

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82718

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14781

研究課題名（和文）RNA標的型CRISPR-Casシステムの光制御技術の開発

研究課題名（英文）Development of an optical control technique for RNA-targeted CRISPR-Cas systems

研究代表者

小田部 堯広 (Otabe, Takahiro)

地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・「光スイッチ医療創出」プロジェクト・研究員(任期有)

研究者番号：90758880

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）：DNA切断反応を伴うゲノム編集は、不可逆な反応であり、編集したDNA機能を恒久的に変えてしまうため生体分子が時空間的に複雑に関与する生命現象を制御する方法には向いていない。本研究では、時空間制御可能なRNA編集技術として、RNA標的型CRISPR-Casシステムの光制御技術を開発した。Ruminococcus flavefaciens strain XPD3002由来のCas13タンパク質を基に、光操作可能なCas13を開発し、青色光依存的にレポーター遺伝子や内在性遺伝子のRNAノックダウンに成功した。in vivoでの応用も検証し、マウス肝臓でレポーター遺伝子のRNAノックダウンに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

可逆的な分子であるRNAは、時空間的な変化に伴い、細胞や組織中での発現が時々刻々と変化することが、疾患や発生・分化といった生命現象に結びついている。RNA機能を時空間制御する技術が確立されれば、生命現象を解明する手助けになる。既存技術としてRNAノックダウンやエクソンスキップによって発現を制御するRNA干渉がある。しかし、RNA干渉は、時空間的な制御が難しく、抗標的により望まないRNA機能まで阻害する。RNA干渉では困難な時空間精度で可逆的かつ反復的にRNA編集する技術が確立すれば、RNA修飾や書き換え技術と組合せて、生命科学研究だけでなく医療応用やゲノム編集に代わる技術として期待できる。

研究成果の概要（英文）：Genome editing involving DNA cleavage reactions is an irreversible reaction that permanently alters the edited DNA function, making it unsuitable to control biological phenomena in which biomolecules are intricately involved in a spatiotemporal manner. In this study, we developed a light-regulated RNA-targeted CRISPR-Cas system as a spatiotemporal controllable RNA editing technology, based on the Cas13 protein from Ruminococcus flavefaciens strain XPD3002, which can be light-operated and used to control reporter genes and endogenous genes in a blue light-dependent RNA knockdown of reporter genes and endogenous genes. In vivo application was also verified. RNA knockdown of reporter genes was successfully achieved in mouse liver.

研究分野：ケミカルバイオロジー・

キーワード：光制御技術 CRISPR-Casシステム Cas13 RNA編集 RNAノックダウン

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-Cas9 システムが報告されて以降、ゲノム編集技術の発展が急速に進んでおり、生命科学や産業においてなくてはならない存在となっている。しかし、Cas9 によるゲノム編集は、DNA の二本鎖切断反応を伴う不可逆な反応であるため、一度編集された DNA の遺伝情報を修復するのは永久に不可能である。そのため、さまざまな生体高分子が時空間特異的に複雑に関与し合うような生命現象のダイナミクスを理解し制御することは、ゲノム編集技術だけでは困難である。一方で、可逆的な分子である RNA は、時間的・空間的な変化に伴い、特定の細胞や組織中での発現が時々刻々と変化することで、疾患や発生・分化といったさまざまな生命現象に結びついている。もし、RNA の機能を時空間制御することができる技術が確立されれば、さまざまな生命現象の機能を解明する手助けになると予想される。RNA の機能を制御する既存技術として、RNA のノックダウンやエクソンスキッピングによってタンパク質の生成を制御する RNA 干渉がある。しかし、RNA 干渉は、時空間的な制御が難しく、反復性も乏しいといった問題がある。また、オフターゲットによる非特異結合により、望まない RNA の機能までも阻害してしまう。そのため、RNA 干渉では不可能な高い時空間精度で可逆的かつ反復的に RNA を自由自在に編集する技術の開発が強く望まれる。この技術が開発されれば、RNA の修飾や書き換え技術とも組み合わせることで、RNA 編集の足場として、生命科学研究だけでなく医療への展開やゲノム編集に代わる新技術として期待できる。

2. 研究の目的

ゲノム編集は、二本鎖 DNA の切断反応を伴う不可逆な反応であり、編集した DNA の機能を恒久的に変えてしまう。そのため、生体高分子が時空間的に複雑に関与する生命現象を理解し、制御する目的には向かない。一方で、RNA は可逆的であり、タンパク質の設計図としての役割だけでなく、RNA 自身が、特定の細胞や組織の中で、時々刻々と発現を変化させていることで、遺伝性疾患の原因や細胞機能といった生命現象に深く関与しているので、RNA の機能を時空間特異的かつ反復的に制御する技術開発が必要である。そこで、本研究では、RNA 標的型 CRISPR-Cas システムである Cas13 タンパク質の働きを光で操作する技術 (PA-Cas13d) の開発を行う (図 1)。

① 光による RNA のノックダウンの評価をレポーターおよび内在性遺伝子で行う。

② マウス生体内においても光依存的なノックダウンが可能か検証する。

以上の目標を達成することで、光操作による RNA 編集技術の実用性と有効性を実証する。

3. 研究の方法

本研究ではまず、Cas13 の分割位置の探索を行う。そのため、*Ruminococcus flavefaciens* strain XPD3002 由来の Cas13d に着目した。CasRx に着目した理由は哺乳類細胞で高い活性を示すことや Cas13 の中でも小型であり、光スイッチタンパク質を付与してもアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターに搭載できるため、将来的な応用を目指したときに最も魅力的である。CasRx の分割は、2 分割されたときには RNA 編集活性を持たず、青色光照射したときのみ RNA 編集活性を取り戻す位置で行う。通常、分割位置の検討は結晶構造をもとに行うが、Cas13d の構造は明らかにされていない。しかし、同種の EsCas13d はクライオ電子顕微鏡による構造が報告されている (Zhang et al., Cell 2018)。EsCas13d の構造 (PDB ID: 6e9f) とアミノ酸の一次配列を CasRx のアミノ酸の一次配列と比較して 2 分割する位置を検討した。並行して、タンパク質立体構造予測プログラムである AlphaFold 2 を導入し、得られた CasRx の予測構造からも分割位置を検討し、最終的な分割位置を決定した。CasRx のそれぞれの分割位置には青色光依存的に二量体化する光スイッチタンパク質「Magnet システム」を導入する。暗所下では RNA 編集活性は示さず、青色光依存的に RNA 編集できる PA-Cas13d を開発した (図 1)。

評価方法は蛍光タンパク質やルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子を用いて行った。

次に、開発した PA-Cas13d が光依存的に内在性遺伝子の RNA をノックダウンできるか調べた。そのため、内在性遺伝子をターゲットにしたガイド RNA を作成して、PA-CasRx と共に哺乳類細胞である 293FT 細胞に導入する。PA-CasRx には蛍光タンパク質をレポーターとして付与しておき、レポーターがポジティブな細胞をセルソーターで回収して RNA を抽出する。抽出した RNA から cDNA を合成して、青色光依存的な内在性遺伝子のノックダウン効率を定量的リアルタイム PCR 法で調べた。PA-Cas13d の性能を検証したら、*in vivo* における光依存的な RNA 編集の検討を行った (課題 4)。マウスの尾静脈から PA-Cas13d、crRNA、レポーター遺伝子の 3 種類のプラスミド DNA を導入し、マウス肝臓において光依存的にレポーター遺伝子がノックダウンされるかをどうか検証した。

4. 研究成果

光依存的な RxCas13d (以下 PA-Cas13d) を開発するため、Cas13d の予測構造から青色光依存的に二量体化する光スイッチタンパク質 (Magnet システム) を導入する分割位置探索を行った (図 1)。

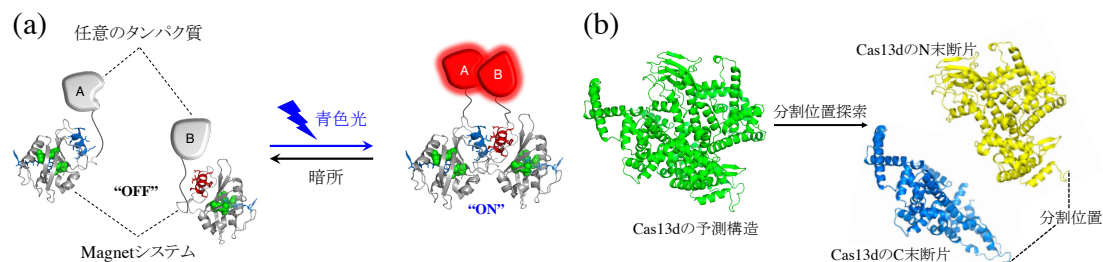


図1 Magnet システムの原理と PA-Cas13d を開発するための分割位置探索. 申請者の所属するグループが先行研究で開発した青色光スイッチタンパク質「Magnet システム」(*Nature Communications*, 6, 6256 (2015)). (a) 青色光に応答して二量体を形成し、暗所に戻すと単量体に戻る。任意のタンパク質 A・B を連結することで、その結合・解離を光照射の ON/OFF で制御できる。(b) AlphaFold2 より得られた Cas13d の予測構造を基に分割位置の探索を行う。分割位置で Cas13d タンパク質を分割すると、Cas13d の N 末端断片 (黄)、Cas13d の C 末端断片 (青) が得られる。分割位置に Magnet システムを連結した。

Cas13d の予測構造を基に分割した Cas13d が、青色光依存的に RNA 切断活性を取り戻すのか、HEK293FT 細胞にプラスミド DNA として導入し、暗所に置いたプレートと青色光を照射したプレート間でルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現に差があるか検証した(図 2)。検証の結果、暗所下(Dark)ではルシフェラーゼレポーターの発光値が低下せず、青色光依存的(Light)にルシフェラーゼの発光値が低下する分割位置を発見できた。特に分割位置 9、10、12 は、暗所下での活性が低く、かつ青色光照射時のレスポンスが優れていた。さらに内在性遺伝子のノックダウンの検証を行った。

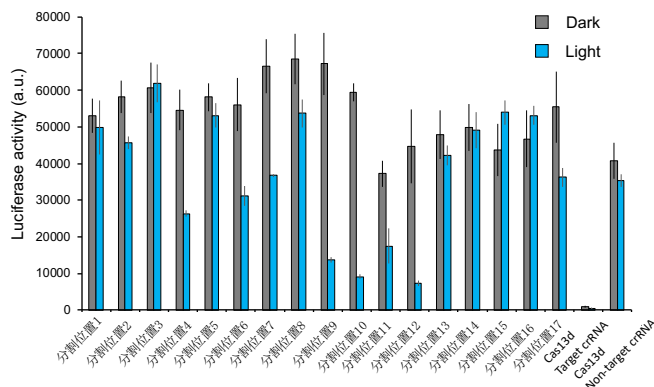


図2 分割して Magnet システムを導入した Cas13d とルシフェラーゼレポーター遺伝子、crRNA を HEK293FT 細胞に発現させて、暗所下及び青色光を照射した際のルシフェラーゼの発光値の変化。縦軸は、ルシフェラーゼの発光値、横軸は、分割位置と全長体の Cas13d を示している。分割位置によって異なる発光値を示している。

ルシフェラーゼレポーターによる分割位置のスクリーニングによって、青色光依存的に RNA ノックダウン活性を取り戻す PA-Cas13d が得られたので、次に内在性遺伝子の RNA ノックダウンが可能か検証を行った(図 3)。その結果、光依存的に内在性遺伝子の RNA ノックダウンが可能であることが明らかになった。暗所下での RNA ノックダウン活性もほとんど見られなかったことから、光による堅固な制御ができていることが示された。

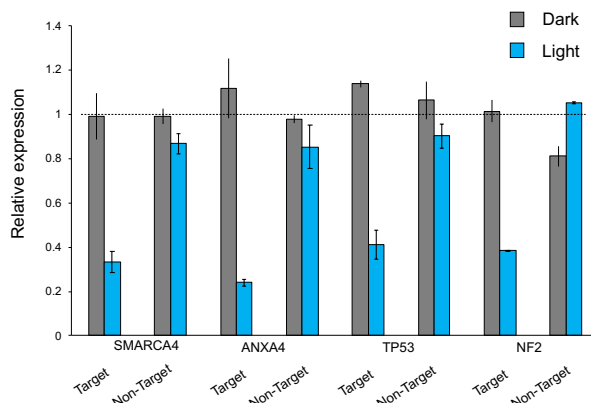


図3 PA-Cas13d を用いた光依存的な内在性遺伝子の RNA ノックダウン活性の評価。縦軸は、各標的遺伝子の相対遺伝子発現量(GAPDH に対する相対量)を表している。横軸は、標的にした内在

性遺伝子及び、Target あるいは Non-target crRNA を導入した際の結果を示している。各遺伝子において、Target crRNA を導入した際に光依存的に標的とした内在性遺伝子の RNA の発現量が低下していることが示された。

最後に、in vivo での検証を行った(図 4)。マウスの尾静脈から PA-Cas13d と crRNA、ルシフェラーゼレポーター遺伝子のプラスミド DNA を導入した。プラスミド DNA を導入したマウスを光照射するグループと暗所下に置くグループに分けて飼育した。マウスの腹部の体毛を剃毛し、24 時間の青色光照射を行った。その後、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを腹腔内注射で投与し、マウスの肝臓におけるルシフェラーゼの発光を観察したところ、光依存的に変化していることが確認できた(60%ダウン)。

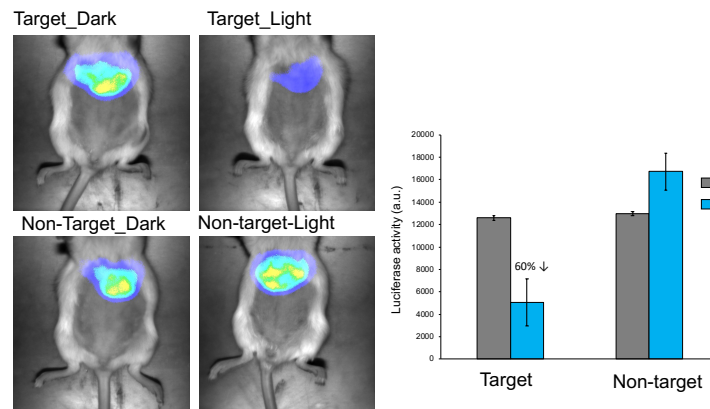


図 4 マウス生体内での青色光依存的な RNA ノックダウンの評価。Target_Dark, Non-target_Dark, Non-target_Light と比較して、Target_Light では顕著に肝臓でのルシフェラーゼの発光が低下していることがわかる(図 4 左側のマウス腹部の写真)。左図を数値化したのが図 4 右側である。縦軸は、ルシフェラーゼの発光値、横軸は、暗所下及び光照射時の Target crRNA, Non-target crRNA の結果を示している。

今後は、PA-Cas13d の RNA ノックダウン活性を失活させた PA-dCas13d によるエクソンスキップの評価やさらなる応用を目指して、アデノ随伴ウイルスベクターに搭載して、マウスでの長期発現による RNA の反復的なノックダウンの検証を進める。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 小田部堯広、中嶋隆浩、佐藤守俊
2 . 発表標題 遺伝子治療のためのsplit-CRISPR-Cas12aシステムの開発
3 . 学会等名 第95回生化学会大会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 小田部堯広、中嶋隆浩、佐藤守俊
2 . 発表標題 Development of genetic manipulation technology using a split CRISPR-Cpf1 system
3 . 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 小田部堯広、中嶋隆浩、佐藤守俊
2 . 発表標題 分割型CRISPR-Cpf1システムを用いたゲノム編集技術の開発
3 . 学会等名 化学工学会第88年会
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
---------	---------