

平成30年6月12日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14654

研究課題名(和文) 半合理的なゲノム進化デザインを可能とする自己進化型ゲノム編集システムの創成

研究課題名(英文) Creation of self-evolving enzymatic system that enables semi rational design of genome

研究代表者

西田 敬二 (NISHIDA, KEIJI)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授

研究者番号：10620338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ゲノム配列の特定の領域に変異を導入する改変DNAグリコシラーゼを利用して自己進化システムを構築することを目的として、まず酵母、バクテリア、ウイルス、植物それぞれに由来するものを改変型としてCRISPR-dCas9との融合によって標的化した。これらを酵母細胞内で機能発現させてゲノム特定領域への変異導入を解析し、変異導入効率および標的範囲がそれぞれで顕著に異なることを見出した。これにより変異の幅を操作することができるようになり、進化範囲や速度をより高度に制御することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop self-evolving genomic system by using a modified DNA glycosylase which induce targeted random mutations at specific genomic locus. To characterize each DNA glycosylases from different sources, orthologs from yeast, bacteria, virus and plants were isolated, fused to CRISPR-dCas9 system and targeted. These were then expressed in yeast cells to assess specific mutagenesis at a genomic locus, showing distinct mutational spectra. By choosing one from these characterized, now region and speed of evolution can be controlled at more ordered manner.

研究分野：合成生物学

キーワード：ゲノム編集 進化 人工進化

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの進化工学は、生細胞のゲノム全体にランダムな変異を誘発するか、特定の遺伝子断片に変異処理を施したものを細胞内に導入することによって行われてきた。前者の場合、変異範囲はゲノム全体に及ぶため、特定の機能や遺伝子、ゲノム領域に着目している場合においては効率が悪く、また原因変異の特定に多くの労力が必要である。後者の場合、標的となる遺伝子領域に絞って変異を入れることが出来るが、遺伝子断片の導入という制約があり、またそのステップによる一回きりの変異導入となるため、生きた細胞内で継続的に変異を入れ続けるリアルタイムな進化ではなかった。また形質転換効率がバリエーションの上限となってしまう。

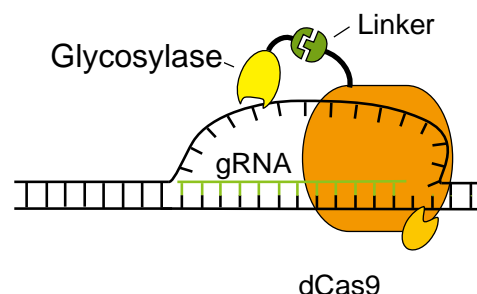
特定の領域に変異を導入する人工酵素の候補としては DNA 塩基の脱アミノ化反応を行う deaminase や脱塩基反応を行う glycosylase が考えられる。これらの酵素反応は脊椎動物の免疫グロブリン遺伝子領域の体細胞超変異に関わるとされており、このような酵素を任意の DNA 配列に標的化することによって変異を特異的に誘発することが期待されるが、これまでのところ実用化はされていない。なぜならこのような酵素がどこでも簡単に DNA に作用するようでは宿主の細胞は変異原性に耐えられないからである。そこでこれらの酵素の活性制御を理解したうえでその制御機構をうまく操作することが重要である。申請者はこれまでに deaminase を DNA 配列認識モジュールである CRISPR/Cas9 を利用して標的化し、非常に高効率に点変異を導入できる人工酵素の開発に成功した。このなかで、一本鎖 DNA にしか作用しない deaminase と、認識配列への結合の際に DNA 二重鎖をほどく CRISPR/Cas9 の組み合わせが標的的特異的な変異導入を実現するにあたって

特に重要であった。一方でこれまでのところ変異が導入される範囲は比較的狭く特定の塩基に偏っており、本研究提案の目的とする高速進化のためにはより広い範囲への変異導入技術の開発が求められる。

## 2. 研究の目的

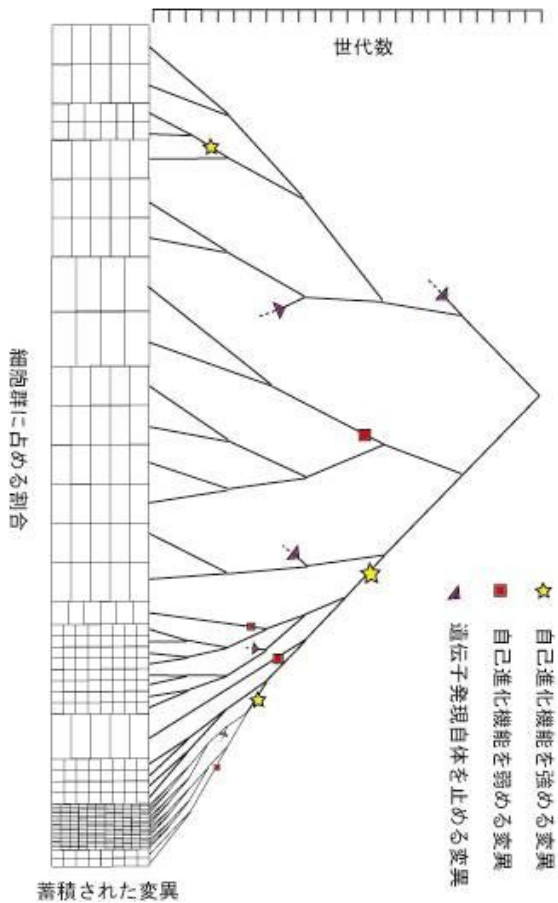
本研究提案の目的は、ゲノム中の特定の領域の進化速度を高速化する分子システム、およびそのシステムが自身を標的とすることによって自己進化するようなシステムを構築し、その分子進化過程の系統解析を行うことによって、機能強化に至る変異の同定を行い、強力な自己進化人工酵素を獲得するという、これまでにない進化工学およびゲノム改変技術開発としてのアプローチを実証し、合成進化生物学ともいべき新たな学問分野の創成に向けた革新的技術を生み出すことである。

本研究が達成された結果として得られる強力な人工進化酵素は、ゲノム中の任意の領域にランダムな変異を高効率で導入して領域特異的な超進化を誘導できるという、これまでにない革新的な進化工学的ツール、新たなゲノム改変技術を提供する。このようなツールはこれまでの生命の進化の限界を超えて、半合理的な進化デザインによる新たな生命システムの創出基盤、さらには合成進化生物学ともいべき新たな学問領域の創成に結び付け、微生物による代謝工学や、植物育種等に大きく貢献できると考えられる。



### 3. 研究の方法

本目的に合致するような、正常な DNA 塩基に作用しつつ、非特異的なゲノムへの影響が抑えられるような酵素を探索および改変によって入手する。具体的にはそのような性質を有すると期待される DNA 脱塩基反応を行う glycosylase を文献およびデータベースより探索し、人工遺伝子として作成、融合タンパク質として DNA 配列認識能を付与することにより、任意の特定配列の近傍に点変異を導入する人工酵素を創出する。そしてこの人工酵素が自らのコード遺伝子を標的とすることで、細胞内において自己進化を行うようにし、その細胞集団について次世代シーケンサーを用いた一細胞解析を行うことによって、クラスタリ

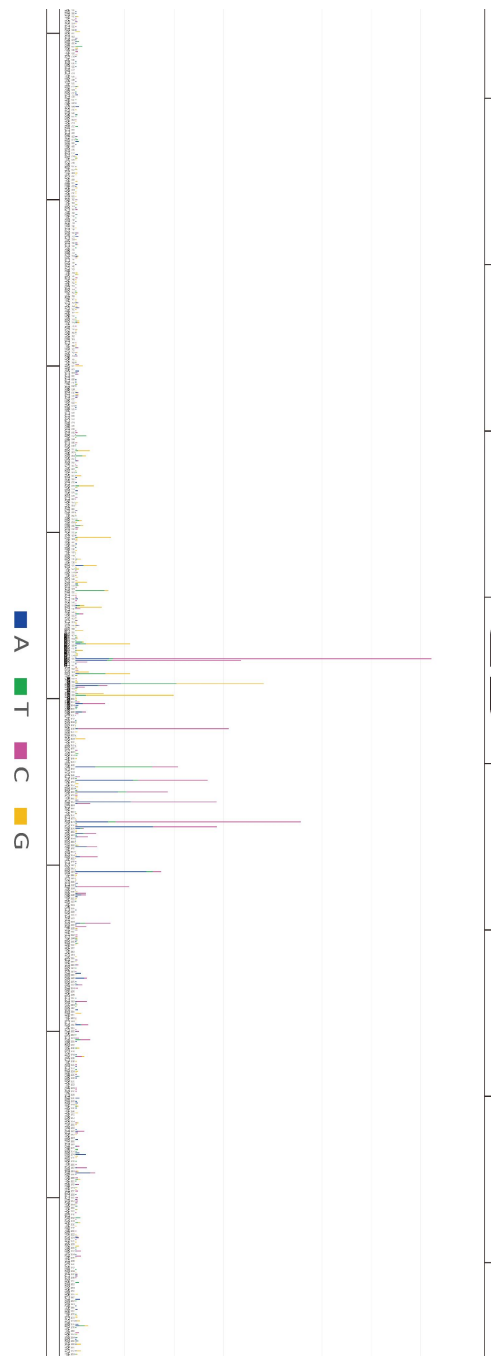


ングと分子系統樹を作成する。その系統解析から、どのタイミングでどの変異が導入されたときに進化速度が変化したかを導き出し、進化速度を加速した変異を同定して、

強力な進化誘導能を持った人工酵素の獲得と、それを可能とした自己進化システムの確立を行う。

### 4. 研究成果

ゲノム配列の特定の領域に変異を導入する改変 DNA グリコシラーゼを利用して自己進化システムを構築すること、このような目的に合致するグリコシラーゼ母体を探索すべく、酵母、バクテリア、ウイルス、植物それぞれ



に由来するものを改変型として CRISPR-dCas9 との融合によって標的化した。これらを酵母細胞内にてガラクトース誘導系を用いて機能発現させてゲノム特定領域への変異導入を解析した。標的としては CAN1 遺伝子座を用い、カナバニン耐性で選抜することによって遺伝子破壊変異率を算出した。同時にクローンシーケンスによって個別の変異を同定した。その結果、変異導入効率および標的範囲がそれぞれ種によって顕著に異なることを見出した。酵母由来のものは安定的に高活性であり、500 塩基程度の幅に変異を導入することができた。バクテリア由来は活性が高いが細胞毒性も強く、クローニング操作が困難であったが、活性のポテンシャルが高いため、進化母体として有望と思われた。植物由来は概して活性が低く、これは本来の性質なのか、あるいは宿主に依存する追加のファクターが必要である可能性が示唆された。ウイルス由来のものは別にコードされるコンポーネントが活性に必要であり、また変異導入幅が狭く、よりフォーカスした変異導入に有効と考えられた。酵母由来のものについては次世代シーケンサーによる解析を行い、標的中心で最大 7 % 程度の変異導入効率であること、また最大で 1.5kb 程度の範囲にまで変異が検出可能であることを明らかとした。以上の結果より、自己進化誘導に有効な酵素として、異なる範囲を選択できる複数種の性質を同定して利用可能とすることが出来た。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Nambu-Nishida Y, Nishida K, Hasunuma T, & Kondo A. (2018) Genetic and physiological basis for antibody production by *Kluyveromyces marxianus*. *AMB Express* 8, 56
2. Banno S, Nishida K (co-corresponding), Arazoe T,

Mitsunobu H & Kondo A (co-corresponding). (2018)

Deaminase-mediated multiplex genome editing in *Escherichia coli*. *Nature Microbiology* 3, 423-429

3. Nambu-Nishida Y, Nishida K, Hasunuma T, & Kondo A. (2018) Development of a comprehensive set of tools for genome engineering in a cold- and thermo-tolerant *Kluyveromyces marxianus* yeast strain. *Scientific Reports* 7, 8993
4. Mitsunobu H (co-first), Teramoto J (co-first), Nishida K & Kondo A. (2017) Beyond Native Cas9: Manipulating Genomic Information and Function. *Trends in Biotechnology* 35, 983-996

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 平成 30 年 1 月 27 日 **Keystone Symposia** Genome Editing with Non-Nuclease Editors from Bacteria to Plants 西田敬二(神戸大学)\*招待講演
2. 平成 29 年 10 月 19 日 **CSJ 化学フェスタ** 生命プログラムの書き換え、ゲノム編集技術とその応用 西田敬二(神戸大学)\*招待講演
3. 平成 29 年 9 月 27 日 **IBS-Nature Conference on Frontiers in Genome Engineering** Targeted nucleotide substitution by genome editing artificial enzyme 西田敬二(神戸大学)\*招待講演
4. 平成 29 年 9 月 5 日 第 83 回酵母研究会講演会 点変異導入型のゲノム編集技術 Target-AID の開発 西田敬二(神戸大学)\*招待講演
5. 平成 29 年 8 月 10 日 第 46 回植物バイテクシンポジウム DNA を直接書き換えるゲノム編集技術「Target-AID」 西田敬二(神戸大学)\*招待講演
6. 平成 29 年 7 月 25 日 **XIX international Botanical Congress** Targeted base editing in plants by Target-AID, the CRISPR/Cas9 deaminase fusion. 西田敬二(神戸大学)\*招待講演
7. 平成 29 年 7 月 10 日 日経バイオテク『ゲノム編集が生み出す新ビジネス』 DNA 塩基変換反応を利用した点変異導入型ゲノム編集技術 西田敬二(神戸大学)\*招待講演
8. 平成 29 年 6 月 20 日 第 17 回日本蛋白質科学会年会 Development of a Targeted Nucleotide Editing Tool Target-AID and its Applications 西田敬二(神戸大学)\*招待講演
9. 平成 29 年 5 月 23 日 第 58 回バイオインターフェース DNA 塩基を書き換えるゲノム編集技術の開発 西田敬

二(神戸大学)\*招待講演

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

西田 敬二(NISHIDA Keiji)

神戸大学・大学院・科学技術イノベーション研究科・教授

研究者番号：10620338

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )