

2021年4月23日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
2020年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）
所属： Wellcome Sanger Institute
職名： Group Leader
氏名： Leopold Parts

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題： Optimization of experimental parameters of single-cell CRISPR screening in human pluripotent stem cells
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者： 遊佐 宏介
3. 研究期間： 2020年4月1日～2021年3月31日
4. 研究経過及び研究成果：

遊佐研究室においてヒト iPS 細胞を用いた 25 遺伝子 50gRNA のシングルセル CRISPR スクリーニングが実施された。ヒト iPS 細胞は、野生型 Cas9 を発現するもの（ゲノム DNA 切断が導入され遺伝子を破壊する）と転写抑制ドメイン融合型 dCas9 を発現するもの（転写抑制により遺伝子発現を抑制する）が作製され、それぞれシングルセル CRISPR スクリーニングが実施され、これらのデータの比較解析を行なった。まず、gRNA の標的遺伝子の発現を解析した結果、dCas9 システムでは多くの標的遺伝子に対して gRNA 導入後 2 日目までに明瞭な発現抑制が確認されたのに対し、wtCas9 システムでは 5 日目までの解析期間中、発現抑制ははっきりとは検出されなかった。次にトランスクリプトームに表現型が現れた遺伝子に対し、wtCas9 と dCas9 システムの間に差が生じるかどうか解析した。結果、データが取得できた gRNA 導入後、2、3、4 日後のいずれにおいても両システム間で大きな差は検出されず、むしろ時間経過がもたらす差の方が大きかった。次に、シングルセル CRISPR スクリーニングにおいて 1 gRNA あたりの必要細胞数を調べるため 50%ダウンサンプルした解析データを作製し、統計解析を行なった。結果、発現量の高い遺伝子に対して、よく機能する gRNA が用いられた場合では半分の細胞数に減らしても統計的に不利にはならなかったものの、発現量の低い遺伝子や抑制効果の弱い gRNA の場合には有意差が検出できなくな

った。以上のことから、シングルセル CRISPR スクリーニングにおいては dCas9 システムの優位性が明らかであり、また実験スケールは 1 gRNA あたり 100 細胞とするのが最適であることがわかった。今後のシングルセル CRISPR スクリーニングをデザインする上で貴重な情報を得ることができた。

5. 研究成果の公表

- ※発表論文リスト（謝辞が明記されたもの。掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、
学会発表、特許取得等
該当なし