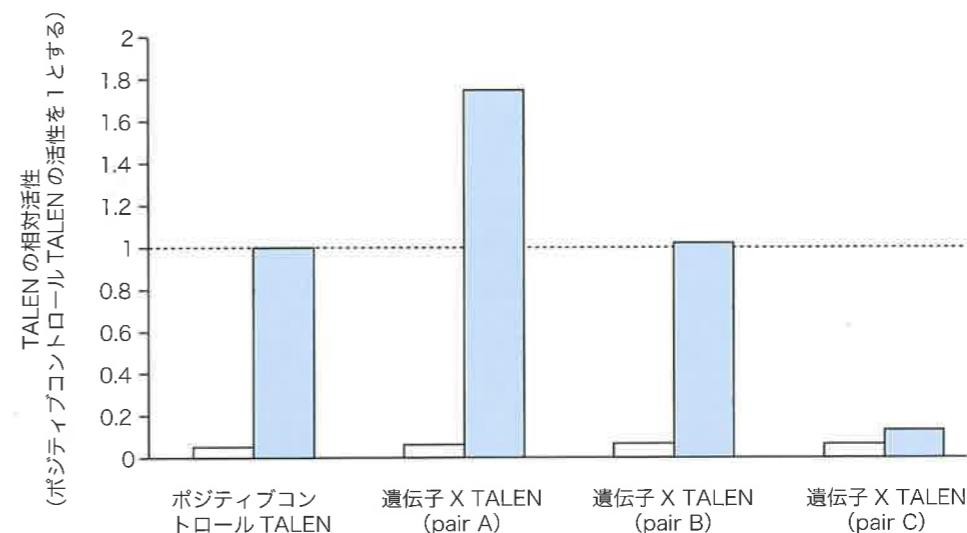


図4 SSAアッセイの結果の例

ポジティブコントロールの活性を1としたときの相対活性値を縦軸に示す。青いバーが目的の活性値であり、白いバーは、導入したTALENとは無関係の標的配列を挿入したレポーターを用いた場合の活性を示している

！トラブルへの対応

■ 遺伝子導入効率が悪い

→導入前のiPS細胞が適切に培養されているかを確認する

綺麗に未分化状態で維持された対数増殖期のiPS細胞で、コロニーが充分形成されるときに遺伝子導入を行う。

→パルス条件が弱すぎる場合は再検討する

→プラスミドDNAをエンドトキシンフリーのカラムキットで精製し、高濃度(2~10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)に調整したものを希釈(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)して使用する

→フィーダー細胞をきちんと除去し、場合によってはフィーダーフリーの条件で継代してから遺伝子導入を行う

■ 遺伝子導入後に細胞が死滅してしまう

→パルス条件が強すぎる場合は再検討する

→導入後に播種するフィーダー細胞の質が悪い

→ROCK阻害剤処理が不十分

■ 薬剤選択を行うと細胞が死滅してしまう

→ドナー薬剤選択カセットが充分発現していない

ドナーのみを導入して薬剤耐性を獲得するか確認する。

→選択薬剤濃度および投与期間を再検討する

→フィーダー細胞も死滅する場合は、薬剤耐性フィーダー細胞を使用する

■ ノックインクローンが得られない

→ドナー配列およびTALENの結合配列をBlastプログラムなどでサーチし、ターゲット部位への特異性を確認する

献2で作製した*HPRT1_B* TALEN-NCをポジティブコントロールとして使用しており、この活性を上回るTALENであれば、iPS細胞でのゲノム編集に使用可能と判断している。図4のケースでは、3ペア作製したうちのペアAとBが、十分な活性を示している。

2. iPS細胞での遺伝子ターゲティング

ヒトiPS細胞への遺伝子導入結果は、GFPの陽性率および生存率で評価する。条件が整っていれば、60～80%の細胞がGFP陽性となり（図3D）、4～5日後には十分なコロニー形成が観察される。iPS細胞がトランスフェクションのダメージから回復するのを待って、薬剤選択を開始する。薬剤によって使用濃度が異なるので、あらかじめ予備実験を行うこと。われわれは、ピューロマイシンの場合0.5～1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ハイグロマイシンの場合20～50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、G418の場合100～400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ といった濃度を使用するが多い。薬剤選択後、ターゲット遺伝子座に応じて、十分なコロニー（十数～百個以上）が生存することを確認する。次に限界希釈を行い、単細胞由来コロニーを形成し、ゲノムDNAからPCRでドナーの組換えを検定する。適切なドナーデザイン、高活性のTALENペア、高効率での遺伝子導入といった条件が整えば、90%近い割合でドナーのノックインが観察されることもある。ただし、一定割合でドナー配列が一部組換わっている株も存在するので、サザンブロットやシーケンスによる確認を推奨する。

おわりに

TALENやCRISPR/Casシステムを利用したゲノム編集技術の登場により、狙った部位にDNA損傷を誘導できるようになり、ヒトES/iPS細胞などでのゲノム編集実験の応用範囲が急速に広がっている³⁾⁴⁾。一方、これらゲノム編集の際に、予期せぬ部位に変異が導入される可能性も懸念されており、再生医療での利用を視野に入れた研究では慎重に検討する必要がある。特に、CRISPR/Casシステムは類似配列へも変異を導入してしまうことがヒト培養細胞で示されており、注意が必要である⁵⁾。

いずれにせよ今後、ゲノム編集技術は必須の技術としてますます普及していくと思われる。本項を足がかりに基本技術を習得し、さまざまな研究に役立てていただきたい。

◆ 文献

- 1) Cermak, T. et al. : *Nucleic Acids Res.*, 39: e82, 2011
- 2) Sakuma, T. et al. : *Genes Cells*, 18: 315-326, 2013
- 3) Hockemeyer, D. et al. : *Nat. Biotechnol.*, 29: 731-734, 2011
- 4) Ding, Q. et al. : *Cell Stem Cell*, 12: 238-251, 2013
- 5) Yusa, K. : *Nat. Protocol.*, 8: 2061-2078, 2013
- 6) Fu, Y. et al. : *Nat. Biotechnol.*, 31: 822-826, 2013

V 創薬スクリーニング