

CRISPR / Cas9を用いたMC3T3-E1細胞における *Gpr81*遺伝子のノックアウト

前田豊信¹ 鈴木厚子¹ 湯澤 仁¹
馬場 優² 加藤靖正¹

Gpr81 Gene Knockout in MC3T3-E1 Cells by Using CRISPR / Cas9 System

Toyonobu MAEDA¹, Atsuko SUZUKI¹, Satoshi YUZAWA¹
Yuh BABA² and Yasumasa KATO¹

We used CRISPR/Cas9 System (PX458) to obtain a mouse osteoblast cell line (MC3T3-E1) with G protein-coupled receptor 81 (*Gpr81/Hcar1*) gene knocked out. CRISPR/Cas9 expression vector for *Gpr81* gene was constructed by the Golden Gate modification method. The mouse *Gpr81* gene sits on chromosome 5. Double-strand breaks were introduced to the chromosome to promote non-homologous end-joining. We selected two clones which showed significant attenuation of the gene expression. We found a 4 base-deficient mutation in the guide RNA target sequence of these cell lines, and a point-mutation nearby the proto-spacer adjacent motif (PAM). These mutations induced “frame-shift” and caused the coding sequence to shorten to correspond to 24 amino acids. GPR81 protein expression in the whole cell lysates was analyzed by Western blotting, which indicated that the expression of GPR81 protein in the knocked-out cell clone was significantly low compared with the wild type ($3.27 \pm 1.01\%$ to the wild type). CRISPR/Cas9 was able to be constructed in a few hours and it successfully knocked down the *Gpr81* gene in MC3T3-E1 cells. Thus, CRISPR/Cas9 system can be considered to be a very efficient tool for knocking out genes of interest in osteoblasts.

Key words : CRISPR / Cas9, GPR81, knockout

緒 言

DNAの二本鎖切断(double-strand break ; DSB)は、非相同末端組替え(non-homologous end-joining ; NHEJ)や相同組換え(homologous recombination ; HR)によって修復を受ける。このうち、主にDSB修復を担うNHEJは細胞周期非依存的であり、かつ数塩基程度のエラーが

連続的に挿入されやすい。近年、これに伴うフレームシフト変異などを用いると、ゲノム改変が行われてきている¹⁾。1996年にZFN(zinc-finger nuclease)が報告されたが²⁾、ジンクフィンガーモジュールの干渉により塩基認識特性が変化するという問題があり、ゲノム編集には使用が大変難しかった³⁾。しかし、TALE(transcription activator-like effector)は塩基認識干渉がなく、ZFNと同じ

受付：平成26年11月11日，受理：平成27年1月8日
奥羽大学歯学部口腔機能分子生物学講座¹
奥羽大学歯学部総合臨床医学講座²

Department of Oral Function and Molecular Biology,
Ohu University School of Dentistry¹
Department of General Clinical Medicine, Ohu
University School of Dentistry²

FokI を連結させた TALE ヌクレアーゼは、作製手間が煩雑ではあるが、非常に有効なゲノム編集ツールとして2010年に報告⁴⁾されて以来多く用いられている。2013年に報告された CRISPR / Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated protein 9) は、Cas9による切断の特異性をガイド RNA (gRNA) によって規定させるために、DSBを発生させることが可能であり、TALE ヌクレアーゼに比較して数十分の1以下の手間でベクターの構築が可能のために大変容易で、ゲノム編集手法としての有効性が期待されている。

本研究では、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1細胞に CRISPR / Cas9を用いて5番染色体上に3285塩基でコードされる Hcar1 (*Gpr81* 領域遺伝子) を編集し、ノックダウン細胞株を樹立したのでここに報告する。

材料および方法

1. CRISPR/Cas9 の設計

hU6プロモーター下でgRNAを発現し、CBhプロモーター下で2A-GFP融合hCas9酵素を共発現するプラスミドである、pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) を addgene (MA, USA) から分譲を受けた (図1)。このプラスミドは *BbsI* サイトに挿入する塩基配列により標的を特定するものである⁵⁾。標的配列は、NCBI Gene ID 243270と GenBank アクセッション番号 NM_175520から、PAM (proto-spacer adjacent motif) 配列を+428~+430の“ggg”とし、標的ゲノム配列を+408~+427の20塩基とした。制限サイトに適合するように、5'-cac gcg tcc aac tgc tat gga caa c-3', 5'-aaa cgt tgt cca tag cag ttg gag c-3'の配列を持つオリゴヌクレオチドの構築を日本遺伝子研究所 (仙台) に依頼した。

2. CRISPR/Cas9 発現ベクターの構築

プラスミドの作成には Golden Gate の変法を用いて行った。すなわち、2種類の合成オリゴをアニーリングし、*BbsI* 制限サイトを認識する制限酵素 *BpiI* (Thermo Fisher, MA, USA) と DNAリガーゼ (New England Biolabs, Hertfordshire, UK) とを同時に精製済み PX458プラスミドに作

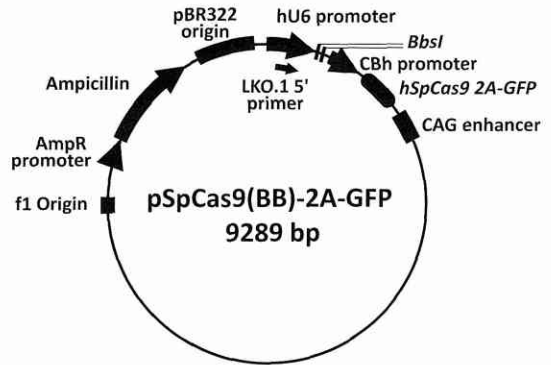


図1.

pSpCas9(BB)-2A-GFPのベクターマップの概略図を示す。全長9289 bpのpBR322 DNAをオリジナルとするクローニングベクターであり、アンピシリン耐性カセットを持つ。クローニングサイトの上流と下流には *BbsI* 制限サイトがあり、その上流にはhU6プロモーターが存在する。下流にはCBhプロモーターで制御を受けるhSpCas9 2A-GFPサイトが存在する。

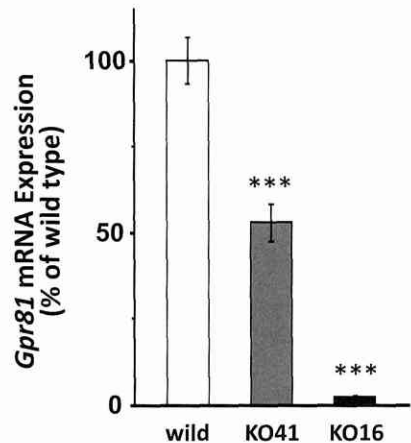


図2.

2 μ gのtotal RNAを逆転写反応させ、qPCRにより解析を行った結果を示す。wildは野生型MC3T3-E1細胞、KO41はKO41細胞株を、KO16はKO16細胞株である。*Gpr81*遺伝子発現量は、 β アクトリン遺伝子発現量を用いて補正を行った。***は野生型と比較して $p < 0.0001$ であることを示す (n=3)。

用させた。この反応生成物を、コンピテント *E.coli* HST08 (タカラバイオ, 東京) に形質転換し、LBプレートで1晩培養した。コロニーを少量培養しプラスミド抽出後、*BpiI*を十分な時間反応させた。この反応液を0.7%アガロースゲルで電

```

          400          410          420          430          440
      M P V L S P T A M D N G S C C L
wild ttggatgcca gtcctctctc caactgctat ggacaadggg tcgtgctgtc
      *****
      *****
KO16 ttggatgcca gtcctctctc caactgctat ---Cagggg tcgtgctgtc
      M P V L S P T A I T G R A V

          450          460          470          480          490
      I E G E P I S Q V M P P L L I L
wild tcatcgaggg ggagcccatc tcccaagtga tgcctcctct actcatcctg
      *****
      *****
      *****
      *****
KO16 tcatcgaggg ggagcccatc tcccaagtga tgcctcctct actcatcctg
      S S R G S P S P K #

```

図3.

野生型MC3T3-E1細胞 (wild) とKO16細胞 (KO16) の*Gpr81*遺伝子ゲノムシーケンスの結果。コーディング領域は395～1450であり、152アミノ酸がコードされている。下線部分はgRNAの標的配列であり、今回用いたPAM配列は四角で囲った。*は野生型細胞とKO16細胞の相同部分を示し、上下の記号はトリプレットコドンでコードされるアミノ酸を示す。なお、#は終始コドンであることを示す (KO16; 468～470)。

気泳動し、*Bpi I* で全く消化できないものを選択した。精製後にシーケンスを行い、標的ゲノム配列と相同の塩基配列が組み込まれていることを確認した。このコロニーを大量培養し、プラスミド精製してCRISPR/Cas9発現ベクターとした。

3. 細胞培養と遺伝子導入

培地はFBS (ThermoScientific, Waltham, MA) 10%を含む α -MEMを用い、MC3T3-E1細胞を6wellプレートで培養した⁹⁾。70%コンフルエント後に発現ベクター6 μ gをXfect Transfection Reagent (Clontech, Palo Alto, CA)にて、遺伝子導入した。これらの細胞を150mm dishに移した後に、クローニングシリンダーを用いシングルコロニーを選択し、さらに培養をした。

4. total RNA抽出とRT-qPCR

total RNA抽出後にHigh-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, CA)にて逆転写反応を行い、cDNAに対して*Gpr81*プライマー (センスプライマー; 5'-tct tcc tgc ccc tga caa tc -3', アンチセンスプライマー; 5'-ccg tct cag get cca aac a -3', PCR増幅産物; 62bp)あるいは、 β -actinプライマー (センスプライマー; 5'-cat ccg taa aga cct cta tgc caa c -3', アンチセンスプライマー; 5'-atg gag cca

ccg atc cac a -3', PCR増幅産物171bp)とSYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ)を用いて、qPCRを行った。

5. ウエスタンブロット

全細胞をRIPA bufferにて溶解し、20 μ gを試料として10% SDS-PAGEで泳動した。これをPVDF膜に転写した後、N102 (和光純薬, 大阪)でブロッキングした。一次抗体としてウサギ抗GPR81-S296抗体 (Sigma Aldrich, MO, USA)を用いLinked Streptavidin-Biotin法にて検出を行った。

6. DNAシーケンス

CRISPR/Cas9発現ベクターのシーケンスはLKO.1 5'プライマー (5'-gac tat cat atg ctt acc gt -3')を用いて、PRISM 310ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems, CA)によりシーケンスを行った。また、MC3T3-E1細胞のゲノムシーケンスは、(上流プライマー; 5'-gct get aga gga gcc cta gt -3', 下流プライマー; 5'-tct tct gac ctc cgc gtc tt -3')により、Prime STAR GXL DNA Polymerase (タカラバイオ)を用いてゲノムDNAの一部を増幅させた後に、上流プライマーを用いてサイクルシーケンス反応を行った。

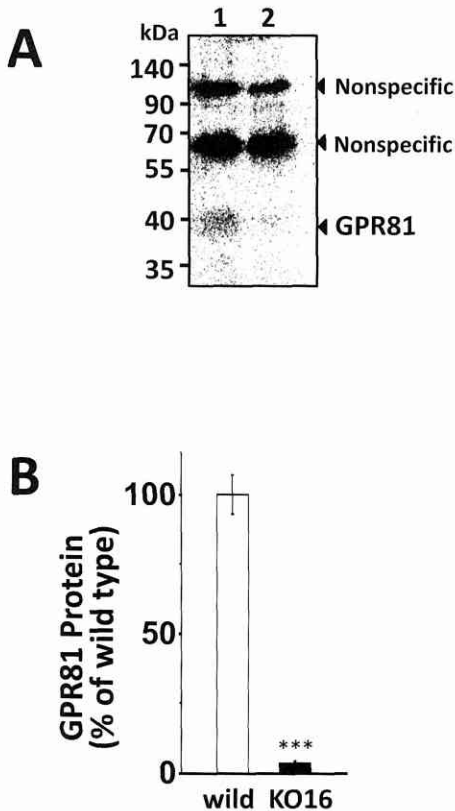


図4.

GPR81タンパク質発現をウエスタンブロットで解析を行った。Aはウエスタンブロット像である。レーン1は野生型MC3T3-E1、レーン2はKO16株の抽出産物を泳動した。分子量は同時に泳動した分子量マーカーにより決定した。Bは3回電気泳動した時のHRP発光強度を解析した結果である。***は野生型と比較して $p < 0.0001$ であることを示す。

7. 統計解析

データは平均値±標準誤差で表記した。多群の検定は Student's t-test による分散分析により検定した。p 値が5%未満のとき統計的に有意差があると見なした。

結 果

遺伝子導入した MC3T3-E1細胞株 (KO) 45 株の *Gpr81* 遺伝子発現量を RT-qPCR で定量し β -actin で補正した結果、野生型比で72.4%であった。このうち、約50%の発現を示したものと、5%以下の発現であったものを1株ずつ (KO41,

KO16) を選択し $n=3$ で RT-qPCR にて *Gpr81* 遺伝子発現を定量した。この結果 KO41細胞株、KO16細胞株ともに野生型に比べて、*Gpr81* 遺伝子発現の有意な減少が認められた (図2)。両細胞とも位相差顕微鏡下で観察した限りでは、野生型の MC3T3-E1細胞と比較して、形態的变化は認められなかった (未掲載)。

次に野生型 MC3T3-E1細胞、KO16株および KO41株からゲノム抽出を行い、ファースト PCR の後に未反応ヌクレオチドを除き、1.5% アガロースゲルで電気泳動を行った。結果、ともに約1,000bp の DNA 断片がシングルバンドとして、臭化エチジウム染色下で確認できた (未記載)。これにサイマルシークエンス反応を行い、シークエンスを行った結果の一部とそこから翻訳されるアミノ酸コードを図3に示す。KO16株では PAM 配列から-7~-4までの4塩基が欠損し、-3に変異が挿入されていた。この結果、読み枠にフレームシフトが発生し、9番目以降のアミノ酸が変異し24アミノ酸から構成される短いペプチドが形成されている可能性がある。KO41株についても同様のシークエンスを行ったが、+417以降は波形の重なりで、解読できなかった。

そこで、KO16株で GPR81ペプチドが翻訳されていないことを確認する目的で、ウエスタンブロットングを行った。GPR81は39.5kDaのペプチドとして知られているが、野生型 MC3T3-E1細胞の抽出産物では約40kDaの位置に GPR81の抗体で染色されたバンドが検出された。一方、KO16株ではこの位置のバンドが96.6%減少した (図4A, B)。

考 察

DSB 修復は主に NHEJ によって行われるが、これは偶然にかつ連続的にエラーが挿入されやすいことが知られている。本研究では *Gpr81* 遺伝子コード領域に DSB を発生させる目的で、MC3T3-E1細胞に CRISPR / Cas9発現ベクターを遺伝子導入した。本方法で用いた遺伝子導入法での MC3T3-E1細胞への導入効率は一般に70%程度であることが知られているが、詳細については不明である。本研究で使用したベクターで発現

する hCas9 酵素には 2A-GFP が融合しているため、一過性に遺伝子導入された細胞は波長 395 nm の光で共鳴し⁷⁾ 発光を蛍光顕微鏡で観察することが可能である。しかしながら、遺伝子組換えが起こらなくとも Cas9 が転写されさえすれば DSB が発生すると考えられるため、観察時に蛍光を発しない細胞で DSB が生じていないという証拠とはなり得ない。このことから、本研究において蛍光顕微鏡で観察した時点では、発光していた細胞は、1 視野下で $32.6 \pm 11.8\%$ であったが、これが遺伝子導入効率であるとは考えにくい。遺伝子導入効率の効率を改善するために、今後はより効率のよいウイルスベクター等の開発が期待される。

DSB の修復過程では、ミスセンス変異やナンセンス突然変異、フレームシフト変異が起こるのは勿論のこと、サイレント変異やサイレントミューテーション、バックミューテーションなども起こっていると考えられる。さらに、これらが対立遺伝子間で起こるため、当然の結果としてヘテロ接合体株も存在する。KO41 株の *Gpr81* 遺伝子発現は $52.8 \pm 5.49\%$ であったが、これは対立遺伝子の片方でミスセンス変異かナンセンス突然変異あるいはフレームシフト変異が対立遺伝子の片方の対立遺伝子で起こった結果であり、ヘテロ接合体株であると考えられる。一方、KO16 株では *Gpr81* 遺伝子が PAM 配列の上流 -7 から変異しており、この結果フレームシフト変異が起こったと考えられる。また、フレームシフトによる異常な mRNA は、RNA 監視機構により分解され、ストップコドンが早期に見られるような場合は、翻訳されることはない⁸⁾。

一般に Cas9 は PAM 配列から 3 塩基離れた場所を中心に切断し DSB を形成することが知られている。DSB 修復過程では複数の修復が連続することを考慮すると、本研究の DNA シークエンスの結果も合理的なものである。また、Mashiko ら⁹⁾ は PX330 プラスミドを用いてマウス ES 細胞の *Cetn1* 遺伝子をノックダウンした。この 5 クローンのシークエンス解析の結果は、① PAM 配列から 4 塩基離れた場所の点変異、② 2 塩基離れた場所の点変異と隣の塩基の点欠損、③ 2 塩基離れ

た場所の点欠損、④ 3 塩基離れた場所の 8 塩基欠損、⑤ PAM 配列を含む 16 塩基の欠損が認められるものであった。この結果は、PAM 配列を含む gRNA 相補的配列と反対側の遺伝子も欠損する可能性を示唆している。

CRISPR / Cas9 システムではオフターゲット効果が全くないわけではないため、本研究では gRNA の配列選択は PAM を含めた 23mer のみならず 15mer, 11mer でもなるべく特異的な配列を選択した。もっとも合成 RNA と Cas9 とをトランスフェクションし、Cas9 の活性化を評価することで gRNA 配列を決定する方法¹⁰⁾ もある。しかしながら、本研究で用いた方法では、CRISPR / Cas9 発現ベクターを数時間で構築可能であり、非常に安価で容易である。この簡便さが TALE スクレアーゼと比較した場合の CRISPR / Cas9 システムの最大特徴であり、上記方法ではこの利点が半減してしまうために用いなかった。さらに複数の CRISPR / Cas9 発現ベクターを用いて、同一遺伝子に複数の DSB を発生させる方法では、より確実にノックダウン株を樹立可能であると考えられるし、同時に複数の遺伝子に DSB を発生することも可能である¹¹⁾。また、Cas9 の効果として Cel-1 assay による mismatches の検出が一般的である¹²⁾ が、DSB 修復結果としてサイレント変異やサイレントミューテーションもあり得るため、参考程度にしかならない。

結 論

CRISPR / Cas9 システムは、細胞中の目的の遺伝子をノックアウトするための非常に効率的なツールであると考えられる。

文 献

- 1) Sakuma, T. and Woltjen, K. : Nuclease-mediated genome editing : At the front-line of functional genomics technology. *Dev. Growth Differ.* **56** ; 2-13 2014.
- 2) Kim, Y. G., Cha, J. and Chandrasegaran, S. : Hybrid restriction enzymes : zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93** ; 1156-60 1996.
- 3) Wright, D. A., Thibodeau-Beganny, S., Sander J. D., Winfrey, R. J., Hirsh, A. S., Eichinger,

- M., Fu, F., Porteus, M. H., Dobbs, D., Voytas D. F. and Joung, J. K. : Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly. *Nat. Protoc.* **1** ; 1637-52 2006.
- 4) Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., Meng, X., Paschon, D. E., Leung, E., Hinkley, S. J., Dulay, G. P., Hua, K. L., Ankoudinova, I., Cost, G. J., Urnov, F. D., Zhang, H. S., Holmes, M. C., Zhang, L., Gregory, P. D. and Rebar, E. J. : A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* **29** ; 143-8 2011.
- 5) Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A. and Zhang, F. : Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8** ; 2281-308 2013.
- 6) Maeda, T., Matsunuma, A., Kawane, T. and Horiuchi, N. : Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **280** ; 874-877 2001.
- 7) Heim, R., Prasher, D. C. and Tsien, R. Y. : Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91** ; 12501-4 1994.
- 8) Mashiko, D., Fujihara, Y., Satouh, Y., Miyata H., Isotani, A. and Ikawa, M. : Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci. Rep.* **3** ; 3355 2013.
- 9) Amrani, N., Sachs, M. S. and Jacobson, A. : Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7** ; 415-25 2006.
- 10) Fujihara, Y., Kaseda, K., Inoue, N., Ikawa, M. and Okabe, M. : Production of mouse pups from germline transmission-failed knockout chimeras. *Transgenic Res.* **22** ; 195-200 2013.
- 11) Sakuma, T. and Woltjen, K. : Nuclease-mediated genome editing : At the front-line of functional genomics technology. *Dev. Growth Differ.* **56** ; 2-13 2014
- 12) Auer, T. O., Durooure, K., De Cian, A., Concorde, J. P. and Del Bene, F. : Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res.* **24** ; 142-53 2014.
- 著者への連絡先 : 前田豊信, (〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔機能分子生物学講座
 Reprint requests : Toyonobu MAEDA, Department of Oral Function and Molecular Biology, Ohu University School of Dentistry.
 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan