

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15776

研究課題名(和文) ウイルス様粒子を用いたCRISPR-Cas3システム送達技術の開発

研究課題名(英文) Development of CRISPR-Cas3 delivery system using virus-like particles

研究代表者

奥寄 雄也 (OKUZAKI, Yuya)

名古屋大学・生命農学研究科・研究員

研究者番号：30837208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム上に大規模な欠損を導入できる新規ゲノム編集技術 CRISPR-Cas3システムを遺伝子導入が困難な幹細胞や生物個体においても適応可能にするため、小分子依存的にタンパク質をウイルス様粒子内に封入する技術であるNanoMEDIC法を用いて、CRISPR-Cas3システムを構成するCas3タンパク質およびCascade複合体をレンチウイルス様粒子に封入するための技術を開発した。本研究の成果は、遺伝子導入が困難な細胞種へのCRISPR-Cas3システムの適応や、リピートの重複を原因とするハンチントン病や筋強直性筋ジストロフィーへの遺伝子治療への応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規国産ゲノム編集技術CRISPR-Cas3システムは、ゲノムDNA上に効率よく大規模欠損を導入できるという既存のゲノム編集技術にはない特性を持ち、様々な分野への応用が期待されている。一方常用されるCRISPR-Cas9と比べシステムが煩雑であり遺伝子導入が困難な幹細胞や生物個体への適応が困難であった。そこで本研究は、レンチウイルス様粒子の内部にCRISPR-Cas3システムを構成するRNA-タンパク質複合体を効率よく封入し、標的細胞へ送達する技術を開発した。本研究の成果は、CRISPR-Cas3システムを持ちいた幹細胞ゲノム編集治療や遺伝子治療に応用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：CRISPR-Cas3 system is the novel genome editing technology which can efficiently introduce large-scale deletion on the genome. Although CRISPR-Cas3 system is the attractive genome editing technology, it is hard to apply stem cells and in vivo because of a complex system consisting of multiple proteins and gRNAs. To tackle this problem, we have developed a delivery system for encapsulating the Cas3 protein and Cascade complex which consisted of the CRISPR-Cas3 system in lentivirus-like particles. Our new delivery system is expected to be applied to the adaptation of the CRISPR-Cas3 system for cells which is difficult to gene introduction, and to gene therapy for triplet repeat disease such as Huntington's disease and myotonic muscular dystrophy.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：ゲノム編集 CRISPR-Cas3 ウイルス様粒子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノム上の標的配列特異的に結合し DNA の切断を行う、ZFN や TALEN、CRISPR-Cas システムといった人工ヌクレアーゼの開発が急速に進んでいる[Doudna JA, et al., Science, 2014]。これら技術の発展により、部位特異的な遺伝子の破壊や修復、あるいは外来 DNA の挿入や組換えなどを行うなどのゲノム編集が、動物細胞や動物個体においても容易に行えるようになった。一方、これら既存のゲノム編集技術は、いずれも標的とする DNA 配列に二重鎖切断を導入するものであり、ゲノム上に大規模な欠損を導入するには不向きであった。これを解決すべく、我々は大腸菌由来の Type-I CRISPR システムに着目した。このシステムでは複数のタンパク質が協調して標的 DNA の切断を行うが、特にエフェクタータンパク質である Cas3 はヌクレアーゼとヘリカーゼ活性を合わせ持ち、in vitro において標的 DNA 近傍だけでなく上流側にも大規模な切断を起こすことが報告されている[Makarova KS, et al., Nat Rev Microbiol, 2015]。我々はこのシステムを改良し、ヒト細胞においてもゲノム上に大規模な欠損を導入できる新規ゲノム編集技術“CRISPR-Cas3”システムを開発した[Yoshimi, Morisaka, Okuzaki et al., Nat Commun, 2020]。我々はこれまでに、本システムを発現するプラスミドベクターを開発し、ヒト培養細胞においてその活性を確認している。しかしながら遺伝子導入が困難な初代培養細胞や、iPS 細胞由来分化細胞などでは、高いゲノム編集効率を得られないことが問題となっていた。

2. 研究の目的

この問題を解決するため本研究では、細胞種を問わずに CRISPR-Cas3 システムによる大規模な欠損を効率よく導入できる簡便な送達技術を創出することを目的とした。具体的には、当研究室が開発した小分子依存的にウイルス様粒子(VLP)内にタンパク質を封入する技術である NanoMEDIC 法を用いて、CRISPR-Cas3 システムを簡便かつ高効率に導入する技術の確立を目指した。

3. 研究の方法

CRISPR-Cas3 システムは、標的 DNA の探索と結合を担う Cascade(Cas タンパク質と crRNA のリボ核タンパク質複合体)と、それに引き続き DNA の切断を行う Cas3 タンパク質から構成される。そこで本研究では、Cascade と Cas3 をそれぞれ VLP へ封入する技術を開発し、2 種類の VLP を用いてゲノム編集を行うシステムを構築した。

1) CRISPR-Cas3 システムを VLP 内に封入する技術の開発

1-a) Cas3 封入 VLP の作製: Cas3 タンパク質の N もしくは C 末端に、FKBP-HIV-Gag タンパク質と小分子リガンドを介した二量体を形成するために必要である FRB ドメインを付加し、VLP への封入を確認した。

1-b) Cascade 封入 VLP の作製: Cas3 と同様に、Cascade を構成する 5 種類の Cas タンパク質(Cse1, Cse2, Cas5, Cas6, Cas7)に FRB ドメインを付加し、どのタンパク質に FRB ドメインを付加するのが最適かを検討する。また、Cascade の形成は、Cas6 タンパク質が crRNA を認識・プロセシングし、次いで他の Cas タンパク質がリクルートされるという順序で起こる。そこで、複合体形成の起点となる crRNA を、VLP の出芽が起こる細胞膜周辺に予めリクルートすることで Cascade の VLP への封入効率の向上を試みた。具体的には、レンチウイルスのパッケージングシグナル配列()と、自己切断活性を持つリボザイムを組み合わせることで crRNA を細胞膜周辺へリクルートし、Cascade 形成を誘導する系を構築した。また Cas6 には、crRNA の構造を認識してプロセシングをする RNase 活性があるため、リボザイムについては付加有りと無しの両方を検討した。

2) 動物細胞における CRISPR-Cas3 システム封入 VLP の評価

2-a) 作製した各 VLP の活性評価: 1) で作製した VLP を HEK293T 細胞に導入し、ゲノム編集効率を評価した。定量的な評価のため表面抗原(B2M 遺伝子)を標的とし、ゲノム編集効率を免疫染色により両アリルが遺伝子破壊された細胞の割合としてフローサイトメトリーにより算出した。

4. 研究成果

まず、FRB ドメインを N 末端に付加した Cas3 を封入した VLP を作製した。この VLP を、B2M 遺伝子を標的とする Cascade をプラスミドによりあらかじめ強制発現させておいた HEK293T 細胞へ導入し、遺伝子破壊効率を算出した。その結果 10%程度の細胞において B2M 遺伝子を両アリルで遺伝子破壊することに成功した(図 1)。このことから Cas3 タンパク質については Cas9 タンパク質と同様の手法により効率よく VLP 内部にタンパク質を封入できると考えられた。

先行研究において Cascade の形成は Cas6 による crRNA

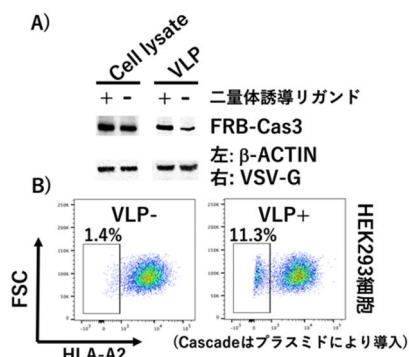


図 1: Cas3 封入 VLP の活性測定

のプロセッシングにより開始され、ついで Cas7, Cas5 タンパク質がリクルートされた後、Cse1, Cse2 タンパク質が最後に結合することで完了することが報告されている。そこで、本研究では Cascade 形成の起点となる Cas6 および最後にリクルートされるタンパク質である Cse1, Cse2 に焦点を当て FRB ドメインを付加するタンパク質の検討を行った。まず Cse1, Cse2, Cas6 をポリシストロニックに発現し、かつ各 Cas タンパク質もしくは全ての Cas タンパク質に FRB ドメインを付加したプラスミドベクターを作製した。また Cas タンパク質に付加する核移行シグナル (NLS) は、細胞内で CRISPR-Cas3 システムを機能させる場合ゲノム DNA が存在する核内へタンパク質を局在化させるために複数付加したほうが好ましいが、細胞から出芽することで形成される VLP 内部に Cas タンパク質を封入する場合は過剰な NLS の付加は逆効果になることが考えられた。そこで Cas7, Cas5 発現プラスミドベクターについては NLS を N, C 末端に付加したものおよび付加しないものを作製した。

また、crRNA 発現ベクターについては CRISPR-Cas3 システムの場合リボザイム配列の有無でゲノム編集効率に変化は見られなかった。そこで、以降の Cascade 封入 VLP 作製にはリボザイム配列を持たない発現ベクターを用いた。

ついで、これら Cas 遺伝子を発現するプラスミドベクターを用いて各 Cas タンパク質を安定発現する HEK293T 細胞を作製し、この細胞を用いて B2M 遺伝子を標的とする Cascade 封入 VLP を作製した。これら VLP を Cas3 を安定発現する HEK293T 細胞に導入し、各 VLP の遺伝子破壊効率を算出した。その結果 Cas7, および Cas5 には NLS を付加せず、Cse1, Cse2, Cas6 全てに FRB ドメインを付加した場合に最も高いゲノム編集効率を得られることが判明した(図 2,3)。

CRISPR-Cas9 システムにおいては、従来のプラスミドやアデノウイルス、アデノ随伴ウイルスを用いた DNA ベースでのゲノム編集技術は、高いゲノム編集を得られるものの長期間におよぶ Cas タンパク質の発現によりゲノム DNA 上の意図しない場所を切断してしまうオフターゲット切断や、導入した DNA がゲノム中に組み込まれてしまう可能性が、正確なゲノム編集を必要とする医療への応用を考えた場合の安全性上の課題となっていた。CRISPR-Cas3 システムについても CRISPR-Cas9 システムと同様であり、より高精度なゲノム編集には短期間かつゲノムへの組み込みの可能性がないタンパク質ベースでのゲノム編集技術の開発が重要である。本研究は、タンパク質ベースでの CRISPR-Cas3 システムによるゲノム編集技術の基盤技術として活用できると予想され、特に CRISPR-Cas3 システムが持つ大規模欠損を効率よく誘導できるという利点を生かしたゲノム DNA 上に存在するリピート配列の重複を原因とするハンチントン病や筋強直性筋ジストロフィーなどの遺伝病に対する遺伝子治療への応用が期待できる。

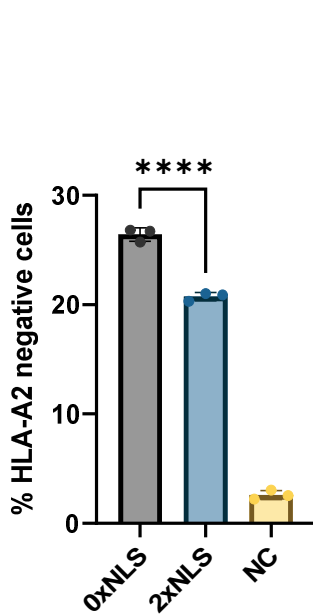


図 2: Cas5,7 に付加する NLS の条件検討

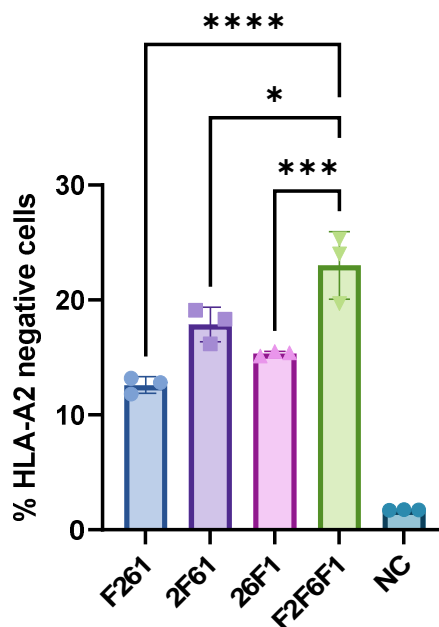


図 3: FRB ドメインを付加する Cas タンパク質の条件検討

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