

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04994

研究課題名（和文）標的DNAのあらゆる塩基を自在に直接変換できる人工酵素技術の創出

研究課題名（英文）Creation of artificial enzymes that enable targeted editing of any DNA bases

研究代表者

西田 敬二（Nishida, Keiji）

神戸大学・先端バイオ工学研究センター・教授

研究者番号：10620338

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,000,000円

研究成果の概要（和文）：新たな塩基編集技術として、DNAグリコシラーゼを母体として細胞内でゲノム不安定性をもたらさずに発現可能であり、かつ標的化された領域に限定してチミンを脱塩基できる人工酵素の作成に成功した。これによってチミンから別の塩基への変換が可能になった。さらに脱塩基後の修復に関わる因子を加えることで効率を上昇させた。そして汎用性を高めるべくCRISPRの亜種との組み合わせでの動作も見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物のゲノムを書き換えることができる新たなゲノム編集技術として、これまで困難であったTの一文字の書き換えに関わる酵素について、自然界では異なる文字を認識する酵素を改変することによって新たに生み出すことに成功した。これによってより自由度の高いゲノム情報の書き換えが可能になり、遺伝子治療法や、微生物・農水産物の育種技術として応用可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：As a new base-editing technology, we have succeeded in creating an artificial enzyme that can be expressed in cells without causing genomic instability using DNA glycosylase as a matrix, and can debase thymine only in targeted regions. This enabled the conversion of thymine to other bases. Furthermore, they increased the efficiency by adding factors involved in post-debase repair. In order to increase the versatility of the enzyme, they were able to find a way to make it work in combination with CRISPR variants.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：合成生物学

キーワード：ゲノム編集 CRISPR 塩基編集

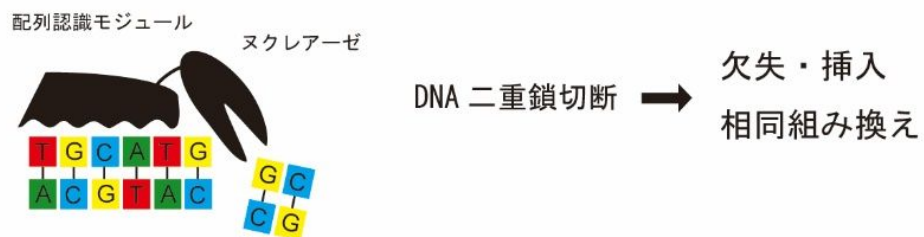
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

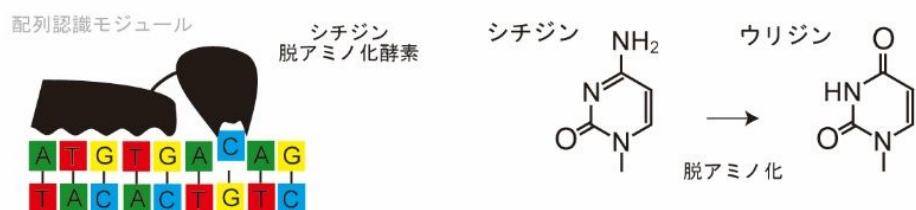
ゲノム編集技術は生きた細胞内において、望みの標的 DNA 部位を高効率に改変できる技術であり、近年著しい進歩を遂げて生命科学のアプローチを大きく変えようとしている。これまでに広く使われるようになったゲノム編集技術は、標的特異的なヌクレアーゼ活性を基本としており、標的 DNA 領域に 2 本鎖切断を引き起こしてその修復過程に何らかの変異を期待するものであった。この手法においては、切断後に宿主細胞の非相同末端修復(NHEJ)によってランダムな配列の付加あるいは欠損(indel)が起こり、結果として当該領域の遺伝子機能破壊が期待される。より精密な編集を行うには、相同組み換え反応を誘導するためのドナー DNA 断片を併せて導入する必要があり、効率面やデリバリーの問題から導入可能対象が限られ、また操作難易度が高くなる。また DNA 切断そのものが細胞毒性を発揮する場合もあり、より自然のプロセスに近い手法が好ましいと考えられる。

研究代表はこれまでに 2016 年にゲノム情報を DNA を切らずに書き換えることができる技術「Target-AID」の開発に成功した。これは脱アミノ化酵素であるシチジンデアミナーゼによって標的配列 DNA のシチジンを変換する新規のゲノム編集技術である(図)。これによって新たな DNA 断片を挿入することなくゲノムの標的部位に直接点変異を導入することが可能になった。この手法はヌクレアーゼ型よりも細胞毒性が少なく、基礎研究から医療応用、植物育種に至る幅広い生命科学分野における革新的なツールとなることが期待される。ただし、現在のところシチジンの変換しかできないため、改変できる DNA 配列情報には制約があった。

「切るゲノム編集」



「切らないゲノム編集 C 型」



「切らないゲノム編集 A 型」

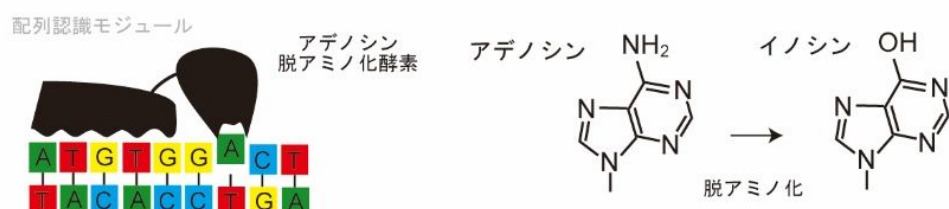


図 1. ゲノム情報の書き換え手法

2. 研究の目的

本研究の目的は、標的とする任意の DNA 配列を切らずに直接書き換えることが出来るゲノム編集技術として、これまでに達成できた、シチジン脱アミノ化反応を用いる「切らないゲノム編集 C 型」に加えて、より難易度の高い「切らないゲノム編集 A・T 型」を実現すべく、DNA アデニン・チミン変換型ゲノム編集人工酵素等を構造的アプローチと進化工学を駆使して創出し、新たなゲノム編集技術として確立することが本研究計画の目的である。これによってすべての DNA 塩基の自在な書き換えを実現し、生命科学全般の基盤となる革新的なツールを提供する。

3. 研究の方法

まず脱アミノ化とは異なる反応機構の採用について検討を行った。実際にはウラシル DNA グリコシラーゼを母体として、立体構造を元に基質塩基の特異性の変換および二本鎖 DNA への親和性を減じると予想される複数の組み合わせ変異導入を行った。

さらなる活性の向上のため、本体酵素の進化工学的アプローチを行うべく、立体構造から予測される基質塩基および DNA に相互作用するアミノ酸部位を複数選び出し、その相互作用を強化すべく種々のアミノ酸置換を生じるような変異を導入するコンストラクトを作成し、それら変異の組み合わせについてスクリーニングを行った。酵母の Can1 遺伝子のネガティブスクリーニングの系を利用し、より高頻度に変異を誘発できるクローンを選抜し、シーケンス解析によって複数のアミノ酸置換を同定した。

しかしながら、得られた置換体について再び形質転換して効率を検証したところ、有意に変異率を上昇させるものは見出されなかった。そこで改めて、現在母体として用いている酵母由来の脱塩基酵素と他の生物由来のオルソログの配列と構造を比較して、不要と思われる N 末端のドメインの除去など、活性を阻害している可能性のある要素の検証をすべく設計を行った。

また母体となる Cas9 について見直すこととし、その複合体形態を様々に変化させることや、由来の異なる CRISPR についても好ましいものを探索し、実験検討を行った。

4. 研究成果

新たな塩基編集技術としての幅広い可能性を検証すべく、脱アミノ化とは異なる反応機構の採用について検討を行った。実際にはウラシル DNA グリコシラーゼを母体として、立体構造を元に基質塩基の特異性の変換および二本鎖 DNA への親和性を減じると予想される複数の組み合わせ変異導入を行い、細胞内でゲノム不安定性をもたらさずに発現可能であり、かつ標的化された領域に限定してチミンを脱塩基できる人工酵素の作成に成功した。これによってチミンから別の塩基への変換が可能になることが大いに期待される。ただし当初の形状では効率が低かったため、さらなる改良を検討した。まず母体酵素の由来を幅広い種について試験したところ、大腸菌由来のものがより活性が高い可能性が示唆された。また修復系への干渉も重要であると考え、脱塩基後の修復に関わる AP エンドヌクレアーゼの変異体を作成、拮抗的な阻害を目論んだところ有意な変異率の上昇をみる事ができた。

またさらにチミンから別の塩基への変換が可能になる脱塩基酵素について、その効率の向上を目指した進化工学的アプローチに着手した。具体的には、立体構造から予測される基質塩基および DNA に相互作用するアミノ酸部位を複数選び出し、その相互作用を強化すべ

く種々のアミノ酸置換を生じるような変異を導入するコンストラクトを作成し、それら変異の組み合わせについてスクリーニングを行った。酵母の Can1 遺伝子のネガティブスクリーニングの系を利用し、より高頻度に変異を誘発できるクローンを選抜し、シーケンス解析によって複数のアミノ酸置換を同定した。しかしながら、得られた置換体について再び形質転換して効率を検証したところ、有意に変異率を上昇させるものは見出されなかった。そこで改めて、現在母体として用いている酵母由来の脱塩基酵素と他の生物由来のオルソログの配列と構造を比較して、不要と思われる N 末端のドメインの除去など、活性を阻害している可能性のある要素の検証をすべく設計を行ったが、これらについても優位なものは得られなかった。さらに主に DNA 修復に関わる複数の候補タンパク質を選び出し、その組み合わせについてスクリーニングを行った。検証手法としてはこれまでに確立した出芽酵母の Can1 遺伝子のネガティブスクリーニングの系を利用し、複数の標的配列について編集効率の変動を解析した。しかしながら結果としては有意に変異率を上昇させるものは見出されなかった。そこで母体となる Cas9 について見直すこととし、その複合体形態を様々に変化させることや、由来の異なる CRISPR についても好ましいものを探索し、実験検討を行うべく、コンストラクトを作成して試験した。その結果、Cas12a を用いた複合体のいにおいて有意な変異導入活性を見出すことができた。

当初に定めていた計画の一つ、DNA シトシン以外の塩基に作用することができる人工酵素の候補として、DNA チミンを実際の細胞内で脱塩基化することによって標的特異的に変異導入できる人工酵素複合体を獲得することができた。またその効率を高める種々の改良についても着手してポジティブな結果を得ることができた。

新たな塩基編集技術の可能性として、ウラシル DNA グリコシラーゼを母体として、細胞内でゲノム不安定性をもたらさずに発現可能であり、かつ標的化された領域に限定してチミンを脱塩基できる人工酵素の作成に成功した。これによってチミンから別の塩基への変換が可能になった。ただし当初の形状では効率が低かったため、さらなる改良を検討し、まず母体酵素の由来を幅広い種について試験したところ、大腸菌由来のものがより活性が高い可能性が示唆された。また修復系への干渉も重要であると考え、脱塩基後の修復に関わる AP エンドヌクレアーゼの変異体を作成、拮抗的な阻害を目論んだところ有意な変異率の上昇をみることができた。

これらにより、当初に定めていた計画の一つ、DNA シトシン以外の塩基に作用することができる人工酵素の候補として、DNA チミンを実際の細胞内で脱塩基化することによって標的特異的に変異導入できる人工酵素複合体を獲得することができた。さらにその効率の向上を目指した進化工学的アプローチにより複数の変異候補を取得した。

また効率や変換パターンに影響を与えうる補助因子について、主に DNA 修復に関わる複数の候補タンパク質を選び出し、その組み合わせについてスクリーニングを行ったが、有意なものは見出せなかった。最後に、獲得した DNA 脱塩基酵素のシリーズについて、その機能性を拡張するべく、Cas9 に代えて Cas12a の一種において、有意な変異導入を確認することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Katayama Kenta, Mitsunobu Hitoshi, Nishida Keiji	4. 巻 52
2. 論文標題 Mammalian synthetic biology by CRISPRs engineering and applications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 79 ~ 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2019.05.020	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furuhata Yuichi, Sakai Ayako, Murakami Tomi, Morikawa Mone, Nakamura Chikashi, Yoshizumi Takeshi, Fujikura Ushio, Nishida Keiji, Kato Yoshio	4. 巻 9
2. 論文標題 A method using electroporation for the protein delivery of Cre recombinase into cultured Arabidopsis cells with an intact cell wall	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-38119-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimatani Zenpei, Ariizumi Tohru, Fujikura Ushio, Kondo Akihiko, Ezura Hiroshi, Nishida Keiji	4. 巻 1917
2. 論文標題 Targeted Base Editing with CRISPR-Deaminase in Tomato	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 297 ~ 307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8991-1_22	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimatani Zenpei, Fujikura Ushio, Ishii Hisaki, Terada Rie, Nishida Keiji, Kondo Akihiko	4. 巻 20
2. 論文標題 Herbicide tolerance-assisted multiplex targeted nucleotide substitution in rice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 1325 ~ 1331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2018.08.124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Shingo, Yoshioka Shin, Nishida Keiji, Hosokawa Hiroshi, Kakizuka Akira, Maegawa Shingo	4. 巻 8
2. 論文標題 In vivo targeted single-nucleotide editing in zebrafish	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-29794-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arazoe Takayuki, Kondo Akihiko, Nishida Keiji	4. 巻 13
2. 論文標題 Targeted Nucleotide Editing Technologies for Microbial Metabolic Engineering	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 1700596 ~ 1700596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/biot.201700596	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimatani Zenpei, Fujikura Ushio, Ishii Hisaki, Matsui Yusuke, Suzuki Minoru, Ueke Yuki, Taoka Ken-ichiro, Terada Rie, Nishida Keiji, Kondo Akihiko	4. 巻 131
2. 論文標題 Inheritance of co-edited genes by CRISPR-based targeted nucleotide substitutions in rice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 78 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plaphy.2018.04.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nambu-Nishida Yumiko, Nishida Keiji, Hasunuma Tomohisa, Kondo Akihiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Genetic and physiological basis for antibody production by Kluyveromyces marxianus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13568-018-0588-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Banno Satomi, Nishida Keiji, Arazoe Takayuki, Mitsunobu Hitoshi, Kondo Akihiko	4. 巻 3
2. 論文標題 Deaminase-mediated multiplex genome editing in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 423 ~ 429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41564-017-0102-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nambu-Nishida Yumiko, Nishida Keiji, Hasunuma Tomohisa, Kondo Akihiko	4. 巻 7
2. 論文標題 Development of a comprehensive set of tools for genome engineering in a cold- and thermo-tolerant <i>Kluyveromyces marxianus</i> yeast strain	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-08356-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Yamato, Kuroiwa Haruko, Shimada Takashi, Yoshida Masaki, Ohnuma Mio, Fujiwara Takayuki, Imoto Yuuta, Yagisawa Fumi, Nishida Keiji, Hirooka Shunsuke, Misumi Osami, Mogi Yuko, Akakabe Yoshihiko, Matsushita Kazunobu, Kuroiwa Tsuneyoshi	4. 巻 114
2. 論文標題 Glycosyltransferase MDR1 assembles a dividing ring for mitochondrial proliferation comprising polyglucan nanofilaments	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 13284 ~ 13289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1715008114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitsunobu Hitoshi, Teramoto Jun, Nishida Keiji, Kondo Akihiko	4. 巻 35
2. 論文標題 Beyond Native Cas9: Manipulating Genomic Information and Function	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Trends in Biotechnology	6. 最初と最後の頁 983 ~ 996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tibtech.2017.06.004	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakata Rina C., Ishiguro Soh, Mori Hideto, Tanaka Mamoru, Tatsuno Kenji, Ueda Hiroki, Yamamoto Shogo, Seki Motoaki, Masuyama Nanami, Nishida Keiji, Nishimasu Hiroshi, Arakawa Kazuharu, Kondo Akihiko, Nureki Osamu, Tomita Masaru, Aburatani Hiroyuki, Yachie Nozomu	4. 巻 38
2. 論文標題 Base editors for simultaneous introduction of C-to-T and A-to-G mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Biotechnology	6. 最初と最後の頁 865 ~ 869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41587-020-0509-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komatsu Akira, Ohtake Miki, Shimatani Zenpei, Nishida Keiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Production of Herbicide-Sensitive Strain to Prevent Volunteer Rice Infestation Using a CRISPR-Cas9 Cytidine Deaminase Fusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00925	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinozaki Y, Beauvoit BP., Takahara M, Hao S, Ezura K, Andrieu M, Nishida K, Mori K, Suzuki Y, Kuhara S, Enomoto H, Kusano M, Fukushima A, Mori T, Kojima M, Kobayashi M, Sakakibara H, Saito K, Ohtani Y, Bernard C, Prodhomme D, Gibon Y, Ezura H, Ariizumi T	4. 巻 117
2. 論文標題 Fruit setting rewires central metabolism via gibberellin cascades	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 23970 ~ 23981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2011859117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hunziker Johan, Nishida Keiji, Kondo Akihiko, Kishimoto Sanae, Ariizumi Tohru, Ezura Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Multiple gene substitution by Target-AID base-editing technology in tomato	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-77379-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishida Keiji, Kondo Akihiko	4. 巻 63
2. 論文標題 CRISPR-derived genome editing technologies for metabolic engineering	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolic Engineering	6. 最初と最後の頁 141 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymben.2020.12.002	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuan Shaoze, Kawasaki Shunsuke, Abdellatif Islam M. Y., Nishida Keiji, Kondo Akihiko, Ariizumi Tohru, Ezura Hiroshi, Miura Kenji	4. 巻 40
2. 論文標題 Efficient base editing in tomato using a highly expressed transient system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 667 ~ 676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00299-021-02662-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中井明日也, Ang Li, 西田敬二	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 386
3. 書名 完全版 ゲノム編集実験スタンダード	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------