

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17879

研究課題名(和文) 原核生物のゲノム編集を拓く「DNAを切らない」拡張Target-AID技術の開発

研究課題名(英文) Development of extended Target-AID for deaminase-mediated prokaryotic genome editing

研究代表者

坂野 聡美 (Banno, Satomi)

大阪大学・情報科学研究科・特別研究員(PD)

研究者番号：00513160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、CRISPR/Cas9技術を応用した配列特異的なDNA塩基編集ツールTarget-AIDを、バクテリアに適用できる点変異導入ツールへと拡張した。このツールは、大腸菌ゲノムDNAを切断せず、標的配列内にCからTへの点変異を導入することができる。この技術を用いることで、簡便かつ高確率に、標的異種6遺伝子の同時変異導入や、4つのマルチコピー遺伝子合計41か所の点変異導入も可能となった。DNA切断を伴わずに大腸菌への致死性を回避できることから、様々な原核生物にも応用できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原核生物において従来のCRISPR/Cas9技術による2本鎖切断は致死であることが多く、これまで適用することは困難であった。本研究で創出された原核生物のゲノム編集技術は、ゲノムDNAを切断せずに、自然突然変異と同様のプロセスで、複数の標的遺伝子に同時に変異を導入できるという、非常に優れた手法である。そのため、この技術を今後さらに改良することで、様々な原核生物における遺伝子操作性を飛躍的に高めることが可能となり、非常に強力で有用なツールとなると予想される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I advanced the direct and efficient targeted base-editing tool of genomic DNA in Escherichia coli. Mediated by its deaminase reaction, cell lethality which had been associated with conventional nuclease-mediated genome editing has been avoided. The tool is simple and efficient enough to perform simultaneous editing of 6 different target genes involved in a metabolic pathway, or 4 types of transposase genes comprising 41 loci in total. As this system is not lethal for E. coli cells and thus may be applicable to wide range of bacterial strains, then I believe this study is of great interest for broad community.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：合成生物学 ゲノム編集 CRISPR 大腸菌 遺伝子工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、任意の DNA 配列を標的としたゲノム編集技術として CRISPR/Cas9 が開発され、次世代のゲノム編集技術として注目されている。これは、配列特異的ヌクレアーゼによるゲノム編集法で、編集したい箇所に DNA の 2 本鎖切断を誘発し、修復過程において遺伝子座の欠失・挿入を起こす。高等生物においてはすでに遺伝子改変細胞の作製が試みられており、様々な生物種への実用化が実現している。しかしながら、ゲノム編集の際の DNA 切断によって、予想されない変異が導入される、また、とりわけ原核生物においては染色体切断が致死となる、という欠点があり、有用物質生産に寄与する種の改変など、応用が強く期待されているにもかかわらず、その適用が難しいという問題があった。

そのような中、我々のグループは、酵母や培養細胞において、DNA を切らずにゲノム編集を行うことのできる Target-AID の技術を開発し、2016 年に論文発表した [文献 1]。これにより、DNA を切断せずに標的領域に留まることのできる nuclease 不活性型 Cas9 (dCas9) と、DNA 脱アミノ化酵素 AID (activation-induced cytosine deaminase) との融合酵素 Target-AID を用いて、標的とした DNA のシトシン (C) 塩基を、チミン (T) 塩基へと置換することに成功した。

2. 研究の目的

そこで本研究は、大腸菌 DNA を切らずに編集を行う Target-AID 技術を原核生物に応用・最適化することで、合成生物学、遺伝子工学の飛躍的發展に寄与する基盤技術として確立することを目的とする。具体的には、塩基置換融合酵素 dCas9-PmCDA1 と配列認識モジュール CRISPR-gRNA を原核生物に導入するだけで、複数の標的 DNA の同時編集を簡便かつ高確率に行うよう、ツールを改良する。

3. 研究の方法

大腸菌用に改変した人工融合酵素 dCas9-PmCDA1 をプラスミドから大腸菌体内で発現させたところ、標的とした 1 遺伝子領域の 5' 側から 6 番目程度までにある C 塩基から T 塩基への置換が可能となった (図 1)。

そこで、Target-AID の基本構築と off-target の評価と検証をフィードバックしながら繰り返し行うことで、汎用性の高い技術の確立を目指す。

									PAM
<i>galk</i> -target 8	ACT	CACACCA	TTCAGGCGCC	TGG					
colony1	ACT	TACACCA	TTCAGGCGCC	TGG					
colony2	ACT	TATACCA	TTCAGGCGCC	TGG					
colony3	ACT	TACACCA	TTCAGGCGCC	TGG					
colony4	ACT	TACACCA	TTCAGGCGCC	TGG					
		1-6 nt							

(図 1) *galk* 遺伝子の標的部位における塩基置換

(1) 基本技術の構築 : Hyper Target-AID の作製

まず、ゲノム編集をより効率の良いものにするために、機能向上 Target-AID (Hyper Target-AID) の作製を行う。主にプラスミド側の改変を考慮して研究を遂行する。dCas9 や CRISPR-gRNA を温度感受性プロモーターや構成的プロモーターの制御下におく、複製能のない一過的なプラスミドを使用する、酵素を速やかに分解する系 (LVAtag) を用いる [文献 2]、DNA 修復機構を阻害する系 (UGI) を用いる、などに取り組み、高効率化をめざす。次に、酵素自体の改変も検討する。Cas9 の非特異的結合を低下させる変異 [文献 3]、AID の Deaminase 活性上昇変異 [文献 4] を利用する方法、酵素を融合しているリンカー長の改変など、逆遺伝学的アプローチによる改良も考慮する。

(2) 塩基置換効率の評価 : off-target 効果の検証

ゲノム編集において、標的配列とは異なる部位への意図しない変異導入をいかにして抑えるか、またその検証方法がポイントとなってくる。意図しない変異には、標的配列に類似した配列を誤認識する (off-target) ことで導入されてしまう変異と、配列とは全く関係なく起こる非特異的変異がある。off-target を検証するために、*rpoB* 遺伝子破壊による rifampicin 薬剤耐性株の検出系を用いて評価を行う。標的遺伝子の編集法、培養条件、Target-AID を改良しながら off-target 評価のフィードバックを行い、最終的には大腸菌の全ゲノムシーケンスを行い検証する。

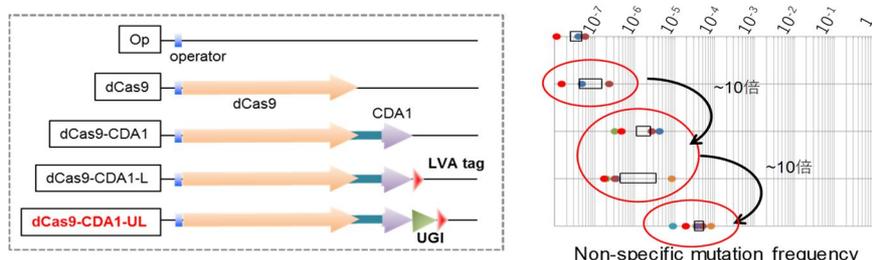
4. 研究成果

(1) Target-AID を用いた標的 1 遺伝子への変異導入

まず、温度誘導性 dCas9-PmCDA1 を用いて標的遺伝子への塩基置換を確認した。37 一晚の培養により、標的である *galK* 遺伝子、*rpoB* 遺伝子への点変異導入が確認された。部位によっては 100% の変異導入効率の場合もあった。一方で、標的配列によってはほとんど変異が導入されないこともあった。

(2) UGI と LVA tag を付加した改良 Target-AID による、標的遺伝子への変異導入効率上昇と off-target の検証

Target-AID の機能を向上させるため、UGI (uracil DNA glycosylase inhibitor) を付加した。シトシンは脱アミノ化されウラシルになるが、UGI はその修復をブロックするため、結果的には不可逆的な脱アミノ化となる。しかし UGI を融合した dCas9-CDA1-UGI は大腸菌細胞内において非常に強力に機能したため、大腸菌の生育阻害が起きた。それを緩和するために、タンパク質の分解を促進させる LVA tag をさらに付加し、dCas9-PmCDA1-UGI-LVA (UL) を作製した (図 2 左)。この融合酵素を用いると、標的配列にかかわらず、ほぼ 100% の効率により点変異の導入が可能となった。



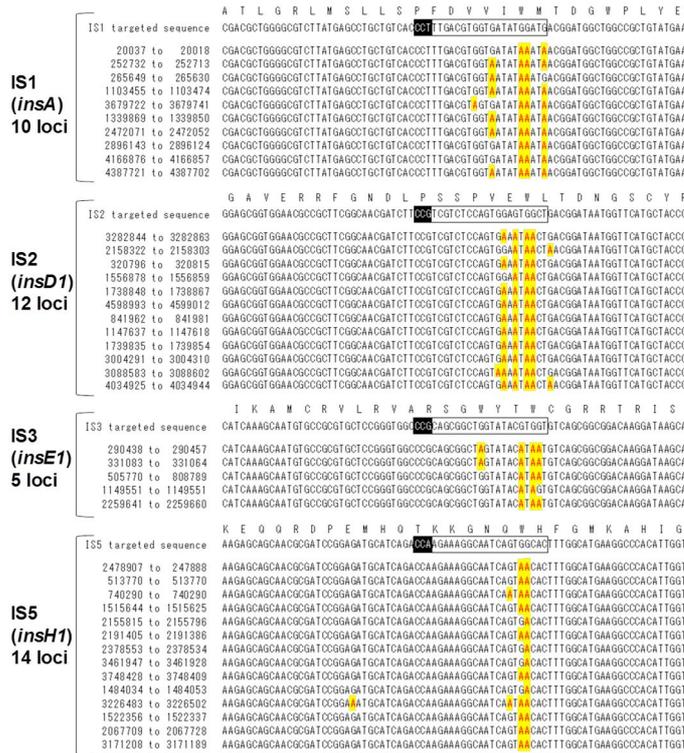
(図 2) UGI-LVA tag 付加による非特異的変異割合の上昇

次に、off-target の検証を行った。UGI-LVA なしの dCas9-PmCDA1 を用いた編集実験後、その株の全ゲノムシーケンスを行った結果、off-target は同定されず、非特異的変異が 1 ~ 2 か所見つけた。rifampicin 薬剤耐性による定量解析から、非特異的変異は自然変異のおよそ 10 倍程度上昇していると推定された (図 2)。

一方、UGI-LVA ありの改良 Target-AID を用いて後述する多重変異導入実験を行うと、本来の標的部位 41 か所のほかに、off-target と推定される類似配列内への点変異が 2 か所検出された。非特異的変異は、UGI-LVA なし時よりもさらに 10 倍程度上昇していることが推定された (図 2)。

(3) 異種または同種の複数遺伝子への同時変異導入

UGI-LVA ありの改良 Target-AID を用いて、実際に異種 6 遺伝子を標的とした同時編集を試みた。その結果、一度の形質転換で、高効率な(8 株中 7 株)6 遺伝子同時変異導入が実現された。さらに、大腸菌ゲノム内にマルチコピーとして存在するトランスポゾン遺伝子 (IS) に、4 つの標的配列 (IS1, IS2, IS3 and IS5) を用いて変異導入を試みた。複数回のシングルアイソレーションを繰り返した結果、最終的に全 41 か所の全てに変異が導入されていることを確認した (図 3)。



(図 3) マルチコピー-IS 遺伝子の同時編集

(4) 異種菌株における変異導入効率

Target-AID の特性をより良く知るために、大腸菌の菌種の違いに対する、遺伝子への変異導入効率を検証した。5 種類の菌株を用い、*galK* 遺伝子、*rpoB* 遺伝子を標的とした改良 Target-AID による変異導入実験を行った結果、菌株によって点変異が導入される割合、また変異部位がそれぞれ異なる場合があった。今回の実験条件下において、ともに野生型とされている 2 種の菌株での変異導入割合と部位が異なっていた。この違いは何によるものなのか今のところ明らかでないため、今後さらなる追加検証が必要である。

引用文献

- [1] Nishida et al., *Science* **353**: 8729 (2016)
- [2] Andersen et al., *Applied Environmental Microbiology* **64**: 2240-2246 (1998).
- [3] Kleinstiver et al., *Nature* **529**: 490-495 (2016)
- [4] Wang et al., *Nature Structural Molecular Biology* **16**: 769-776 (2009)

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Banno S, Nishida K, Arazoe T, Mitsunobu H and Kondo A.	4. 巻 3
2. 論文標題 Deaminase-mediated multiplex genome editing in Escherichia coli	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Banno S., Nishida K., Arazoe T., Mitsunobu H., and Kondo A.
2. 発表標題 Development of deaminase-mediated multiplex genome editing method in Escherichia coli
3. 学会等名 The 9th International Symposium of Innovative Bio Production Kobe, (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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