CRISPRa の仕組みを利用した anti-CRISPR の細胞内での Cas9 阻害作用解析

（広大医系科学[1]・広大薬[2]）○岸果苗[1]、濁川清美[1,2]、長谷川有希[2]、松本大亮[1,2]、野村渉[1,2]

Analysis of Cas9 inhibition mechanism of anti-CRISPR in cells by using CRISPRa system

([1]*Graduate School of Biomedical and Health Sciences Hiroshima University* [2]*School of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University*) ○Kanae Kishi,[1] Kiyomi Nigorikawa,[1,2] Yuki Hasegawa,[2] Daisuke Matsumoto,[1,2] Wataru Nomura[1,2]

Although CRISPR-Cas9 system is widely used for genome editing in various research fields such as agriculture and medicine, increase of editing accuracy is still required. Homology directed repair (HDR) is an accurate repair pathway, rewriting the target genes as designed. However, genome editing efficiency through HDR editing is generally low. Activity of gene repair pathways are associated with the cell cycle phases, and HDR activity is dominant in S/G2 phases. We recently found that regulation of SpyCas9 activity with an anti-CRISPR protein (AcrIIA4) fused with a Cdt1 domain (AcrIIA4-Cdt1) increases HDR efficiency. To improve accuracy of this gene editing system, analysis of interaction between SpyCas9 and AcrIIA4 and inhibition mechanisms in cells is demanded. By applying dCas9-VPR (CRISPRa), which is an artificial transcription activator, we constructed detection system of anti-CRISPR/Cas9 interaction in cells. For the signal detection, a plasmid encoding the GFP gene with target promoter sequences of dCas9-VPR was utilized. Time-lapse analysis of GFP expression controlled by dCas9-VPR showed that AcrIIA4+Cdt1, whose expression changes in a cell cycle-dependent manner, regulates Cas9 activity in concert with cell cycle progression.
Keywords : cell-cycle, CRISPRa, genome editing, transcriptional activation

CRISPR-Cas9 はゲノム編集ツールとして広範な分野で利用されている一方で、精密な編集が求められる医療分野などでの利用においては正確性の一層の向上が求められている。相同組み換え（Homologous-directed repair：HR）は正確性の高い編集経路であり、細胞周期のうち S/G2 期に活性が高いことが知られているが、編集効率の低さが問題となっている。これまでに所属する研究室では Cas9 の阻害剤である anti-CRISPR と G1 期に集積する Cdt1 の融合タンパク質を利用して HR 効率を向上させたシステムを確立している。本研究では細胞内での Cas9 と anti-CRISPR の相互作用、阻害機構の解析を行い、細胞周期依存型ゲノム編集法の高精度化につながる情報を得ることを目的とした。

人工転写因子 dCas9-VPR による転写活性化技術（CRISPRa）を活用し、転写活性化を GFP 発現でモニターする仕組みを構築した。また、anti-CRISPR の発現量変化は mCherry+AcrIIA4+Cdt1 融合タンパク質を利用してモニターすることで、anti-CRISPR+Cdt1 で制御される Cas9 活性を GFP 蛍光で評価し、細胞内での anti-CRISPR/Cas9 相互作用の解析を可能とした。蛍光タイムラプス観察により、細胞周期に依存して発現量が変化する AcrIIA4+Cdt1 が自律的に Cas9 活性を制御することが示された。

© The Chemical Society of Japan