

令和元年6月5日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19355

研究課題名(和文)染色体機能要素のリコーディングによる遺伝子ゲノム操作の革新

研究課題名(英文) Challenge to innovative gene/genome manipulation techniques by re-coding of chromosomal functional elements

研究代表者

伊藤 隆司 (Ito, Takashi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：90201326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：複製起点とセントロメアは染色体機能に不可欠な配列要素で、それぞれ複製開始蛋白質と動原体蛋白質の結合部位として働く。一方、Cas蛋白質は、ガイドRNAと一体になってそれと相補的なDNA配列に結合する。したがって、Cas蛋白質を介して複製開始蛋白質と動原体蛋白質をリクルートできれば、複製起点やセントロメアを欠くDNAでも染色体として振る舞える可能性がある。本研究ではこの可能性への挑戦を試みた。その過程で我々は、ガイドRNAの有効性をパン酵母細胞の顕微鏡観察だけで判定できる新しい方法を開発し、新しく登場したCas12aをうまく機能させる条件を見つけて、上記の挑戦への基盤が整った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体の基本要素A配列は、それぞれの機能に必要な蛋白質をゲノムDNA上にリクルートするシグナルとして働くというのが、現在の見解である。この見解の最も挑戦的な検証は、必要な蛋白質をDNA上にリクルートさえできれば基本要素が不要であることを示すことにある。それは、外来性DNAに染色体の基本要素の配列を連結することで成立している組み換えDNAの概念を根本から変えることになり、人工的なゲノム設計の自由度を高めることにもつながる。研究期間内にこの挑戦に成功するまでは至らなかったが、技術的困難の解決に成功し、今後の挑戦への基盤が築かれた。と同時に、ゲノム編集研究全般にとって有用な手法を開発できた。

研究成果の概要(英文)：Replication origin and centromere are essential sequence elements for chromosome functions, serving as binding sites for replication initiator and kinetochore proteins, respectively. Cas protein complexed with guide RNA can bind DNA complementary to the RNA. Accordingly, if Cas protein can recruit replication initiator and kinetochore proteins to a DNA molecule, it should behave as a chromosome even if it contains neither replication origin nor centromere. This study challenges to this possibility. During the course of this study, we developed a novel method to examine the performance of guide RNA in baker's yeast via simple microscopic observation, which enabled us to define optimal conditions to use newly discovered Cas12a protein, thus laying a basis for the challenge.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：CRISPR-Cas 複製起点 セントロメア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

【学術的背景】

真核生物染色体の機能要素

真核生物染色体の安定な複製と分配と維持には、複製起点とセントロメアとテロメアの3種類の機能要素が必要である。定評ある教科書『細胞の分子生物学』を繙くと、「このような基本的機能にかかわるのは、DNAの3種類の特異的配列であり、」（第4版翻訳版）と記載されている。これらの3要素は、組み合わせると出芽酵母で人工染色体を構築できることから、染色体機能発現のための十分条件でもある(但し、有糸分裂に限れば、テロメアを持たない環状染色体でも安定に機能できるので、複製起点とセントロメアが必要最小限ということになる)。染色体の機能要素に関しては、様々な生物で膨大な研究成果が蓄積されている。そのエッセンスは、3種類の特異的配列が染色体の複製と分配と維持に必要なタンパク質群をリクルートするためのシグナルとして機能する、ということに尽きる。であるならば、これら3種類の特異的配列を欠いたDNA分子であっても、任意の塩基配列を上記のタンパク質群をリクルートするためのシグナルとして読み換えることができれば、染色体として振る舞える筈である。

ゲノム編集技術とその応用

細菌の獲得免疫系であるCRISPRシステムの発見は、その構成要素であるCas9に代表されるプログラム可能なRNA-guided nuclease (RGN)を利用したゲノム編集の爆発的發展を惹き起こした。Cas9タンパク質はガイドRNAが規定する標的ゲノム配列を認識して切断する。ヌクレアーゼ活性を失ったCas9変異体タンパク質dCas9は、標的配列に特異的に結合するが切断はしない。dCas9のこの性質を利用することによって、遺伝子発現の活性化や抑制を担うタンパク質あるいはその機能ドメインを標的ゲノム部位にリクルートして、標的遺伝子の発現を活性化あるいは抑制する研究も盛んに行われており、成功例が相次いで報告されている。

合成ゲノミクスとGenome Project-Write

ゲノム操作の究極形がゲノムの設計と合成を行う合成ゲノミクスであり、最近になってGenome Project-Writeが提唱されるに至った(Science 353, 126, 2016)。細菌ゲノムの完全人工合成は、出芽酵母を宿主として達成されており、合成したゲノムを細菌細胞に戻すことも行われた。出芽酵母は、このようなゲノム工学の宿主として最も優れた細胞ではあるが、いくつかの問題を抱えている(Chromosome Res. 23, 57, 2015)。まず、合成されたゲノムを酵母細胞内で人工染色体として維持するために、そのどこか1カ所にセントロメア(CEN)を付加せざるを得ない。更に厄介なのは複製起点である。GC含量が低いゲノムであれば複製起点として機能する自律複製配列(ARS)が一定頻度で出現するが、GC含量が高いゲノムの場合には数十kb毎にARSを挿入してやる必要がある。つまり、CENとARSが配列を設計する上での制約となっている。

【我々の取り組み】

我々は、配列特異的DNA結合ドメインとDNAメチル化酵素を利用して出芽酵母ゲノム中の標的領域を選択的にメチル化する方法を用いて、メチル化DNA結合タンパク質をスクリーニングする1ハイブリッドシステムを構築した。その経験を踏まえてdCas9によるエピゲノム編集にも取り組んできた。その過程で、これらの実験で行っていることは、本来は制御配列ではない塩基配列を制御配列として読み換えることによって、発現制御プログラムをコードし直していることに相当すると認識するに至った。この戦略を染色体の機能要素に拡張すれば、上に述べた『必要なタンパク質を適切にリクルートできれば、3種類の特異的配列を欠いたDNA分子でも染色体として振る舞うことが可能である』という仮説を検証できることに思い至った。

2. 研究の目的

CRISPR/Cas9システムを出芽酵母に応用して、複製起点とセントロメアに依存しない染色体の構築に挑戦し、新しい遺伝子・ゲノム操作の可能性を示すことを目指す。

3. 研究の方法

1) 真核生物のDNA複製起点は、酵母の自律複製配列(ARS)をモデルに研究が進んできた。ARSにはORC複合体とCdc6が結合し、DNAヘリケースであるMcm2-7複合体をローディングする。その結果、巻き戻された一本鎖DNAの部分にDNAプライメースが作用して複製が始まる。興味深いことに、ヒトHEK293細胞において、転写因子Gal4のDNA結合ドメインとORC構成因子Orc2あるいはCdc6の融合タンパク質を発現させると、Gal4結合配列を持つプラスミドが複製できることが報告されている(Genes Dev. 19, 2827, 2005)。そこで本研究では、dCas9と酵母Orc2あるいはCdc6の融合タンパク質を、ARSを欠くために酵母細胞

内では複製できない YIp 型プラスミドへのリクルートすることにした。

2) セントロメア配列なしの染色体分配を目的に、動原体蛋白質のリクルートに先立ち、便乗 (Piggybacking) を計画した。EB ウイルスゲノムは、宿主染色体にタンパク質を介して結合することによって、娘細胞に分配される。これと同様の便乗戦略を dCas9 の利用によって再現することを目指して、以下の計画を立てた。

新しい RGN として注目されている Cpf1/Cas12a の変異体 dCpf1/dCas12a と dCas9 の融合タンパク質を発現する株を作成し、YRp 型プラスミドと YCp 型プラスミド (= ARS と CEN を有し染色体と同様の挙動を示す) を形質転換する。

の株において、YRp 型プラスミドに特異的な dCas9 用 sgRNA と YCp 型プラスミドに特異的な dCpf1/dCas12a 用 sgRNA を共発現させて、両プラスミドの相互テザリングを試みる。その上で、元来は不安定な YRp 型プラスミドの安定性を上記のセクターアッセイで検討する。

と同様に、YRp 型プラスミドを酵母染色体上にテザリングした場合の安定性を検討する。

4. 研究成果

上記の計画 2) に沿って、セントロメア無しのベクターの piggy-backing への挑戦を開始したが、dCpf1/dCas12a の効率の低さが研究上の大きな障壁となった。我々が試行錯誤を続けている間にも Cpf1/Cas12a による遺伝子編集効率そのものに関する改善策の報告が相次いだ。そこで、それらを参考に様々な改良を試みた。例えば、gRNA の伸長による改善が 2 件報告された。一方は 5' 側への伸長、もう一方は 3' 側への伸長と対照的な報告であった。その双方について追試を試みた。しかしながら、我々の使用している gRNA に関しては、特段の効果を表すことはなかった。

そこで計画 1) を中止して、dCpf1/dCas12a を有効に活用できる方法の検討に集中することとした。こうした検討を迅速に進めるには、gRNA の in vivo における有効性を迅速に検出する系が必要であることが痛感された。サーベイヤーアッセイのような生化学的アッセイも存在するが、DNA の抽出、PCR 増幅、酵素処理、電気泳動と必ずしも多検体の処理には向いていない。そうした思いを抱えて研究を進める過程で、我々は DNA 切断効率の判定に、チェックポイントによる出芽酵母細胞の形態変化が利用できる可能性に気がついた。有効な gRNA を発現する株は、ダンベル状の形態を取って、細胞サイズが大きくなるなど、形態学的な特色を示す。習熟すると一見して判断が付きようになり、画像処理でそれを裏付けることも出来ることが分かった。しかし、より分かり易い系にするために、Rad52-GFP 発現株の利用を開始した。この株であると、切断に伴って核内に明るい蛍光輝点が生じるため、酵母を扱ったことがない初心者でも蛍光顕微鏡を覗くだけで、直ちに有効性を判定できる。スクリーニング用顕微鏡でも簡単に判別を付けることが出来る。

こうして、形態学的に gRNA の有効性を判定できる系が確立できたことで、様々な検討を進めてゆくことが可能になった。その検討の過程で、Cpf1/Cas12a 活性の温度依存性曲線が鋭いピークを有することから、培養温度を 25 から上昇させることを試みた。その結果、Cpf1/Cas12a による切断効率が劇的に向上することが判明した。酵母の場合には、酵母自身の生育とのバランスもあって 30 で培養するとよいことが判明した。その結果、有効な gRNA を同定することが容易になった。切断のみならず dCas12a による視覚化においても劇的な改善が認められた。更に、最近になって報告された改良型の enAsCas12a の導入にも成功した。これにより、ようやく dCas12a を利用する目的が立ち、当初予定していた計画 1) と 2) に着手できる体制が整った。

また、この研究の過程で開発した Rad52-GFP 株を用いる方法は、酵母以外の生物でも同等のアッセイを組むことが可能であり、簡便な gRNA の in vivo 機能評価法として、ゲノム編集研究全般に有用な方法のプロトタイプとなると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岡田 悟
ローマ字氏名：Satoshi Okada

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。