

令和元年5月18日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12596

研究課題名(和文) Cas9変異体によるニックが起こす相同組換え修復様DNA組換えの分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for Cas9 nickase-induced homologous recombination

研究代表者

中田 慎一郎(Nakada, Shinichiro)

大阪大学・医学系研究科・特命教授

研究者番号：70548528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR/Casシステムの登場により、細胞のゲノムを簡便に編集することが可能となった。しかし、研究開発当初の技術レベルでは、ゲノム編集を施した細胞に意図しないゲノム変異が加わることが不可避であり、正確なゲノム編集を効率よく起こすことは難しかった。報告者は、DNA2本鎖切断を発生させず、ニックから高効率かつ正確にゲノムを編集する方法(SNGD法)を見いだしつつあった。完全に新規のゲノム編集法であるため、SNGDにより効率的にゲノム編集が達成される分子機構は完全に未知であった。本研究では、SNGD法が通常の相同組み換えとは異なる非古典的な経路により達成されることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SNGD法によるゲノム編集は、DNA2本鎖切断を用いる従来法と比べ、効率は7倍程度、正確性は25倍以上である。本法の開発により、正確で高効率なゲノム編集を実現した。本研究では、SNGD法において用いられる組換えの分子機構の詳細を研究し、ニックが非古典的な相同組み換えを誘導することを示した。この研究により、未知のDNA修復機構が存在することも明らかにした。本法を基盤として、ゲノム編集の正確性や効率をさらに高めることができれば、遺伝性疾患における責任遺伝子の修正など、医療応用を目指した研究・開発へと発展させることができると期待できる。

研究成果の概要(英文)：CRISPR-Cas system enables fast and easy gene editing. However, the DNA-double strand break-dependent gene editing technique induces unintended gene mutations and it can not achieve precise gene editing. When this research project started, I was developing a new gene editing method using nicks instead of DNA-double strand breaks. Until now, I have established the SNGD (single-nicks in the genome and donor plasmid)-mediated gene editing as one of the most precise gene editing methods. In this research project, I revealed that non-canonical homologous recombination induces SNGD-mediated gene editing.

研究分野：DNA修復、ゲノム編集

キーワード：ゲノム編集 ニック 相同組換え

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

標的とするゲノム上に DNA2 本鎖切断 (DSB) を発生させる CRISPR/Cas9 の発見により、ゲノム編集の効率は飛躍的に上昇した。細胞外から導入した DNA 配列を鋳型として Cas9 による DSB を修復させ、ゲノムの DNA 配列を改変する手法である。しかし、DSB はヌクレオチド挿入・欠失を伴って修復されることが多いため、ゲノム編集自体が原因となる新たな変異が高頻度で発生してしまう。この変異発生は、ゲノム編集の本来の標的部位であるオンターゲットのみならず、標的配列と似たオフターゲットにも起こる現象である。つまり、ゲノム編集に伴う変異発生はゲノム全体に影響を及ぼす恐れがある。研究開発当初の技術レベルでは、ゲノム編集を施した細胞に意図しないゲノム変異が加わることが不可避であった。

研究開始当初、申請者は DSB を発生させず、ニックのみから高効率にゲノム編集する方法を見いだしつつあった。このような手法により、ゲノム編集過程での意図しない変異が非常に発生しにくいゲノム編集を達成できると推測された。完全に新規のゲノム編集法であるため、ニックにより効率的にゲノム編集が達成される分子機構は未知であった。

通常 DNA に入ったニックは容易に修復できるため、HR 等の組換えが働く余地はない。一方、Cas9 (D10A) を用いてニックを入れた場合、ニックが生じる部位では、DNA2 重らせん構造がほどかれた上、RNA と DNA がハイブリダイズしている。このような特殊な構造であるがゆえに、組換えが機能しうるのではないかと考えた。ところで、転写の時にも DNA2 重らせん構造がほどかれた上、RNA と DNA がハイブリダイズしている「R-loop 構造」が形成されている。最近、R-loop の解消の異常によりゲノム不安定性が誘導されることが注目されている。また、R-loop の解消には、遺伝性乳癌の責任遺伝子であり HR を促進する BRCA2 と BRCA1 が関与していると報告されている。このような知見は、Cas9 (D10A) により発生したニックに HR 類似の組換えが関与しうることを示唆する一方、R-loop が引き起こすゲノム不安定性の研究に CRISPR/Cas9 が利用できる可能性も示唆している。R-loop が解消されない部位におけるゲノム変異を解析しようとしても、特定の部位において R-loop が残留するというわけではなく、解析は難しい。一方、CRISPR/Cas9 を用いた場合には、gRNA によって特定の部位に R-loop 様構造を作り出すことができるため、DNA シークエンスレベルでの解析を容易することが可能だと予想される。

2. 研究の目的

本研究課題では、ニックによるゲノム編集機構、言い換えると、ニック依存的に起こる DNA 組換え機構について、ニック発生部位の組み合わせやドナープラスミドの条件を検討し、どのようなときにニックから組換えが起こるのかを見極めることを目的とした。また、相同組換え修復に必要なとされる分子の関与を検証することで、この新たな DNA 修復の分子機構を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

EGFP 配列を 1 塩基置換した (c. 321C>G) レポーターをゲノムに組み込んだ細胞株 (他の研究課題において作成した細胞株) においてゲノム編集によりレポーター遺伝子の塩基置換を行い、野生型 EGFP を回復させるアッセイ法 (図 1) を用いて以下実験を行った。

(1) ニックから組換えが起こる分子機構 (DNA レベル)

(1)-① gRNA の組み合わせ：

EGFP 遺伝子を標的とした様々な gRNA を作製し、それらを様々な組み合わせで用いてゲノム編集効率を測定した。これにより、標的がセンス鎖である場合とアンチセンス鎖である場合の違いや塩基置換したい部位からどの程度離れた部位にニックがある場合に組換えが起こりやすいのかなどの疑問点を明らかにした。

(1)-② ドナープラスミドの長さの要求性の解析：

いわゆるホモロジーアームがどの程度必要なのか検証した。

(1)-③ 組換えの実際：

Silent mutation を 17 カ所入れたドナープラスミドを用いてゲノム編集を試みた後、EGFP 陽性細胞をセルソーターにより回収し、レポーター遺伝子の DNA シークエンスを行った。様々な位置に設定した silent mutation が取り込まれるパターンと CasD10A によるニックの位置との関連を分析し、invasion の仕組みを解析した。

(2) ニックから組換えが起こる分子機構 (蛋白レベル)

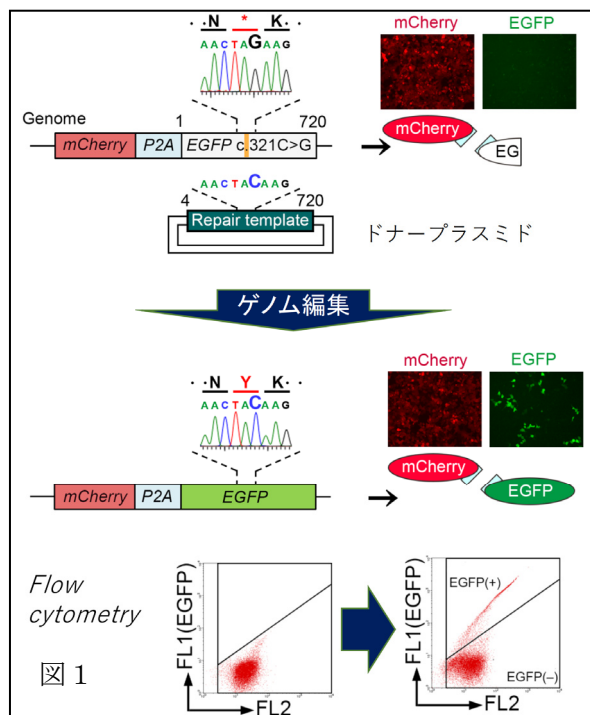


図 1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

ニックから組換えを起こす分子機構を明らかにするため、CtIP、BRCA2、RAD51 といった相同組換え修復のコアファクターを siRNA によりロックダウンした上で、レポーター細胞においてゲノム編集を実施し、その効率を測定した。

4. 研究成果

(1) ニックから組換えが起こる分子機構（DNA レベル）

(1)-① gRNA の組み合わせ：

標的となる塩基に対して、上流のセンス鎖、アンチセンス鎖それぞれを標的とする gRNA、下流のセンス鎖（2カ所）、アンチセンス鎖（2カ所）それぞれを標的とする gRNA を作成した。Cas9D10A を細胞に発現させることでレポーター遺伝子にニックを発生させた。gRNA を 2 種類組み合わせることにより、2 つのニックから作られるすべてのパターンの DNA 損傷を発生させることが可能となった。ドナープラスミドとしては、上述の様に設計した gRNA のターゲットシーケンスに、様々なパターンでサイレント変異を挿入したものを多用した。これにより、2 つの gRNA によりドナープラスミド上に、2 箇所ニックが発生する、1 箇所のみニックが発生する、ニックが全く発生しないというすべてのパターンを網羅できるようにした。これらの材料を用いて、ゲノム編集の効率を測定した。その結果、これまでの常識と異なり、DNA2 本鎖切断を発生させない場合（センス鎖に 2 か所のニック、あるいは、アンチセンス鎖に 2 か所のニック）であっても、かなり自由度が高く、効率の高いゲノム編集が達成できることが示された。

(1)-② ドナープラスミドの長さの要求性の解析

上記の実験をさらに発展させた SNGD 法（ゲノムとドナープラスミドに 1 か所ずつニックを発生させる方法：本研究とは異なる研究において確立した手法）において、ゲノム編集を行う場合に必要とされるドナープラスミド上のホモロジーアーム長を明らかにするため、様々なホモロジー長を持つドナープラスミドを設計し、ゲノム編集実験を行った。その結果、ホモロジー長が長いほどに高効率にゲノム編集が行われることが明らかとなった。また、このとき、上流方向にも下流方向にも長いことが必要であることも明らかとなった（図 2）。

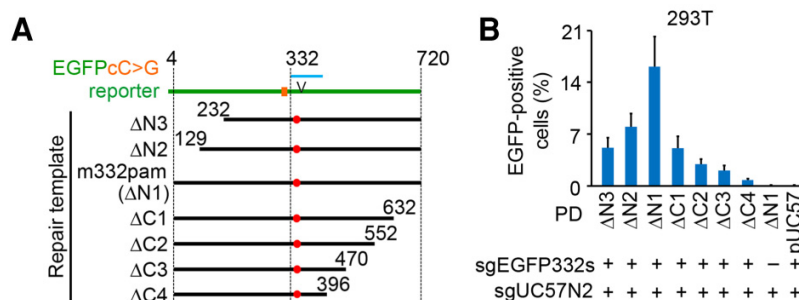


図 2: (A) 設計したホモロジーアーム (B)各ホモロジーアームを用いた際に得られたゲノム編集効率

(1)-③ 組換えの実際：

Silent mutation を 17 カ所入れたドナープラスミドを用いてゲノム編集を試みた後、EGFP 陽性細胞をセルソーターにより回収し、レポーター遺伝子の DNA シークエンスを行った。様々な位置に設定した silent mutation が取り込まれるパターンと CasD10A によるニックの位置との関連を分析した。その結果、SNGD 法では、標的としたヌクレオチドから百 bp 以上取り込まれる割合とごく短い取り込みが行われる場合とが同程度であることが示された。長く取り込まれる場合に関しては、相同組換え様の修復（ドナーのホモロジーアームを DNA 合成により取り込む）ことが示唆された。

(2) ニックから組換えが起こる分子機構（蛋白レベル）

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

CtIP、BRCA2、RAD51 をノックダウンしたレポーター細胞において、DSB 法、シングルニック法 (SN: ゲノムにのみニックを入れる手法)、SNGD 法によるゲノム編集を実施し、コントロール細胞とのゲノム編集効率を比較した (図 3)。DSB 法では、放射線等による DSB の修復と同様に、CtIP、BRCA2、RAD51 の全てに依存することが示された。一方、SN 法では、CtIP は不要であり、BRCA2、RAD51 には依存することが示された。つまり、Cas9 ニッカーゼが作り出すゲノム上のニックでは DNA end resection なしに 3' end の 1 本鎖 DNA が露出し、また、これがドナープラスミドに侵入する際には、相同組換えと同様の分子機構が機能することが示された。最後に SNGD 法では、CtIP、BRCA2、RAD51 の全てに依存しないことが示された。ドナープラスミドにニックが入ることにより、相同組換えの侵入の過程が不要になったためであると考えられる。この過程が不要となったことが、ゲノム編集効率を高めることにもつながっていると考えられる。

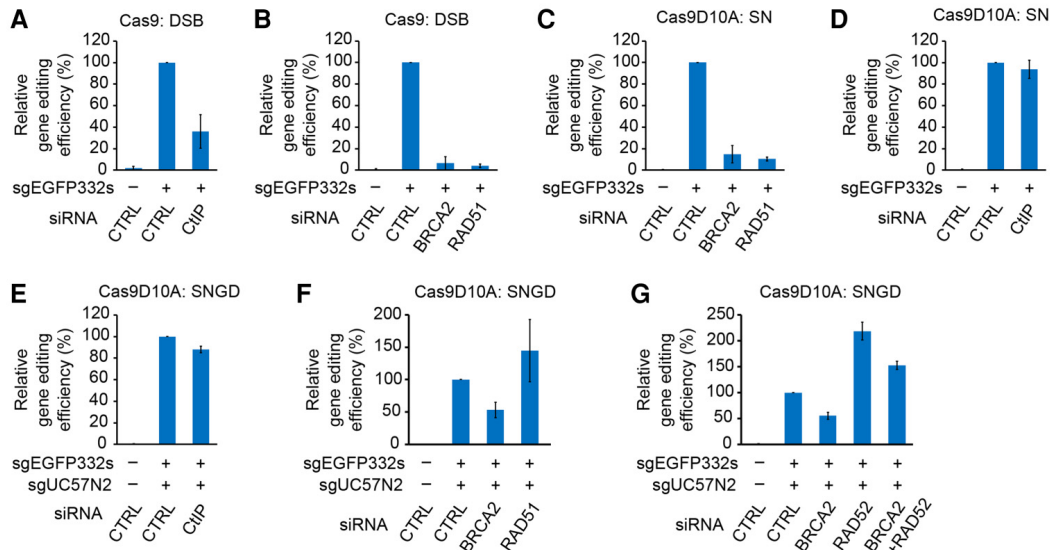


図 3: CtIP、BRCA2、RAD51 をノックダウンしたレポーター細胞におけるゲノム編集効率

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Nakajima K, Zhou Y, Tomita A, Hirade Y, Gurumurthy CB, Nakada S. Precise and Efficient Nucleotide Substitution near Genomic Nick via Non-Canonical Homology-Directed Repair. *Genome Research* 28, 223-230, 2018 DOI: 10.1101/gr.226027.117 査読有
- ② Tamai M, Inukai T, Kojika S, Abe M, Kagami K, Harama D, Shinohara T, Watanabe A, Oshiro H, Akahane K, Goi K, Sugihara E, Nakada S, Sugita K T315I mutation of BCR-ABL1 into human Philadelphia chromosome-positive leukemia cell lines by homologous recombination using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep.* 8, 9966. 2018 DOI: 10.1038/s41598-018-27767-6 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① 中田慎一郎 DNA2 本鎖切断を作らず、ニックでゲノム編集を誘導する ゲノム編集学会 2018
- ② 中田慎一郎 ニックにより誘導する Indel 発生が少ないゲノム編集 日本核酸医薬学会生物セッション第 2 回サテライトシンポジウム (招待講演) 2018
- ③ 中田慎一郎 ニックを用いた正確なゲノム編集法 (SNGD 法) 日本遺伝子細胞治療学会 (招待講演) 2018
- ④ Shinichiro Nakada, Kazuhiro Nakajima, Yue Zhou, Akiko Tomita, Yoshihiro Hirade Precise gene editing by a combination of single nicks in the target gene and donor plasmid. *Gordon Research Conference* 2018
- ⑤ 中田慎一郎 ニックによる正確で効率のよいゲノム編集法では 非古典的な HDR が利用されている 分子生物学会 (招待講演) 2017
- ⑥ 中嶋裕宏、周越、中田慎一郎 非典型的な homology directed repair により DNA2 本鎖切断を起こさずにゲノム編集が可能である ゲノム編集学会 (招待講演) 2017
- ⑦ 中田慎一郎 ニックを入れたドナープラスミドを用いて標的遺伝子上の 1 つのニックから高効率かつ安全な塩基置換を行う 第 39 回日本分子生物学会総会 (招待講演) 2016
- ⑧ 中嶋一裕、周越、富田亜希子、平出祥啓、中田慎一郎 1 つのニックを標的遺伝子とドナープラスミドに発生させることで高効率かつ安全な塩基置換を行う ゲノム編集学会 2016

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

- ⑨ Kazuhiro Nakajima, Etsu Shu, Akiko Tomita, Yoshihiro Hirade, Shinichiro Nakada Tandem nicking on one DNA strand enables efficient nucleotide substitution, Genome Engineering: The CRISPR-Cas Revolution 2016
- ⑩ Kazuhiro Nakajima, Etsu Shu, Akiko Tomita, Yoshihiro Hirade, Shinichiro Nakada. Tandem nicking enables efficient nucleotide substitution. Gordon Research Conference on Genomic Instability 2016

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ゲノム編集された細胞を製造する方法

発明者: 中田慎一郎

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-215588

出願年: 2018

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

大阪大学 高等共創研究院・大学院医学系研究科 細胞応答制御学

<http://www.bcr.med.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※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、研究者個人に帰属されます。