2版

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　６ 月 ２０ 日現在

機関番号：１４３０１

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：２１K１５３６１

研究課題名（和文）タンパク質障害物を利用したCRISPR-Cas3による遺伝子欠損領域の制御

研究課題名（英文）Regulation of CRISPR-Cas3 deletion length by protein obstacles

研究代表者

小島　佑介（Kojima, Yusuke）

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：９０８９６４１６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、タンパク質障害物を利用してCRISPR-Cas3の欠損変異の範囲を制御すること、およびその基盤となるタンパク質同士の衝突を解析する技術の開発を目的として行われた。本研究の成果として、期間内に実用的かつ簡便なCas3欠損変異制御技術の開発までには至らなかったが、Cas3欠損変異の制御に繋がる多くの有用な知見を得ることができ、またタンパク質同士の衝突を解析する技術の開発に関しては、改良型の解析技術の開発に繋げることができた。最終的にこれら知見を含む論文を１報、特許出願を１件達成することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本課題を通じて、新規国産ゲノム編集技術であるCRISPR-Cas3について、細胞内の動態をより理解でき、欠損領域をどのように制御するかという課題に対して多くの知見を得ることができた。これら得られた知見は、将来的にCas3を有用なゲノム編集技術として確立し、特に遺伝子疾患などの難病をゲノム編集や再生医療の技術を用いた治療に応用する上で非常に意義のあることであったと考える。

研究成果の概要（英文）：In this project, we aimed to regulate CRISPR-Cas3 deletion length by using protein obstacles, and also, to establish a method to analyze collisions between Cas3 and other proteins on the genome. As its achievements, we could obtain many useful insights into Cas3 deletion patterns although practical and easy Cas3 regulation methods have not been established within this period. We also could develop an improved method to detect protein-protein collisions on the genome. Then, eventually, we could publish one research paper and submit one patent containing insights obtained from this project.

研究分野：ゲノム編集

キーワード：ゲノム編集　CRISPR-Cas3

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## １．研究開始当初の背景

CRISPR-Cas システムは、その汎用性からゲノム編集技術を飛躍的に発展させ、基礎研究からゲノム編集治療まで幅広く応用されている。クラス２CRISPR に属する Cas9 は単量体で機能し、その扱いが容易であることから現在最もよく用いられるが、長鎖の欠損変異導入の効率が良くないことや、知財の面での制約などの問題がある。一方で、申請者の所属するグループを含む日本国内の共同研究によって E. coli CRISPR-Cas3 システムがヒト細胞における新規国産ゲノム編集技術として開発された。Cas3 は多量体で機能するクラス１CRISPR に属し、その特徴として、DNA ヘリカーゼ活性により片方の DNA ストランドを巻き取りながら他方の DNA にニックを次々に入れることで長鎖の欠損変異を誘導できる事が確認されている。しかし以前の解析から、長鎖欠損変異は標的配列から一方向に入れることができるが、その欠損長はランダムに数百ベースから百キロベース以上に渡り、長さを制御する事が困難である事が分かっていた[1]（図１）。これに対し、不要なゲノム編集を起こさないという観点から、ランダムな Cas3 の欠損変異長さを制御する方法を見出すことは重要である。

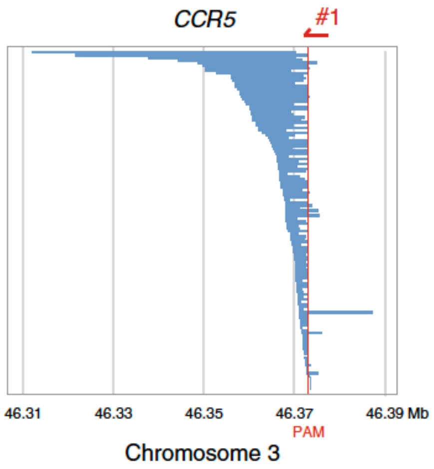


**図１：Cas3 による長鎖欠損変異誘導時の欠損パターンの例**
CCR５遺伝子における Cas3 の欠損変異誘導パターン（文献[1]より引用）

## ２．研究の目的

本研究では、Cas3 の進行方向にタンパク質障害物が存在すると Cas3 がそれに衝突し、その進行が止まるのではないかと仮定し、Cas3 がタンパク質障害物と衝突したことを解析する技術の開発とともに、Cas3 ゲノム編集長さをタンパク質障害物を用いて制御する方法の探索を目的とした。

## ３．研究の方法

Cas3 の進行方向にその位置を制御することができる Cas9 をタンパク質障害物として設置し、Cas3 の切断長がその周辺で止まるか検証した。Cas9 に関しては、WT Cas9、nCas9（D10A または H840A）、dCas9（D10A/H840A）を用いることで DNA 切断の影響、また、Cas9 を配置する場所を変えた場合の検証も行なった。また、Cas3 自身も互いに障害物になりうることから 2 つのガイド RNA を使用し Cas3 を挟み込むように配置し、長鎖欠損変異を誘導した場合の欠損パターンについても検討した。

さらに、細胞内で Cas3 がゲノム DNA 上でタンパク質障害物に衝突していることを確認する必要もあるため、それを検出する解析法の開発も行なった。

## ４．研究成果

### （１）配置する Cas9 変異体の効果について

*B2M* 遺伝子を Cas3 によりゲノム編集するモデルにおいて、タンパク質障害物として WT Cas9、nCas9（D10A または H840A）、dCas9（D10A/H840A）を Cas3 の進行方向に配置し、Cas3 の欠損変異がこの周辺でどの程度止まるか、また、Cas9 の種類によって違いがあるか解析した。結果、全ての Cas9 変異体において、Cas3 の欠損変異長さを制御できることが見出され、特に WT Cas9 と dCas9 について効率が高そうな傾向が見て取れた。

### （２）タンパク質障害物の設置位置（異なる Cas9 ガイド RNA）における再現性について

上記、Cas3 欠損変異長さの制御効果が Cas9 障害物の位置（異なるガイド RNA）を変更しても再現性が取れるか検証した。結果、Cas9 による Cas3 欠損変異長さの制御効果を観察することができたものの、さまざまな条件の実験の結果、実験条件間でその効率やどの Cas9 変異体が適しているか結果が異なった。解析方法も通常の PCR バンドベースの方法から、Droplet Digital PCR（ddPCR）を活用したより精密な定量法なども行ったが、どのような条件の時に効率よく欠損変異長さの制御効果がよく現れるのか理解するまでには至らなかった。また、Cas3 ゲノム編集を行うために合計７因子（６種タンパク質とガイド RNA）、Cas9 ゲノム編集のために２因子（Cas9 とガイド RNA）の合計９因子を一度に細胞に発現しなければならないという煩雑さも、今後解決すべき課題として知見を得ることができた。

### （３）Dual-Cas3 を用いた欠損長さの制御について

当初予定していた手法はCas3とCas9の両方のシステムを使用しなければならないため、遺伝子導入が煩雑である。そのため、Cas9ではなく、２つのCas3を使用して欠損長の制御を行う方法についても検討を行った。２つのCas3を向かい合わせにする方法は、以前の報告でも解析を行ったが[1]、特に欠損長が長い場合は２つのCas3間での欠損変異が誘導できやすい傾向があったため、。DMDのマルチエキソンスキッピングをモデルとして、約３４０kbの長鎖の欠損変異誘導の場合に特に着目し、解析を行う事とした。結果として、HEK293T細胞とiPS細胞において、DMD遺伝子上で２つのCas3を向かい合わせにし、約340kbの長鎖欠損を誘導した場合はそれぞれのガイドRNAの位置の２～３kb以内で欠損変異が止まる事が多いという知見を得る事ができた（図２）。一方で、当初は互いの認識配列の位置、または手前で欠損変異が止まることを期待していたが、細かくその欠損変異位置を見ると、両方のCas3認識配列が失われているものも多く、どのようにこのような欠損変異が引き起こされるかのメカニズムについては更なる解析が必要であることも分かった。いずれにせよ、互いの認識配列の２～３kb以内で欠損変異が止まる傾向があることから、イントロンなど周りのゲノム編集領域に多少の余裕がある場合などはこの技術を適用出来る可能性が示唆された。この知見を含む論文はStem Cell Reportに発表する事ができた。

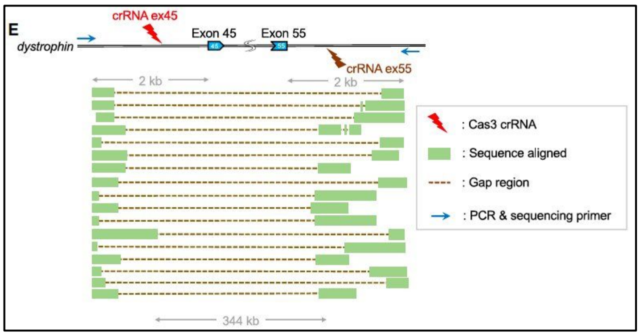


**図２：Dual-Cas3を用いた長鎖欠損変異誘導時の欠損パターン**
*DMD*遺伝子において２つのCas3を向かい合わせに配置し、約３４０kbを欠損させた場合の欠損変異パターン。

（４）タンパク質の衝突を解析する技術について

本課題は細胞内でCas3が他のタンパク質障害物と衝突してその進行が止まることを仮定しているが、実際にその現象を細胞内で解析する技術開発が必要である。当初予定していた技術はCas3と特定のタンパク質障害物を一対一で検出するものだったが、細胞内在性のタンパク質障害物も含めて網羅的に検出できる可能性のある方法の開発に成功したため、そちらの新技術を用いた解析に移行することとした。しかし、この技術は網羅的な解析が可能な一方、バックグラウンドシグナルが高い事が判明し、さらなる技術の改良を行うこととした。結果、バックグラウンドシグナルの低い方法の開発に成功し、現在は引き続きこの技術を用いてタンパク質同士の衝突に関する解析を行なっている。

尚、当初予定していたCas9タンパク質障害物を用いたCas3の欠損変異長さの制御技術は、同様の結果が他のグループより本課題期間終了間際に発表された[2]。

＜引用文献＞

[1] Moriska et al. CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells. Nat. Commun. 10(1), 5302 (2019).
[2] Li et al. Precise large-fragment deletions in mammalian cells and mice generated by dCas9-controlled CRISPR/Cas3. Sci. Adv. 10, eadk8052 (2024).

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1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<br>Kita Yuto、Okuzaki Yuya、Naoe Youichi、Lee Joseph、Bang Uikyu、Okawa Natsumi、Ichiki Akane、Jonouchi Tatsuya、Sakurai Hidetoshi、Kojima Yusuke、Hotta Akitsu | ４．巻<br>18 |
| ２．論文標題<br>Dual CRISPR-Cas3 system for inducing multi-exon skipping in DMD patient-derived iPSCs | ５．発行年<br>2023年 |
| ３．雑誌名<br>Stem Cell Reports | ６．最初と最後の頁<br>1753～1765 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.stemcr.2023.07.007 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>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<br>－ |

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

| |
|---|
| １．発表者名<br>北悠人、奥嵜雄也、直江洋一、大川夏美、市来明音、真下知士、櫻井英俊、小島佑介、堀田秋津 |
| ２．発表標題<br>DMDゲノム編集治療に向けたDual CRISPR-Cas3システムによるマルチエキソンスキッピング誘導 |
| ３．学会等名<br>日本ゲノム編集学会第７回大会 |
| ４．発表年<br>2022年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>北悠人、奥嵜雄也、直江洋一、市来明音、大川夏美、小島佑介、真下知士、櫻井英俊、堀田秋津 |
| ２．発表標題<br>DUal CRISPR-Cas3を用いたマルチエキソンスキッピングに基づくDMD治療法に向けた大規模欠失誘導 |
| ３．学会等名<br>第７４回日本細胞生物学会大会 |
| ４．発表年<br>2022年 |

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計2件

| | | |
|---|---|---|
| 産業財産権の名称<br>修飾ヌクレオチドを有するcrRNA | 発明者<br>堀田秋津、小島佑介、北悠人 | 権利者<br>同左 |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、PCT/JP2024/012128 | 出願年<br>2024年 | 国内・外国の別<br>外国 |

| | | |
|---|---|---|
| 産業財産権の名称<br>修飾ヌクレオチドを有するcrRNA | 発明者<br>堀田秋津、小島佑介、北悠人 | 権利者<br>同左 |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2023-050681 | 出願年<br>2023年 | 国内・外国の別<br>国内 |

〔取得〕　計0件

〔その他〕

－

6．研究組織

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（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 |
|---|---|