

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00413

研究課題名（和文）新規テクノロジー開発を見据えた新規Casタンパク質候補の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of novel Cas protein candidates for development of new genetic engineering technology

研究代表者

石野 良純（Ishino, Yoshizumi）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：30346837

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 35,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、代表者が自ら作製した、海水中の微生物メタゲノム配列データベースを利用して、その中からCRISPR用の配列を抽出し、その近辺のタンパクコード遺伝子を探索することによって、新規CRISPR-Cas候補を抽出した。候補となるCRISPR-Cas候補が合計10種類見つかった。それらを順番に解析した。Casエフェクター候補遺伝子をクローニングして、大腸菌を宿主として産生させたCasタンパク質を精製し、性質解析をおこなった結果、二種のミニチュアCasについて、crRNAの同定、PAM配列の同定、そして、それらを用いてターゲット遺伝子を切断することを証明したので、ゲノム編集への実用化が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、実施者が計画した戦略により、新規のCRISPR-Casを同定することができることを実験で証明したものであり、実際に本研究で見つかったものはゲノム編集技術に利用できる有用な資源となるので、ゲノム編集技術の幅が広がり、極めて社会的意義は大きい。また新規CRISPR-Casの性質を解析することは、CRISPR-Casの生理的な意義と作用機序の理解のためには貴重な材料となり、CRISPRの生物学の学術的発展に大きく貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, the principal investigator used a database of microbial metagenomic sequences in seawater, which he had created themselves, to extract sequences for CRISPR from it, and searched for protein-coding genes in the vicinity of the sequences to identify new CRISPR-Cas candidates. A total of 10 CRISPR-Cas candidates were found. The genes for the candidate Cas effector were cloned, and Cas proteins were produced in *E. coli*, and characterized them in vitro. The results of this study demonstrated that two types of miniature Cas proteins were identified with their crRNAs, PAM sequences, and cleave activity for the target genes.

研究分野：農芸化学

キーワード：クリスパー 生体防御 ゲノム編集ヌクレアーゼアーキア

1. 研究開始当初の背景

CRISPR (クリスパー) は Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat の頭文字をとったものであり、また CRISPR に付随して、保存された配列のタンパク質をコードする遺伝子は Cas (CRISPR-associated) と呼ばれる。本研究は CRISPR-Cas の基礎生物学を推進することを提案したものであった。CRISPR は保存された 30 塩基対の配列が一定の間隔を置いて何度も繰り返される独特の DNA 領域として、本研究の代表者が 35 年前に発見したもので、後にそれが原核生物(バクテリア、アーキア)の獲得免疫機能を担うものであることが分かった。そして、その原理を利用して、生物のゲノム DNA の狙ったところを特異的に切断する「ゲノム編集」技術が開発されたことにより、CRISPR (クリスパー) の名は全世界に広がり有名になった。技術開発に利用された CRISPR-Cas は連鎖球菌由来の CRISPR-Cas9 であるが、既知のバクテリアの約半分、アーキアの 9 割弱が所有しているものであり、その繰り返し配列の回数や長さ、また付随する Cas タンパク質の種類は顕著に多様化しており、その作用機序も多様である。地球上には未だ未同定のバクテリア、アーキアが膨大に存在することから、まだまだ未知の CRISPR があり、まだ解明されていない機能が存在すると予想される。本研究計画では、申請者が自ら作製した海洋メタゲノム配列データベースの中から未知の CRISPR-Cas を推定し、その機能を解明すること、および、それらを新技術開発の材料として応用することを提案するものであった。

CRISPR-Cas は、多くのバクテリア、アーキアのゲノム中に存在し、多様性に富んでいる。現在までに提唱されている分類分けによると、2つのクラス(クラス1、クラス2)に分けられ、それぞれの中に3つのタイプ(クラス1にタイプI, III, IV、クラス2にタイプII, V, VI)が存在する。クラスの違いは、実際に外来 DNA を切断するヌクレアーゼの働きをする Cas エフェクターが多種タンパク質の複合体であるか、単一タンパク質であるかの違いであり、単独エフェクターである Cas9 に代表されるクラス2が主としてゲノム編集に利用しやすい。その後、このクラスに属する他の Cas エフェクターが見つかり、Cas12, Cas13 と呼ばれるようになった。このような現状から、未知の CRISPR を探索すれば、まだまだ異なる性質をもった CRISPR-Cas が見つかると思った。顕著な多様性を示す CRISPR の機能として、獲得免疫だけに留まらず、また知られていない新たな機能が発見される可能性もある。地球上に生息する微生物について、我々はまだほんの一部を知っているに過ぎない(図5)。これまでの人類の歴史の中で、我々は地球上のバクテリア、アーキアの極一部(1%未満)を同定したに過ぎず、未同定の原核生物数は計り知れない。そして、それらのゲノム中には多くの未同定の CRISPR が含まれているであろう。これらについて性質解析することによって、CRISPR の持つ新たな機能解明に繋がり、既知の CRISPR-Cas とは異なった性質のものが見つければ、ゲノム編集技術のバリエーションが広がる。そればかりか、また新たな遺伝子工学技術開発のツールとなり得る可能性も有している。「CRISPR の生物学」はサイエンスとテクノロジーの両面で、重要な研究領域であると考えられる。

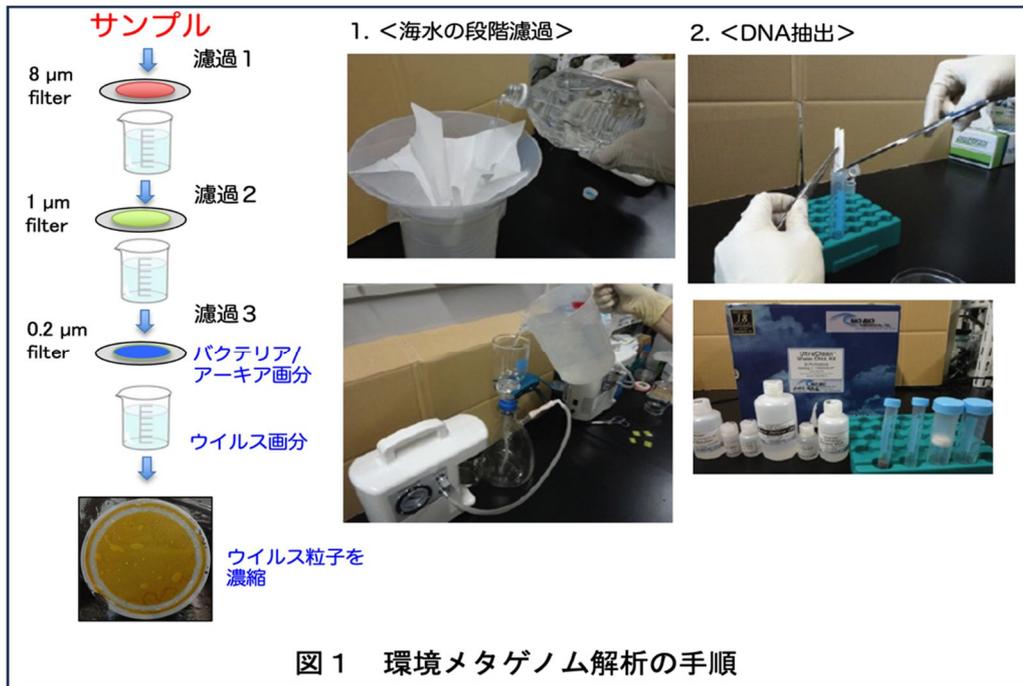
本研究の代表者は、農水省技術会議の5年プロジェクト(海洋微生物解析による沿岸漁業被害の予測・抑制技術の開発、H23-27)および、科学技術振興機構の海洋メタゲノム解析に関する6年プロジェクト(海洋生物多様性および生態系の保全・再生に資する基盤技術の創出、H23-28)に参加し、海水中の微生物メタゲノム解析プロジェクトを実施した。この研究は、海洋に定めた定点から海水サンプルを定期的に採取し、そこに含まれる微生物を大きさで分画し、バクテリア・アーキア画分とウイルス画分について、DNA 抽出を行い、次世代シーケンサーを用いて網羅的に DNA 配列を解読するというもので、DNA 配列の増減を基にして海洋環境の変化をモニタリングする技術を開発することが目的であった。本プロジェクトにおいて、申請者は実際に海水を採取し、微生物を分画し、DNA を抽出して配列解析を行う中核の部分を担当し、この研究手法を確立させた。

2. 研究の目的

ゲノム編集技術への応用によって CRISPR は脚光を浴び、多くの科学者が利用する時代に入ったが、自然界の CRISPR のうち、我々はまだほんの一部について知っているに過ぎない。我々は地球上のバクテリア、アーキアの極一部(1%未満)を同定したに過ぎず、未同定の原核生物数は計り知れない。そして、それらのゲノム中には多くの未同定の CRISPR が含まれているであろう。これらについて性質解析することによって、CRISPR の持つ新たな機能解明に繋がる。また既知の CRISPR-Cas とは異なった性質のものが見つければ、ゲノム編集技術のバリエーションが広がる。そればかりか、また新たな遺伝子工学技術開発のツールとなり得る可能性も有している。「CRISPR の生物学」はサイエンスとテクノロジーの両面で、重要な研究領域であると考えられる。

3. 研究の方法

本研究の方法は、メタゲノム解析データを利用して新規 CRISPR-Cas を同定し、その性質解析を行うことである。申請者は農水省技術会議の5年プロジェクト(海洋微生物解析による沿岸漁業被害の予測・抑制技術の開発、H23-27)および、科学技術振興機構の海洋メタゲノム解析に関する6年プロジェクト(海洋生物多様性および生態系の保全・再生に資する基盤技術の創出、H23-28)に参加し、海水中の微生物メタゲノム解析プロジェクトを実施した。本研究の代表者はこの海水プロジェクトにおいて実際に海水を採取し、微生物を分画し、DNAを抽出して配列解析を行う重要な部分を担当して研究手法を確立させた(図1)。それによって得られた塩基配列データは、順次コンピュータに格納し、「Ocean Monitoring Database」が構築された。プロジェクト終了時点で、このデータベースには1兆塩基以上の解読塩基データが含まれるまでになり、これは有用遺伝子を探るための貴重な資源となっている。本研究では、このデータベースを探索して新規 CRISPR-Cas を同定し、その性質解析を行って、有用ゲノム編集技術の開発に繋げようとするものである。



4. 研究成果

本研究の実施期間は2020年度-2022年度の3年間であったが、2020年度が始まる時に、コロナウイルス感染症(Covid-19)の拡大が始まり、感染防止のための行動制限が厳しく取られたため、研究活動に大きな影響が出た。そのために研究計画の変更を余儀なくされ、初年度の研究費の一部も翌年に繰越した。

この状況の中、まず、所有する配列データの中から CRISPR 配列と予想される領域を10個得ることができ、それぞれについて性質を解析することにした。CRISPR の特徴を有する繰り返し配列の近傍に位置するタンパク質コードの遺伝子の中から、エフェクターと予想される ORF を探索し、そのコーディング領域をクローニングして、大腸菌を宿主として発現させて、精製タンパク質を得るという計画であった。しかし、メタゲノムから出発する本研究の戦略上、遺伝子の正確な同定は容易ではなく、実験による試行錯誤が必要であることは、計画済みであった。実際に、うまく産生されない場合や、産生されたタンパク質が不溶化したりして、予定通りには研究は進まなかった。大腸菌を宿主とする異種タンパク質の産生系として、市販されている多くの宿主ベクター系を試したり、培養条件を検討したりしたが、不溶化が解消されない場合は、ORFを見直し、近辺に別の開始コドン候補が無いかどうか調べて、ある場合は、その ORF もクローニングして発現させた。このような試行錯誤の結果、産生された候補 Cas タンパク質を単一バンドに精製した。さらに、crRNA を推定して、Cas タンパク質との複合体を形成させて、単離した。既存の Cas9 や Cas12 よりもサイズの小さい新規 Cas タンパク質が4種以上見つかっており、ゲノム編集への応用がうまく進めば、現在広く使われている CRISPR-Cas 系よりも、より便利で使い安いツールの提供が期待される。そのために、ゲノム編集への応用な基本的性質を調べた。自己と非自己を識別するために必要な PAM 配列は、個々の CRISPR-Cas によって異なるので、それを決定するための実験系も考案し、それを実施して決定していった。

その中で、まず有明海の海水から抽出した DNA 中に見つかった新規 CRISPR-Cas について解析を進行させた。この CRISPR-Cas は図 2 に示すように、エフェクターの機能を担うタンパク質が

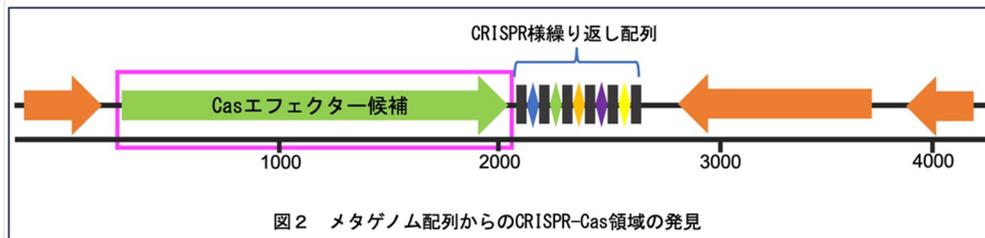


図2 メタゲノム配列からのCRISPR-Cas領域の発見

599 アミノ酸という短いタンパク質で、現在世界的に広く利用されている Cas9 の半分くらいの大きさであるためミニチュア Cas としての特徴を有する。小さなエフェクターはゲノム編集に利用する際に、標的細胞の中により導入しやすく、有利である。このタンパク質を ARI と名づけて、大腸菌を宿主としてその組換えタンパク質を精製した(図3)。また、crRNA を推定するため

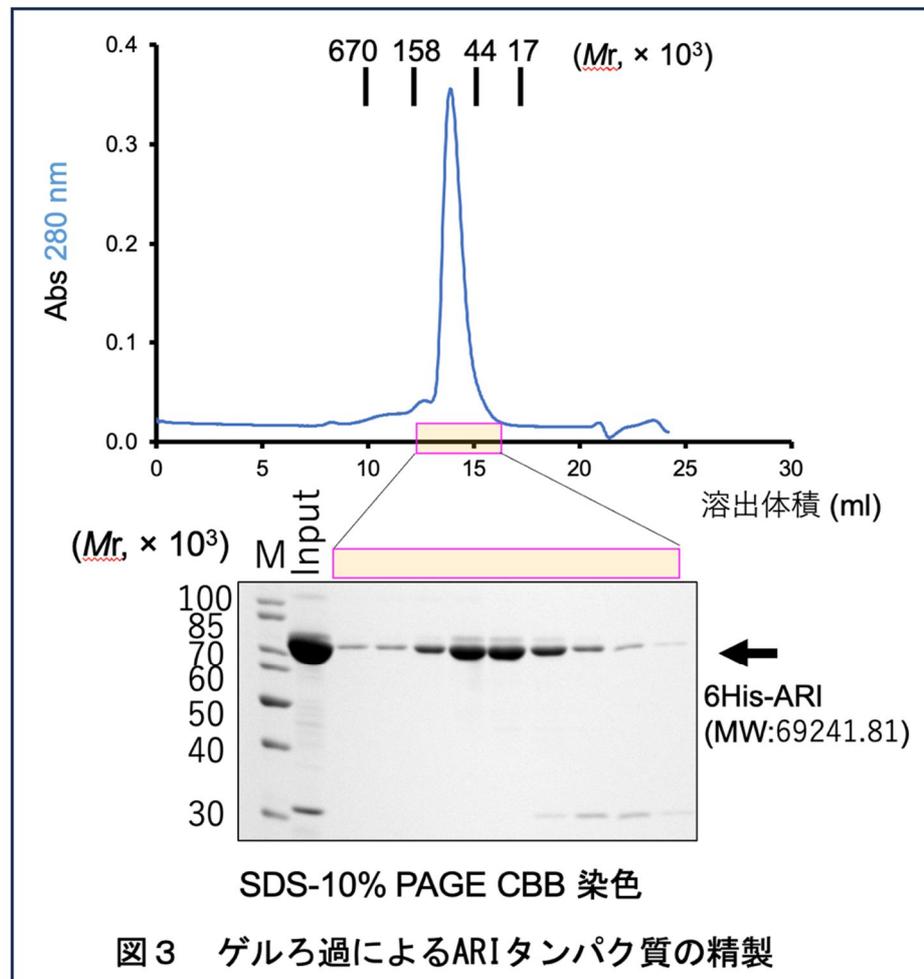


図3 ゲルろ過によるARIタンパク質の精製

に、ARI の遺伝子の周辺領域を大腸菌内に導入して共発現させ、ARI と複合体を形成することができる RNA 画分を同定した(図4)。発現させそれと混合した際には、エフェクタータンパク質

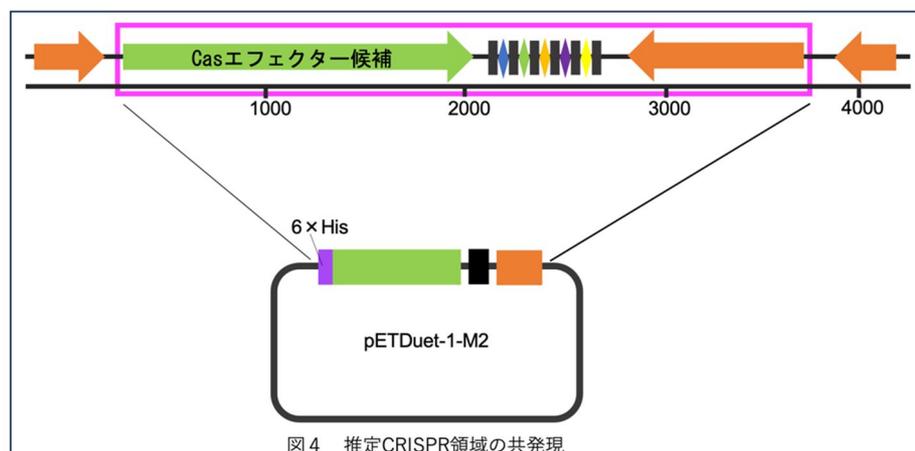
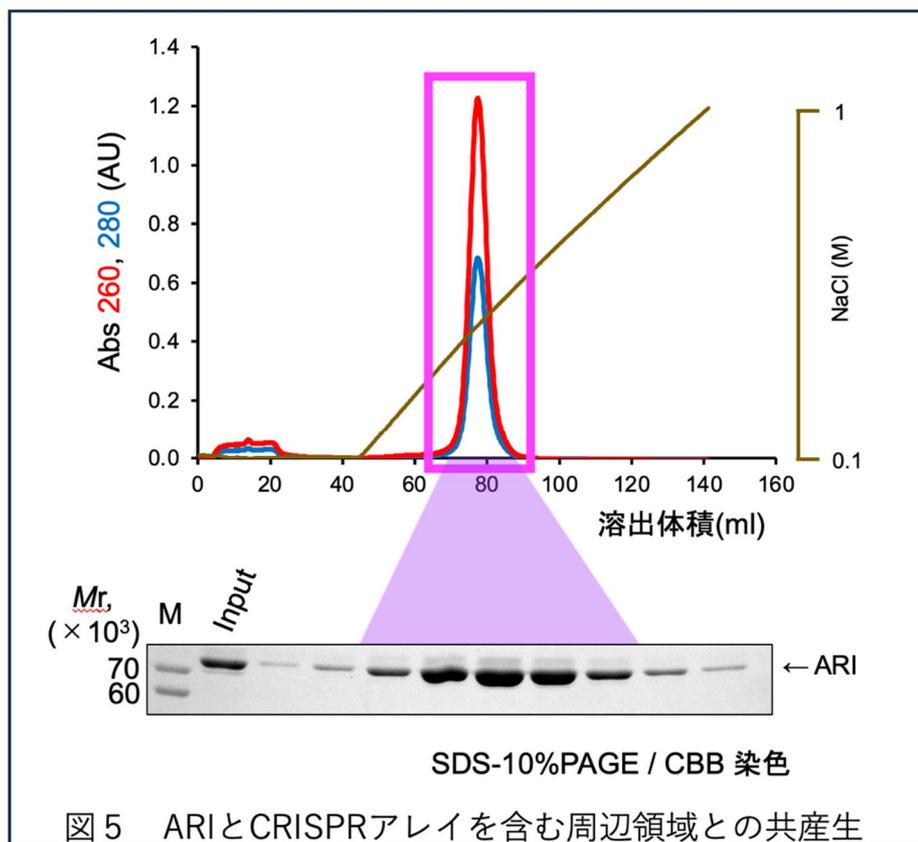
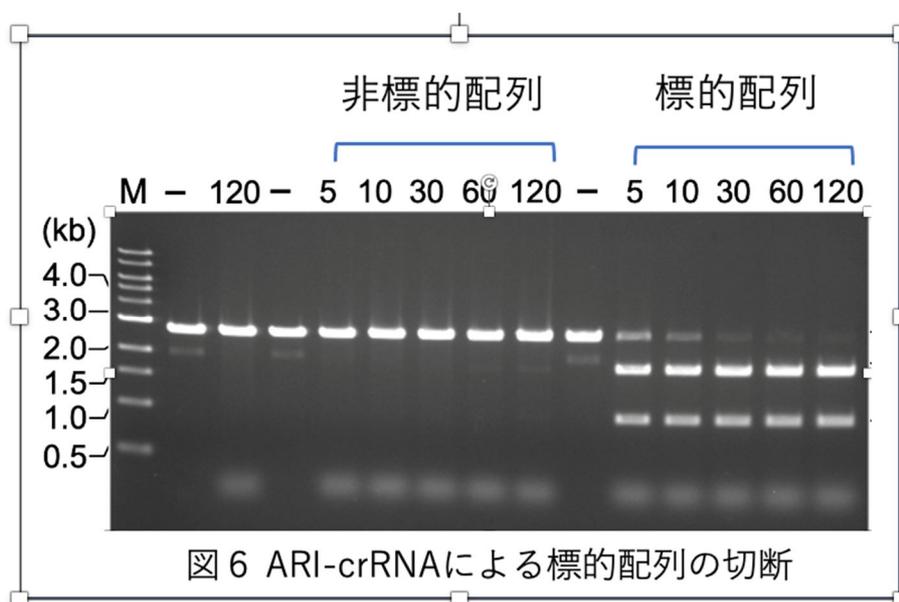


図4 推定CRISPR領域の共発現



と crRNA が安定な複合体を形成し、それがゲル濾過で単離できることも示した(図 5)。CRISPR 配列の中に特定のターゲット DNA 配列を挿入し、それを用いて、そのターゲット配列がその配列と相補的な crRNA と ARI エフェクターとの複合体によって特異的に切断されることを示した(図 6)。この結果をもとに特許出願を行った(特願 2022-148657)。出願したこの CRISPR-Cas について、高純度に精製した複合体をクライオ電子顕微鏡単粒子解析により、原子構造を決定することにも成功した。この構造情報を使って、蛋白質工学的に性質を改変した CRISPR-Cas を創製することも可能になった。さらに、東北仙台沖から採取した海水からの DNA より見出した新規の CRISPR-Cas について解析し、やはり分子サイズの小さい Cas エフェクターとして機能することを解明した。この分子については、現在出願準備を進めており、明細書を書き上げて出願予定であるため、現時点での報告を控える。これら以外の候補についても基礎解析を進めており、本研究期間終了後も引き続き解析を行うので、さらに有用な CRISPR-Cas が提供できる可能性が高い。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshizumi Ishino	4. 巻 1
2. 論文標題 Inspiration and encounters: Carl Woese and my 30 year research journey	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mLife	6. 最初と最後の頁 368-373
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mlf2.12050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 石野良純	4. 巻 72
2. 論文標題 CRISPR/Cas9を利用したゲノム編集の原理とアレルギー疾患への応用	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アレルギー（日本アレルギー学会誌）	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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8件（うち招待講演 6件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉村萌由、中野華歩、松本俊介、石野園子、石野良純、沼田倫征
2. 発表標題 メタゲノムから発見した新規な小型Casタンパク質の機能構造解析
3. 学会等名 2022年度農芸化学会西日本支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 亀甲 理、松本俊介、石野園子、沼田倫征、石野良純
2. 発表標題 温泉試料メタゲノムから見出された新規Casタンパク質の機能解析
3. 学会等名 2022年度農芸化学会西日本支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石野良純
2. 発表標題 遺伝子操作とヌクレアーゼ ゲノム編集の主役もヌクレアーゼだ！
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会 令和3年度シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石野良純
2. 発表標題 遺伝子工学技術のためのDNA修飾酵素研究の歴史
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会 第6回大会特別講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石野良純
2. 発表標題 原核微生物研究がもたらした 遺伝子操作技術からゲノム編集実用化まで
3. 学会等名 第67回 日本生化学会近畿支部例会 特別シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石野良純
2. 発表標題 CRISPRの発見からゲノム編集に応用されるまで
3. 学会等名 日本医療研究開発機構 講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石野良純
2. 発表標題 奇妙な繰り返し配列の発見から画期的ゲノム編集技術が誕生するまでCRISPRの30年史
3. 学会等名 第22回日本骨粗鬆症学会・第38回骨代謝学会学術集会 特別講演（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石野良純
2. 発表標題 CRISPR; その発見からゲノム編集技術への応用まで
3. 学会等名 第38回受精着床学会総会・学術講演会 特別講演（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 石野良純（分担執筆）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 （株）技術情報協会	5. 総ページ数 602
3. 書名 「ゲノム編集技術を応用した製品開発とその実用化」	

1. 著者名 石野良純（分担執筆）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本薬学会（株）薬事日報社	5. 総ページ数 379
3. 書名 THE 創薬	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新規Casタンパク質	発明者 石野良純 他 8 名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-148657	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	白井 剛 (Shirai Tsuyoshi) (00262890)	長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授 (34204)	
研究分担者	沼田 倫征 (Numata Tomoyuki) (10401564)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	跡見 晴幸 (Atomi Haruyuki) (90243047)	京都大学・工学研究科・教授 (14301)	

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
---------	---------