

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2018～2019
課題番号：18H06050・19K21180
研究課題名(和文)塩基置換を利用したゲノム編集技術の最適化

研究課題名(英文)Optimization of base editing technology

研究代表者

吉岡 伸 (Yoshioka, Shin)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命助教

研究者番号：50821980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：Target-AIDを含むbase editingはDNA二本鎖切断を介さず直接ゲノムの書き換えを行うことができるゲノム編集技術である。これまでの研究によりTarget-AIDの構成因子であるCDA1をCas9のN末側に付加することでより効率よく塩基編集を行えること、sgRNAの長さを長くあるいは短くすることでediting windowのピークの位置が変わることを明らかにした。これによりTarget-AID技術の基礎的知見の集積を行うことができた。一方、更なる改良を目指しCas9とCDA1を結ぶリンカーの最適化を試みたが、現行のリンカーと比較してゲノム編集効率の点では改善は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

塩基編集技術はDNA二本鎖切断を介さず直接ゲノムを書き換えることが可能であることから、DNA二本鎖切断を前提とする一般的なCRISPR/Cas9 systemと比較してより安全におよび正確にゲノム編集を行うことができる。これらのことから医療などへの応用展開が期待される重要なゲノム改変技術である。その為、本研究を通して得られた基盤技術であるTarget-AIDの特性は今後の応用へ向けた技術開発に重要なものとなる。

研究成果の概要(英文)：Base editing such as Target-AID is a new genome editing technology that enable direct DNA base conversion without DNA double strand break. This technology has advantages such as lower cytotoxicity and easier introduction of targeted base replacement compare to the conventional genome editing tools. We found that the CDA1 attached to the N terminal of nCas9 increased genome editing efficiency. Also, to shorten or lengthen the sgRNA shifted editing window.

研究分野：ゲノム編集

キーワード：Base editing ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集技術はゲノム上の任意の場所を編集することができるツールであり、研究現場だけでなく、医学、農学および工学など様々な分野への応用に期待が寄せられている。特に、CRISPR/Cas9 systemはその簡便性から爆発的に普及しているゲノム編集ツールである。しかし、本技術は DNA 二本鎖切断を前提としているため、安全性および正確性の観点に課題を残している。一方、Target-AID を含む base editing 技術はニッケース型 Cas9 (nCas9) とデアミナーゼを組み合わせたものであり、DNA 二本鎖切断を介さずに直接ゲノムを書き換えることができるツールである。しかし、base editing 技術にも様々な改善点が残されている。

2. 研究の目的

本研究は Target-AID の利便性を向上させるための検討を実施し、それらを統合的に組み合わせることで最適化を図ることおよび基礎的な知見の集積を目的としている。

3. 研究の方法

(1) Target-AID 構成因子の配置の検討

Target-AID は DNA にニックを入れる nCas9 にエフェクターとしてデアミナーゼである CDA1 および塩基編集効率を高めるために uracil glycosylase inhibitor (UGI) を付加している。これらの因子の配置はゲノムへのアプローチに重要であるが、いまだに検討されていなかった。そこで、最適な配置を検討するために全てのパターンの配置のプラスミドベクターを作製し、その編集効率を我々が開発した GFP 回復アッセイ (塩基編集されると光らない変異体 GFP から正常な GFP になる) により検討した。なお、GFP 陽性細胞数は FACS により検出した。

(2) sgRNA の長さの検討

CRISPR/Cas9 system の sgRNA の長さは一般的に 20bp である。この sgRNA の長さを変えることで塩基置換が生じる場所 (editing window) にどのような影響を及ぼすかを検討するため、16bp から 24bp までの長さの sgRNA 搭載プラスミドベクターを作製し、塩基編集効率を次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンスにより評価した。

(3) Linker の検討

Target-AID の最適化の一環として Cas9 と CDA1 を繋ぐ linker の検討を行った。Linker はオリジナルの SH3 linker、flexible linker として GS linker 二種 (90bp および 180bp)、Rigid linker として EAAK linker を用いた。編集効率は FACS を用いた GFP 回復アッセイにより行った。

4. 研究成果

(1) Target-AID 構成因子の配置の検討

Target-AID の構成因子の配置を検討したところ、オリジナルの Target-AID (nCas9-CDA1-UGI) と比較して、CDA1 を nCas9 の N 末端に、UGI を nCas9 の C 末端に付加したバージョン (CDA1-nCas9-UGI) において高い塩基編集効率を示した。一方その他の配置 (UGI-CDA1-nCas9、UGI-nCas9-CDA1) に関してはオリジナルの配置と同等の塩基編集効率であった。また、CDA1 を nCas9 の N 末端側に付与することで editing window が広がる可能性も示唆された。これらのことから、実際の標的配列や目的に合わせて Target-AID の配置を選択することで塩基編集の幅を広げることが可能となった。

(2) sgRNA の長さの検討

sgRNA の長さを検討したところ、基本の長さ (20bp) から短くすることで editing window のピークの位置が PAM の近位方向に移ること、逆に長くすることで PAM から遠位方向に移ることが示された。Target-AID の課題の一つに、編集したい塩基が editing window 内の最適な位置に存在せず、効率的な編集を行えないことがある。sgRNA の長さを変えることは非常に簡便な作業であることから、sgRNA の長さを変更することでより効率的な編集が可能となることが期待できる。また、最近では様々な base editing 技術が開発されており、それぞれに違う editing window を持つことが示されてきている。そこで、それらの技術と sgRNA の長さを組み合わせて利用することで、より大きな効果が得られると推測される。

(3) Linker の検討

オリジナルの Target-AID(nCas9-CDA1-UGI)を基盤に nCas9 と CDA1 を繋ぐ linker の検討を行った。結果として、オリジナルの SH3 linker よりも効率的な linker は見つけることができなかった。特に flexible linker である GS linker の 90bp のバージョンにおいて著しい編集効率の低下が認められ、180bp 長の linker では 90bp 長と比較して塩基編集効率の改善が認められた。このことから linker の長さが重要なポイントであることが判明した。現段階では最適な長さの linker は特定できていないため、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉岡 伸
2. 発表標題 Base editing技術の最近の動向
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会（招待講演）
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----