

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2019～2020
課題番号：19K22380
研究課題名（和文）『細胞分裂依存バーコードによる細胞分裂数計測・全系統樹トレーシング』技術の開発

研究課題名（英文）CRISPR/Cas9-mediated base-editing enables a chain reaction through sequential repair of sgRNA scaffold mutations

研究代表者
田中 洋介（Tanaka, Yosuke）
東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：10509087
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）：本研究では、細胞内連鎖反応システム（nCAs9-CDAを用いた連続的sgRNA発現システム）を構築した。本システムでは、sgRNAのスキヤフォールド領域あるいはTATAloxPの逆向き反復配列領域のT塩基からC塩基への置換をnCAs9-CDAで修復することで、次のsgRNAの発現を誘導するシステムである。実際に、哺乳類細胞（293T細胞）において、sgRNAのスキヤフォールド変異の修復を通してsgRNAの発現が連鎖するシステムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究において、sgRNAの連鎖反応を哺乳類細胞で実現できた。本研究においては、この連鎖反応を細胞周期と連動した反応にできれば、細胞が何回分裂したかを計測可能になる。また、細胞内において制御できる連鎖反応を実現した本研究の技術は、様々な連続した現象・反応を細胞内で計測するような研究への応用が期待できる。本研究計画的には、マイルストーンの前半が終わったにすぎないが、本研究で実現できたsgRNAの連鎖反応は、前述したように様々な研究分野における新しい計測技術の基礎となるものであり、学術的意義は非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we designed two cellular chain reaction systems that enable sequential sgRNA expression in mammalian cells using a nickase Cas9 tethering of a cytosine nucleotide deaminase (nCAs9-CDA). In these systems, the thymidine (T)-to-cytosine (C) substitutions in the scaffold region of sgRNA or TATA box containing loxP sequence (TATAloxP) are corrected by the nCAs9-CDA, which leads to expression of next sgRNA. These reactions can proceed several times, thus generating cellular chain reactions. As a proof of the concept, we established a chain reaction through the repair of sgRNA scaffold mutations in 293T cells. Importantly, the results obtained in yeast or in vitro were not consistent with those in mammalian cells, suggesting that the in vivo chain reactions need to be optimized in appropriate cellular contexts. Our system may lay the foundation for building cellular chain reaction systems that have a broad utility in the future biomedical research.

研究分野：細胞生物学

キーワード：nCAs9-CDA TATAloxP

1. 研究開始当初の背景

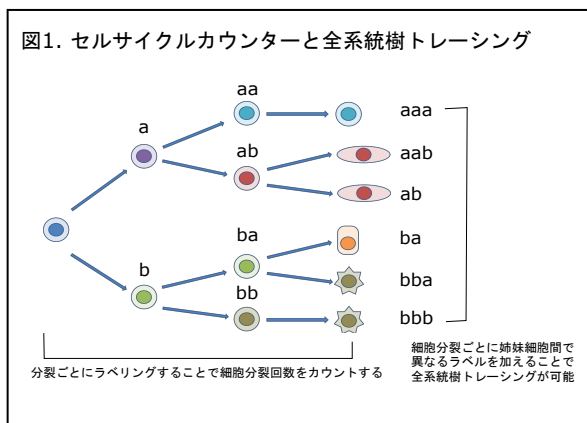
『幹細胞が成熟細胞に分化する過程において何回細胞分裂を経ているのか?』

『成熟細胞の分化系統と細胞分裂回数との間に何らかの法則性があるのか?』

申請者は、造血幹細胞の研究を行ってきたが、常にこの疑問があった。造血幹細胞は全ての血液細胞を作り出せる組織幹細胞である。幹細胞研究分野においては最も研究が進んでいる分野であり、造血幹細胞から様々な成熟血液細胞への分化の系統樹は幹細胞分化モデルのお手本となっている。しかしながら、これらの疑問に対する知見はない。細胞分裂回数と細胞分化との関連性を調べるためには、細胞分裂回数のカウントと同時に幹細胞から成熟細胞までの系統樹を追えるリネージトレーシングとを同時に行うことが必要である。リネージトレーシングシステムについてはこれまでに様々な手法が考案されている。例えば、Cre-LoxP システム、ランダム DNA バーコード、多色蛍光色素のランダム発現を利用した単一細胞レベルでのトレーシングなどがある。しかしながら、全系統樹トレーシング (細胞が分裂し増殖していく段階で全ての子孫細胞にランダムなラベルを導入することで、由来クローンのみではなく、どの時点で同クローン内の細胞と運命を分けたかを解析できるシステム) は未だ構築されていない。

2. 研究の目的

造血幹細胞から様々な成熟血液細胞が分化してくるまでの細胞分裂回数と分化細胞系列との関連性を調べるために、『細胞分裂回数の計測とリネージトレーシングが同時に行えるシステムの構築』を行う (図1)。リネージトレーシングについては、Cre-LoxP システム、ランダム DNA バーコード、多色蛍光色素のランダム発現を利用した単一細胞レベルでのトレーシングまで様々な方法がある。問題は細胞分裂回数のカウントシステムである。そこで本研究では、細胞分裂回数のカウントシステムの開発に焦点を当てて研究を進める。

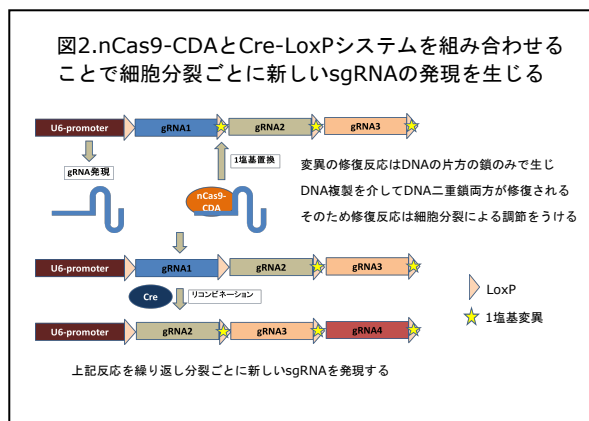


3. 研究の方法

今回我々は、nCas9-CDA システムに Cre-LoxP システムを組み合わせることで細胞分裂ごとに次の反応の活性化、前の反応の停止できるシステム、すなわち細胞分裂依存的に Cre-LoxP 反応が起きるシステムを考案した。

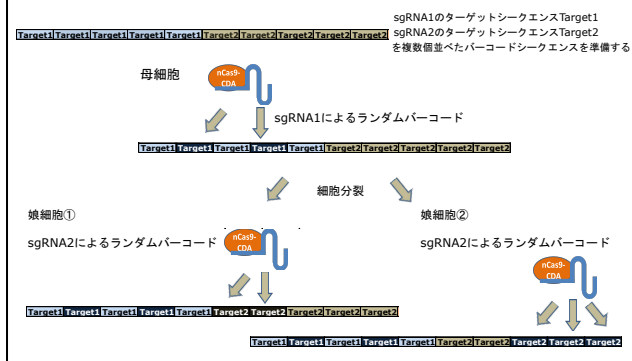
【方法論】

具体的には、図2に示した LoxP で挟まれた sgRNA が連鎖する構造を作成する。sgRNA の 3' 側に 1 塩基置換を加え不活性型となっている LoxP (Hartung et al, 1998) を用いることで、直前にある sgRNA1 を用いた nCas9-CDA により変異が修復され活性型となると Cre リコンビナーゼにより sgRNA が除去されると同時に、直後に存在する sgRNA2 (先ほどの sgRNA とはターゲットシーケンスが異なるもの) がプロモーター直下に入る。nCas9-CDA による変異型 LoxP の修復反応は DNA の片方の鎖のみの 1 塩基置換のため DNA 複製を介することで DNA 二重鎖両方が修復される。したがって、変異型 LoxP の nCas9-CDA による修復は細胞周期依存的に生じることになり、sgRNA を複数準備することにより同反応が細胞分裂ごとに連鎖する。U6 プロモーターからシーケンスすることにより何番目の sgRNA 配列が検出されるかで細胞分裂数の測定が可能である。なお、事前実験にて in vitro にて 1 塩基



/置換にて Cre リコンビナーゼにより組み換えを生じない変異体 (mT1 と mT13) の作成に成功している。全系統樹トレースのためのバーコード配列については、sgRNA1, sgRNA2...のターゲット配列を複数個含むものをバーコードシーケンスとして準備する。1 回目の分裂で sgRNA1 のターゲットシーケンス、2 回目の分裂で sgRNA2...のターゲットシーケンスにランダムに複数の置換を生じることで、娘細胞間で異なるバーコードを、細胞分裂ごとに異なるバーコードとして記録可能である (図 3)。

図3.sgRNAのターゲットシーケンスを複数個ならべることで娘細胞間で異なるバーコード記録を行う

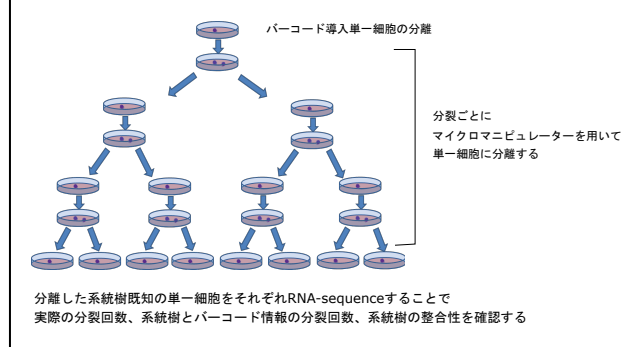


【研究方法】

/変異型 LoxP の nCas9-CDA による修復にて LoxP の再活性化が可能なことを確認する。その後、変異型 LoxP(を用いた Cre 誘導型蛍光色素のベクターを培養細胞に導入し、タイムラプスライブセルイメージングを用いて変異修復の細胞周期との相関、その効率について検討する。変異型 LoxP の nCas9-CDA による修復の効率は本システムにおいて最も重要な点であり、うまくいかなかった場合や効率が低い場合は変異型 LoxP の作成方法から見直す。

全系統樹トレース用バーコードをプロモーター下に置いたベクターを作成し、nCas9-CDA、変異型 LoxP-sgRNA 連鎖構造と共に培養細胞に導入しバーコードへの記録が可能であるかを検証する。単一細胞 RNA シーケンス解析にてバーコードシーケンスの取得が可能であることを確認する。正確性の評価としては、単一細胞を分裂ごとにマイクロマニピュレーターで分離し培養を続け、6 回分裂したところ (1 細胞から最大で 64 細胞になった時点) で単一細胞 RNA シーケンス解析にてバーコードシーケンスと実際の系統樹の整合性を評価することで行う (図 4)。

図4. 単一細胞を分裂ごとに分離しバーコードの整合性の確認を行う



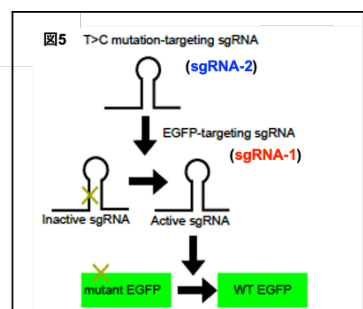
上記の方法にてバーコードの記録、検出が可能であり、全系統樹トレーシングの整合性が十分に高いと評価した段階で、バーコード配列を人工染色体にて導入したマウス、nCas9-CDA を発現したマウス、変異型 LoxP-sgRNA 連鎖構造を有するマウスの作成を行いマウスのかけ合わせにより全構成要素を有するマウスを樹立する。

4. 研究成果

細胞分裂ごとに DNA バーコードに変異を加えるシステムの開発を行った。このシステムには反応が連鎖的に進行するシステムの開発と、その反応の連鎖を細胞周期に 1 回生じるように調節するシステムの開発、反応の進行に伴いランダム配列を生じるバーコードの開発が必要である。そのうち今回の研究において哺乳類細胞において反応が連鎖的に進行するシステムの開発に成功した。今回我々は変異を加えることにより不活性化した sgRNA 及び loxP 配列を nCas9-CDA による遺伝子編集技術を用いて修復することで活性化する反応を検討した。nCas9-CDA は sgRNA により指定された目的の配列上の C を T に 1 塩基置換が可能である。sgRNA、loxP 共に変異を加えることにより不活性化した変異体の作成に成功した。また、sgRNA については不活性化型 sgRNA を nCas9-CDA による 1 塩基置換により修復することで再活性化する反応の連鎖に成功した。loxP については、現在検討中である。

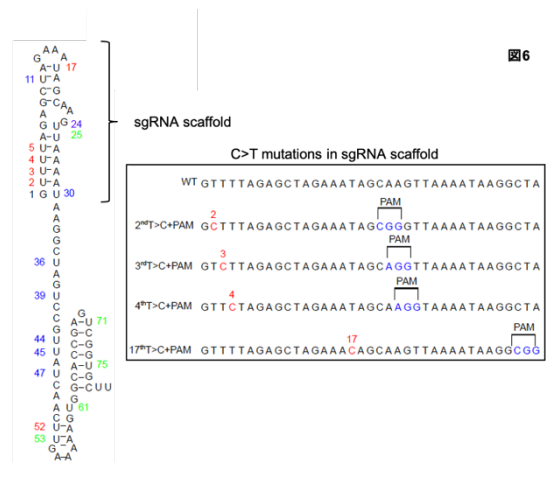
①sgRNA 連鎖反応

mtGFP(開始コドンの ATG を GTG に置換した GFP)を修復する sgRNA (sgRNA1)の不活性化型を作成し、この不活性化型 sgRNA1 を活性化型へと修復できる sgRNA2 を作成する。sgRNA2 が不活性化型 sgRNA1 を修復し、活性化型 sgRNA1 が mtGFP を修復することができれば GFP が光る (図 5)。このシステムにより sgRNA が連鎖するかどうかの検証を行った。



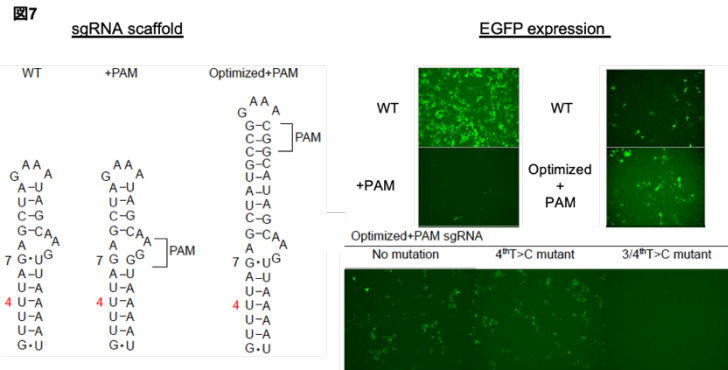
1-1. 不活性型 sgRNA1

CをTに1塩基置換が可能である nCas9-CDA を用いて修復可能な不活性型 sgRNA を得るために、sgRNA の構造内の 2, 3, 4, 5, 17, 52 番目の T をそれぞれ C に置換した変異体を作成した (図 6)。nCas9-CDA が C を T に変換するには、その下流 18bp に PAM 配列 (NGG) が必要である。そこで、T を C に置換した塩基からその下流 18bp に PAM (配列) をさらに導入した。酵母を用いたスクリーニングによりこれらの変異体の活性を検証し、4 番目の T を C に置換した変異体 (sgRNA1^{4thT>C}+PAM) のみが不活性型になることを明らかにした。次に、mtGFP (開始コドンの ATG を GTG に置換した GFP) を発現する哺乳類細胞とそれを修復



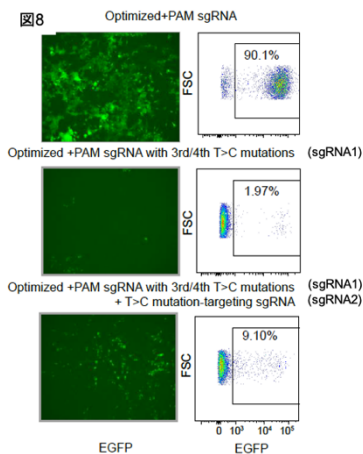
できる sgRNA1 を用いて不活性型 sgRNA1 の検証を行った。酵母とは異なり、野生型 sgRNA1 に PAM 配列を挿入しただけで sgRNA1 の機能が低下することがわかった。そのため PAM 配列の挿入により機能が低下しない sgRNA1 を検討した。sgRNA の Stem loop といわれる構造は改変により sgRNA の機能が低下しないことが知られている。この Stem loop を延長し、その内部に PAM 配列を挿入した sgRNA (sgRNA1^{optimized-PAM}) では野生型の機能低下を防ぐことができた。次に、不活性型を得るために sgRNA1^{optimized-PAM} の 4 番目の T を C に置換した変異体を作成した (sgRNA1^{optimized-PAM+4thT>C})。しかしながら、これも酵母とは異なり sgRNA 活性を保たれたままであった。そこで、sgRNA1^{optimized-PAM+4thT>C} の 4 番目以外の T を C に

それぞれ追加で変異を加えた変異体を作成し、活性が消えるかどうかを検証したところ、3 番目の T を C に追加で置換することで、その活性が消失することがわかった (図 7)。最終的に、不活性型 sgRNA1 (mtGFP を GFP に修復する sgRNA: sgRNA1^{optimized-PAM+3rdT&4thT>C}) の作成に成功した。



1-2. sgRNA 連鎖反応

1_1 で作成した sgRNA1^{optimized-PAM+3rdT&4thT>C} を修復できる sgRNA2 を用いて連鎖反応を検証した。方法としては、mtGFP と nCas9-CDA とを発現する 293T 細胞に、①sgRNA1、②sgRNA1^{optimized-PAM+3rdT&4thT>C}、と③sgRNA1^{optimized-PAM+3rdT&4thT>C}+sgRNA2 をそれぞれ導入し、GFP の蛍光強度を比較検証した。③において効率は悪いながらも GFP の傾向が観察できたことから、sgRNA 連鎖反応を確認できた (図 8)。したがって、スキヤフォールド部位に上記で示した変異並びに PAM 配列を導入することで sgRNA を不活性化することができ、さらに nCas9-CDA を用いて修復することで再活性化が可能であることを示した。



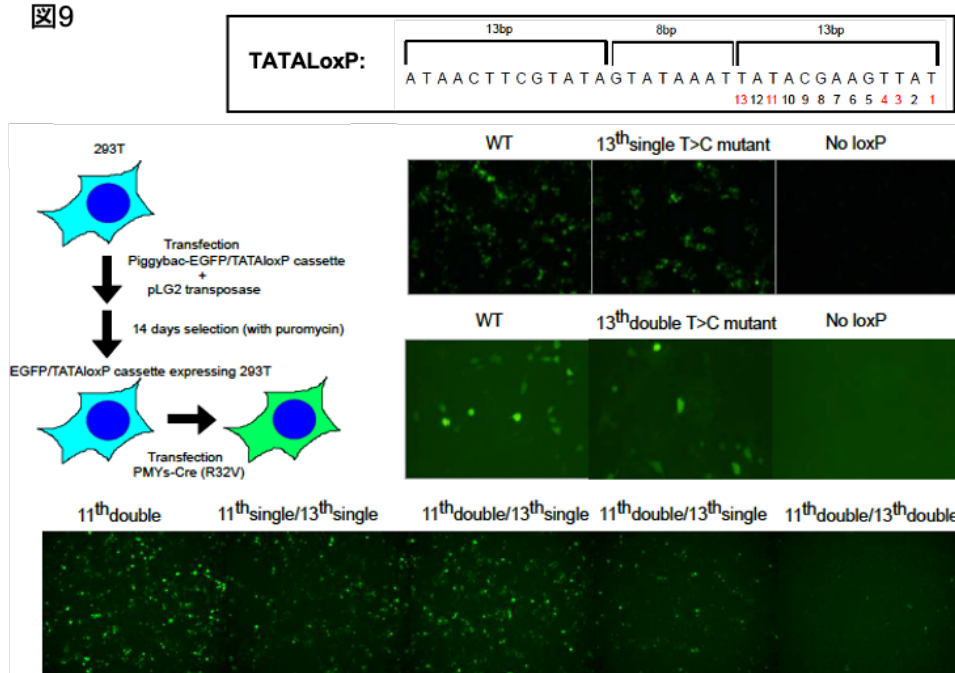
②loxP 連鎖反応

2-1. 不活性型 loxP の作成

図 9 に示すように loxP は 13bp からなる逆反復配列を持ち、それぞれの反復配列に 5 個の T、計 10 個を有する。1-1 と同様にそれぞれの T を C に置換した変異型 loxP をを作成し、in vitro で Cre と反応させることにより組換え効率を検証した。結果として、片方あるいは両方の反復配列の 13 番目の T を C に置換することにより組換え効率が著しく低下した。次に、哺乳類細胞における loxP の不活性化を検証するために、EF1 α -TATAloxP-polyAstop-loxP-EGFP カセットを用いた。Cre による組換え反応が起きると、loxP に挟まれた polyAstop が外れることで EGFP が発現する。TATAloxP の片方あるいは両方の反復配列の 13 番目の T を C に置換した変異体でも EGFP の蛍光強度が落ちることはなく、哺乳類細胞においては、不十分であることがわかったので、13

番目の T に加えて他の T も C に置換した変異体を作成した。これらの変異体の解析から、両方の反復配列の 11 番目と 13 番目の T を C に置換することで、Cre の組換え反応を阻害できることを明らかにした。

図9



2-2. loxP 連鎖反応

TATAloxP の両方の反復配列の 11 番目と 13 番目の T と置換した C のうち 1 つでも T に戻すことができれば、Cre による組換え反応が可能になる。そこで、293T 細胞に Cre と EF1 α -TATAloxP^{11th&13thT>C}-polyAstop-TATAloxP-EGFP のコンストラクトを導入し、安定発現株を樹立後、nCas9-CDA と 13 番目の C を T に戻す sgRNA とを導入することにより、EGFP が発現するかを検証した。しかしながら、EGFP の発現は確認できなかった。現在、11 番目の C を T に戻す sgRNA を作成し、2 種の sgRNA を同時に導入することを検討中である。

今後の研究の推進方策

反応の連鎖は達成されたため、今後は細胞周期依存的に反応を制御するシステムの開発を行う。細胞周期依存的にタンパク分解を誘導するデグロンを用いる方法を検討している。このデグロンと nCas9-CDA の融合タンパクを作成し、細胞周期依存的な sgRNA の修復を行う。これまでに 5' 末端または 3' 末端にデグロンを融合した nCas9-CDA の検討を行ったが、これらの融合タンパクでは細胞周期依存的な制御が困難であった。そのため今後はデグロンを複数個導入することで制御が可能であるかを検討する予定である。その他の方法として M 期における核膜崩壊を利用する方法も検討する予定である。nCas9-CDA の核内移行シグナルを欠失させることにより G0/G1/S/G2 期では修復反応が起こらないようにすることで、M 期のみで修復を可能にする方法である。

次に DNA バーコードの開発を行う。系譜解析に反応の進行に伴い、ランダム配列が生み出される DNA バーコードが必要である。しかしながら nCas9-CDA は PAM 配列の上流 18bp の C を T に変換する酵素で、この酵素による塩基置換ではランダム配列の作成が困難である。そのため 2 つの方法で反応の進行に伴い、ランダム配列が生み出される DNA バーコードの開発を行う。1 つ目は sgRNA の配列を複数個準備する方法である。nCas9-CDA による修復効率は 100%ではないので、修復のパターンによりランダム配列を得ることができる。2 つ目はことなる PAM 配列を認識する Cas9 を用いる。異なる PAM 配列を認識する Cas9 を nCas9-CDA とは別に導入することで、Cas9 による 2 重鎖切断後のエンドヌクレアーゼによる消化によりランダム配列を得ることが可能である。すべての系が完成した際には実際にヒト細胞に導入し、実際の系譜と DNA バーコードによる系譜が可能であるかの確認を行う予定である。

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〕

〔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
---------	---------