

23N-am07

SITE-seq 法とオンラインツールを用いたゲノム編集におけるオフターゲット効果の解析結果の比較と評価

○中村 公亮¹, 木俣 真弥¹, 秋本 智¹, 志波 優², 曾我 慶介¹, 田中 さやか², 権藤 崇裕³, 明石 良³, 近藤 一成¹ (¹国立衛研, ²東京農大, ³宮崎大)

【目的】CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated 9) は、Cas9 タンパク質とゲノム DNA の相同な 20 塩基を含むガイド RNA (gRNA) を共存させることで、ゲノム DNA の標的配列に 2 本鎖切断 (DSB) を加えることのできるゲノム編集ツールの一つであるが、標的以外の配列を切断するようなオフターゲット効果が懸念されており、現在、DSB を予測するツールの開発が進んでいる。本発表では、近年開発された次世代シーケンサーを用いた SITE-seq 法と各種オンラインツールの性能を比較し評価したので報告する。

【方法】供試ゲノム DNA には、HEK293T 細胞由来のものを用いた。CRISPR-Cas9 の標的には、AAVS1 (Chr. 19: 55115753) と FANCF (Chr. 11: 22625797) を切断する既報の gRNA を用いた。SITE-seq 法を用いた際の DSB 反応液中の Cas9 の濃度は 1~1024 nM、gRNA の濃度は Cas9 の濃度の 15 倍とした。オンラインツールは、「GGGenome」、「CRISPRdirect」、「Cas-OFFinder」等を用いた。

【結果及び考察】SITE-Seq 法を用いて得られた DSB の候補箇所数は、Cas9 の濃度に比例し増加することが確認された。候補箇所内、リファレンスゲノムにマッピングされたリード数にて上位 3 位を選抜し、リアルタイム PCR により DSB の切断効率を測定したところ、オフターゲットはオンターゲットと比較し、最大で 1/8.98 倍 (AAVS1) と 1/7.78 倍 (FANCF) であった。なお、オンラインツールを用いて検索されたオフターゲットとは一致しなかった。以上の結果より、オフターゲット効果の解析には、ゲノム上の全てのオフターゲット候補配列を評価できるバイアスのない SITE-seq 法が有効であることが示唆された。