

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19395

研究課題名(和文) CRISPRを用いた哺乳細胞あるいは動物における感染検知システムの構築

研究課題名(英文) Infection sensing system with CRISPR in mammalian cell and mammals

研究代表者

竹田 潤二 (Takeda, Junji)

大阪大学・微生物病研究所・招へい教授

研究者番号：50163407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPRシステムの進展は、ゲノム変化を容易にただけではなく原核生物にも精巧な獲得免疫システムが備わっていた明らかにしてきた。細菌はファージなどに感染した際、ファージゲノムの一部をまず細菌ゲノムのCRISPR遺伝子座に取り込む(Adaptation)。そのAdaptationシステムを哺乳細胞で再構築し、哺乳細胞に感染する様々な微生物感染検知システムを作り上げる事を目標とした。Adaptationに關与している細菌の遺伝子群を哺乳動物でうまく発現できるようにコドンを変更してヒト細胞導入した。次世代シーケンシング法で詳細に解析したところ、今の所Adaptationの検出に至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Adaptationシステムは、本来、原核細胞に備わっている外来異物のゲノム情報を自らのCRISPR遺伝子座に取り込むシステムである。そのAdaptationシステムを哺乳細胞で構築する事ができれば、外来病原体の感染履歴をCRISPR遺伝子座を調べる事により、明らかにすることができる。さらに、将来的には同様のCRISPRシステムを有するモデル動物を作製する事により、個体レベルの感染状態をモニターすることが可能になることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Emergence of CRISPR system has revealed that bacteria also have acquired immunity. When bacteria are infected with phage, part of phage genome is inserted into CRISPR locus in bacteria. This system is called adaptation. In this study, I have tried to reconstruct the adaptation system in mammalian cells. For this, genes involved in adaptation system were codon-optimized and introduced into 293 cells. With detailed analysis by next generation sequencing, I have not detected positive signal for adaptation yet.

研究分野：分子生物学

キーワード：CRISPR 感染感知システム Adaptation

1. 研究開始当初の背景

Cas9 タンパクと 2 種類の RNA 複合体が、in vitro でターゲット DNA に二重鎖切断を導入したことが発表されたこと(Jinek M. et al. Science 337; 816-821, 2012)が契機になり、その簡便さからゲノム編集技術の切り札となった。さらに CRISPR/Cas システムは、原核生物にも自己・非自己を認識できるシステムが存在することを示したことで驚きを生物学に与えている。つまり、細菌にとっての外来微生物、例えばファージが侵入すると CRISPR システムが発動しファージ由来 DNA を CRISPR 遺伝子座に取り込む。この過程は Adaptation と呼ばれている。そうすることにより、次のファージ感染への準備すなわち免疫機構が備わる。すなわち、CRISPR 遺伝子座から転写が起こったとき、ファージ由来の転写産物が Cas9 タンパクと結合する。ファージ由来転写産物はファージ DNA と相補であり、その相補性を利用して標的であるファージ DNA を破壊することによりファージを死滅させ、免疫反応が成立する。

私は、その Adaptation に注目し、Adaptation システムを哺乳動物細胞で再構築する事を目標に研究を遂行することにした。Adaptation システムは、簡単にいうと外来由来微生物ゲノム DNA を断片化(Protospacer と呼ぶ)し、CRISPR 遺伝子座に挿入する事である。その反応の仲立ちをするのが CRISPR 領域にある Cas1 と Cas2 である。その反応を化学反応の立場から考えると DNA 断片を宿主ゲノムに挿入するのでトランスポゾンシステムと捉える事も可能であり、それを主張している研究者が存在し、彼らはこれらのシステムを Casposon(Cas+transposon)と呼んでいる。私は、10 数年前から哺乳動物のトランスポゾン研究テーマとして論文を発表してきたので、この Adaptation システムに対して親和性が高かった。ただし、研究代表者がこれまで携わってきたトランスポゾンは、挿入部位の特異性はなかったが、本研究で題材とする Adaptation (Casposon)は、挿入部位が CRISPR 遺伝子座であり、部位特異性があると考えられていた。

2. 研究の目的

CRISPR システムの進展は、ゲノム改変を容易にしただけでなく原核生物にも精巧な獲得免疫システムが備わっていた明らかにしてきた。細菌はファージなどに感染した際、ファージゲノムの一部をまず細菌ゲノムの CRISPR 遺伝子座に取り込む(Adaptation)。そうする事により、次の感染に対して準備状況が備わる。すなわち、CRISPR 遺伝子座のファージ由来転写産物を Cas タンパク内に保持し相補 DNA をターゲットにすることにより、その相補

DNA を保持するファージなどを死滅させることが可能にする(Interference)。本研究では、その Adaptation システムを哺乳細胞で再構築し、哺乳細胞に感染する様々な微生物感染検知システムを作り上げる事を目標とした。

3. 研究の方法

哺乳細胞において外来由来ゲノム DNA 断片の CRISPR 遺伝子座への効率のよい挿入、すなわち Adaptation を達成するために以下の実験を行なった。

- (1) 293T細胞に CRISPR 遺伝子座を導入し、細胞株を樹立する。その際、外来 DNA 断片が挿入されるとピュロマイシン耐性が発揮できる様な CRISPR 遺伝子座の構築を設計した。
- (2) Cas1, Cas2, IHF α , IHF β , Cas3, Cascade (5 genes), RecG, PriA, PolA, RecB, RecC, RecD などの Adaptation に関連あるとされている遺伝子群を全て哺乳細胞で至適に機能するようにコドン最適化した。N 末端には核移行シグナルを付加した。これらの遺伝子群と疑似外来由来 DNA (Protospacer)を同時に、CRISPR 遺伝子座を有する細胞株に導入し、Adaptation の有無を PCR により CRISPR 遺伝子座を増幅しシーケンス解析あるいはピュロマイシン耐性の度合いで検討した。

4. 研究結果

(1) Doudana のグループは、大腸菌由来の精製 Cas1 と Cas2 のタンパクだけで、CRISPR 遺伝子座を有しているスーパーコイル状態のプラスミドに、あらかじめ断片化された DNA (Protospacer)を挿入できる活性があることを *in vitro* の系で示していた(Nunez JK et al. Nature 519; 193-198, 2015)。その後、大腸菌に存在する IHF $\alpha\beta$ (Integration host factor $\alpha\beta$) を添加すると、プラスミドがスーパーコイル状態ではなく直線上でも活性が検出されることが、*in vitro* の系で示された(Nunez JK et al Mol. Cell 62; 824-833, 2016)。Adaptation の基本反応に関与していることが判明しているこれら Cas1, Cas2, IHF α , IHF β 遺伝子のコドンを哺乳動物に最適化した。これらの新規コンストラクトが機能するかどうかを *in vitro* の実験系でテストした。つまり、網赤血球のライゼートを用いたセルフリーの系で、新規コドン最適化したコンストラクトを鋳型にして transcription-translation を行なった。そこに、CRISPR 遺伝子座をもつプラスミドと Protospacer を加え Nested PCR 法を行なうと、頻度は低いが典型的な Adaptation 反応が *in vitro* で起こっている事が確認できた。この実験結果は、コドン最適化した Cas1, Cas2, IHF α , IHF β 遺伝子は機能的である事を示しているし、CRISPR 遺伝子座をもつ

プラスミドはレシピエントとして機能する事も確かめられた。

(2) Adaptation の基本的な反応ではないが、その反応に間接的に関わっている遺伝子 Cas3, Cascade(5 genes)の機能を解析した。Cas3, Cascade(5 genes)に crRNA を加えると標的遺伝子を破壊することが可能なので、その可能性をヒト 293 細胞で確かめた。その結果、ヒト細胞で標的遺伝子を破壊することが確認できた。その様式は Cas9 とは異なって大きなゲノム欠失を伴うことであった。つまり、Cas3, Cascade(5 genes)もヒト細胞で機能的であることを示している。これらの結果は、現在論文投稿中である。

(3) Cas1, Cas2, IHF α , IHF β , Cas3, Cascade (5 genes), RecG, PriA, PolA, RecB, RecC, RecD などの Adaptation に関連するとされている遺伝子群を全て哺乳細胞で至適に機能するようにコドン最適化したものと CRISPR 遺伝子座を有するエピソードベクターを 293 細胞に導入した。Adaptation の有無を PCR により CRISPR 遺伝子座を増幅し、次世代シーケンス解析で詳細な解析を行ったが Adaptation が起きていることは確認できなかった。

5. 主な発表論文等

現在のところ該当なし。

6. 研究組織

研究代表者のみで遂行した研究