

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15777

研究課題名（和文）抗CRISPRタンパク質を用いた新規ゲノム編集法の開発

研究課題名（英文）Developing a new genome-editing tool using anti-CRISPR proteins

研究代表者

弘澤 萌（Hirosawa, Moe）

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10849566

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ゲノム編集ツールを拡張していくことは、将来のゲノム編集において重要である。そこで本研究では新規ゲノム編集ツールとして、抗CRISPRタンパク質であるAcrIIA5をSpCas9に対するリクルーターとして再構築した。AcrIIA5に転写活性化因子であるVPRを融合させることで、標的遺伝子の活性化を達成した。また、E. coli tRNAアデノシン脱アミノ化酵素の変異体をAcrIIA5に融合させることにより、標的塩基の編集を成功した。本研究結果は、任意のAcrを改変することでCasタンパク質の機能を制御できる可能性を示唆し、将来のゲノム編集の幅を広げるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、抗CRISPRタンパク質の特性を利用した新規ゲノム編集ツールの開発を目指した。つまり、AcrIIA5をSpCas9に対するリクルーターとして再構築した。この基本戦略は他のCasタンパク質やAcrにも拡張可能であるとともに、AcrをCRISPR systemのOFFスイッチ以外にも利用できるという新しい視点を提供した。

研究成果の概要（英文）：Expanding genome editing tools is crucial for the future of genetic manipulation. In this study, we repurposed the anti-CRISPR protein AcrIIA5 as a recruiter for SpCas9, thereby introducing a novel genome editing tool. By attaching the transcriptional activation domain VPR to AcrIIA5, we successfully activated the target gene. Moreover, by fusing a mutant of E. coli tRNA adenosine deaminase to AcrIIA5, we achieved precise editing of the target base. These findings hint at the potential to modulate the function of Cas proteins through the modification of any Acr, thereby expanding the possibilities of genome editing in the future.

研究分野：合成生物学

キーワード：CRISPR-Cas Anti-CRISPR protein

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CRISPR-Cas システムはゲノム編集技術として基礎研究だけでなく遺伝子治療などの応用研究にも広く使われるようになってきている。ゲノムを切断することによる遺伝子のノックアウトや、相同組み換えを利用した遺伝子のノックインだけでなく、近年では、DNA の切断活性をなくした Cas の変異体 (dCas) に転写制御因子やエピゲノム制御因子などを融合させることで、標的遺伝子の発現制御やエピゲノムの制御が可能となってきた。つまり、dCas に転写活性化因子である VP64 を融合させることで遺伝子発現の活性化が達成された。しかしながら、この方法では遺伝子発現の活性化の度合いが低いという問題があった。そこで、さらなる遺伝子発現の活性化を目的として様々なシステム (SAM system、SunTag、dCas-VPR など) が開発され、現在も精力的に改良が続けられている。

近年、CRISPR-Cas システムを阻害するウイルス由来のタンパク質である Acr が発見された。これは、CRISPR-Cas システムに対抗してウイルスが進化させてきたものであり、様々な Cas に対してそれに対応する Acr がある。Acr の Cas 阻害機構は様々であり、「Cas の DNA への結合を阻害するもの」、「Cas とガイド鎖の結合を阻害するもの」、「Cas の DNA 切断を阻害するもの」などがある。近年、この Acr を「ゲノム編集の OFF スイッチ」として利用することで、より安全なゲノム編集を実行するための新規制御ツールとしての期待が高まっている。現在の Acr の使用目的はゲノム編集を制御することのみに焦点が当てられているが一方で、この様々な阻害機構をうまく利用することで Acr を新規ゲノム編集ツールとして再構築できる可能性が考えられた。本ゲノム編集ツールはゲノム編集分野の発展に貢献する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Acr を Cas タンパク質に対するリクルーターとして再構築し、新規ゲノム編集ツールとすることである。

3. 研究の方法

ゲノム編集で幅広く使用されている *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) に対する Acr として AcrIIA5 (SpCas9 と DNA の結合を阻害しないが、SpCas9 の DNA 切断を阻害する) を用いて研究を行った。つまり、AcrIIA5 にエフェクターを融合させた様々なコンストラクトを作製し、培養細胞に遺伝子導入することで SpCas9 の機能を変化させることが可能なのかを検証した。

以下に検証方法を記載する。蛍光タンパク質の発現は蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターを用いて解析した。

(1) SpCas9 の活性評価

SpCas9 の活性は EGFP 遺伝子のノックアウトにより検証した。HEK293FT 細胞と EGFP 遺伝子をゲノム上に組み込んだ iPS 細胞 (iPS-EGFP 細胞) を用いた。HEK293FT 細胞に、EGFP をコードしたプラスミド、Cas9 をコードしたプラスミド、sgRNA をコードしたプラスミド、AcrIIA5 をコードしたプラスミドを導入し、EGFP のノックアウトを行なった。EGFP の蛍光強度の低下を Cas9 の活性と定義した。iPS-EGFP 細胞を用いた場合には、Cas9 mRNA、sgRNA、AcrIIA5 mRNA を導入し、ゲノム上に組み込んだ EGFP 遺伝子のノックアウトを行なった。EGFP 陰性集団を Cas9 の活性と定義した。

(2) 遺伝子活性化の評価

遺伝子の活性化は、TRE-hmAG1 レポータープラスミドを用いて評価した。標的配列は tetracycline-responsive element (TRE) とした。遺伝子活性化が起きた場合は TRE の下流にある遺伝子 hmAG1 が発現する。HEK293FT 細胞に、TRE-hmAG1 レポータープラスミド、Cas9 をコードしたプラスミド、sgRNA をコードしたプラスミド、AcrIIA5-VPR をコードしたプラスミドを導入し、レポーター遺伝子の活性化を行った。hmAG1 の蛍光強度を遺伝子活性化の指標とした。

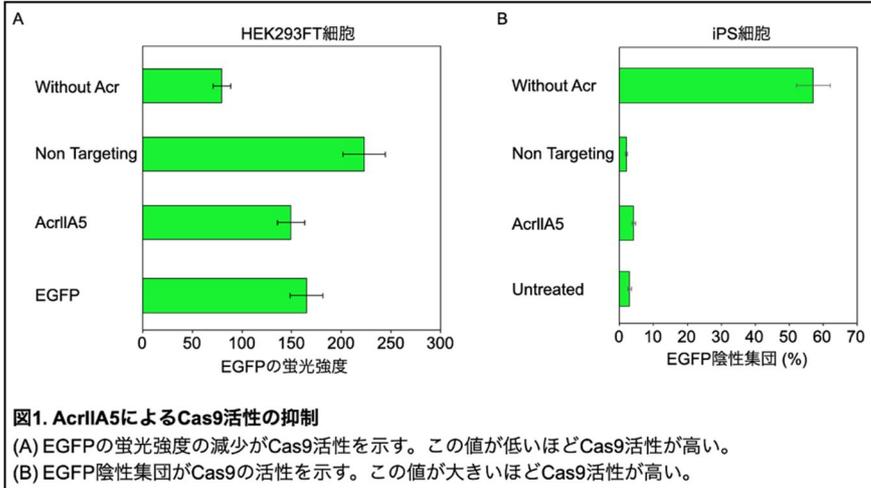
(3) 塩基編集の評価

塩基編集の結果を簡便にモニターするため、EGFP を BFP に変換する系で評価した。(EGFP の Y66H 変異により EGFP は BFP になる。そして、Y66H 変異はこの領域の A to G 塩基編集により達成される。よって、EGFP から BFP に変換する効率を測定することで、A to G 塩基編集の効率を測定できる。) iPS-EGFP 細胞に、Cas9 mRNA、sgRNA、AcrIIA5-VPR mRNA を導入し、塩基編集を行なった。この iPS-EGFP 細胞は、EGFP 遺伝子を 1 コピーのみ持つ。よって、塩基編集が起きた細胞は、BFP 陽性かつ EGFP 陰性集団として観測される。そこで、この集団を塩基編集の効率と定義した。

4. 研究成果

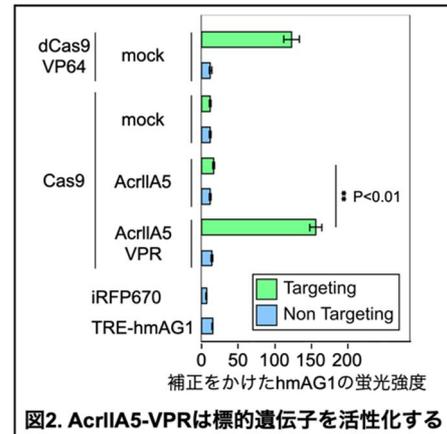
(1) AcrIIA5 による SpCas9 の活性抑制

AcrIIA5 が報告通りに SpCas9 の活性を阻害できるのかどうかを検証した。HEK293FT 細胞と iPS-EGFP 細胞それぞれを用いて EGFP 遺伝子のノックアウトを試みた。まずは HEK293FT 細胞について述べる (図 1A)。Acr を使用しないときは、EGFP の蛍光強度の減少が見られた (図 1A, Without Acr)。これは、SpCas9 が EGFP 遺伝子をノックアウトしたことを示唆している。一方で、AcrIIA5 を使用したときは、EGFP の蛍光強度の減少が見られなかった (図 1A, AcrIIA5)。これは、SpCas9 が EGFP 遺伝子をノックアウトできなかったことを示唆している。つまり、AcrIIA5 により SpCas9 の機能が阻害されたことが示唆された。次に、iPS-EGFP 細胞について述べる (図 1B)。AcrIIA5 を用いたときと、用いなかったときを比較すると (図 1B, Without Acr vs AcrIIA5) EGFP 陰性集団が AcrIIA5 を用いたときに少なかった。これは、AcrIIA5 が SpCas9 の機能を阻害したためであると考えられる。以上の結果より、AcrIIA5 は SpCas9 の活性を抑制できることを確認した。



(2) AcrIIA5 による遺伝子活性化

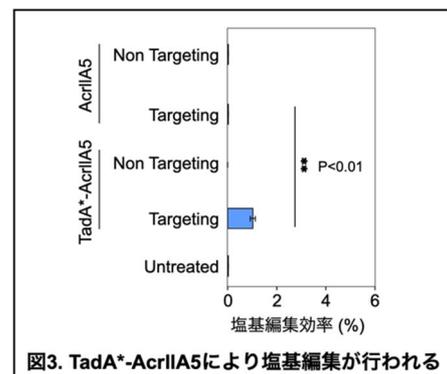
AcrIIA5 の SpCas9 の阻害機構は SpCas9 の DNA 切断の阻害である。このことから AcrIIA5 は SpCas9 を DNA 結合タンパク質にすることができると考えられた。つまり、AcrIIA5 にエフェクターを融合させることで CRISPR/i に代表される遺伝子制御システムが実行可能であると考えられた。そこで、AcrIIA5 に転写活性化因子である VPR を融合させたコンストラクトを作製した。作製したコンストラクトを HEK293FT 細胞に導入し、レポーター遺伝子の活性化を試みた。AcrIIA5 に VPR を融合させたコンストラクト (AcrIIA5-VPR) と AcrIIA5 の野生型 (AcrIIA5) を比較すると、hmAG1 の蛍光強度が AcrIIA5-VPR を使用したときに上昇していた (図 2)。これは、AcrIIA5 に VPR を融合させることで、標的遺伝子の活性化が可能であることを示している。この結果より、AcrIIA5 に転写活性化因子などを融合させることで、標的遺伝子の制御が可能であることを示唆している。



AcrIIA5-VPR による遺伝子の活性化の度合いは、ポジティブコントロールである dCas9-VP64 と同程度であった。dCas9-VP64 の活性化の強さは低いと報告されていることより、この AcrIIA5-VPR の活性化の強さも低いといえる。よって、この低い活性を改善することが一つの課題だといえる。

(3) AcrIIA5 による塩基編集

近年登場した新規ゲノム編集ツールに base editor や prime editor がある。例えば、Adenine base editor (ABE) は SpCas9 の RuvC ドメインを欠損させた変異体に *E. coli* tRNA アデノシン脱アミノ化酵素の変異体 (TadA*) を融合させたものである。一方で、AcrIIA5 の SpCas9 の詳細な阻害機構は、SpCas9 の RuvC ドメインの阻害である。つまり、AcrIIA5 に TadA* を融合させることで ABE のように塩基編集ができるのではないかと考えられた。そこで、AcrIIA5 に TadA* を融合させたコンストラクトを作製し、iPS-EGFP 細胞を用いて塩基編集を試みた。AcrIIA5 に TadA* を融合させたコンストラクト (TadA*-AcrIIA5) と AcrIIA5 を比較すると、TadA*-AcrIIA5 において、BFP 陽



性かつ EGFP 陰性集団が観測された（図 3）。これは、AcrIIA5 に TadA* を融合させることで、塩基編集が可能であることを示している。しかしながら塩基編集の効率は数%程度であった。よって、効率を改善していくことが今後の課題である。

本研究では AcrIIA5 を用いた新規ゲノム編集ツールを開発した。本研究結果は、任意の Acr を改変することで Cas タンパク質の機能を制御できる可能性を示唆している。
本成果は現在国際誌に投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 弘澤萌
2. 発表標題 Creating a new genome editing tool via Anti-CRISPR proteins
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第8回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 弘澤萌
2. 発表標題 Designing a new Genome Editing Tool
3. 学会等名 京都大学 - チューリヒ大学 戦略的パートナーシップ ジョイントシンポジウム 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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