

令和 2 年 5 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19491

研究課題名(和文)人工DNA分解酵素を要しない次世代ゲノム編集技術の開発

研究課題名(英文)Next generation genome editing without artificial nucleases

研究代表者

紙谷 浩之(KAMIYA, Hiroyuki)

広島大学・医系科学研究科(薬)・教授

研究者番号：10204629

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):研究代表者が開発した核酸である、数百塩基鎖長のsingle-stranded DNAの3'-末端近傍にオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせることにより部分的に二本鎖としたtailed duplexによるゲノム編集法の確立を最終目的として、編集効率の上昇を指向した様々なアプローチを行った。その結果、第二のミスマッチの導入により編集効率が向上すること、及び、鎖長を100塩基程度にすることや二本鎖部分と一本鎖部分のジャンクションの位置を標的部位の近くにするほど編集効率が向上することを見出した。また、人工ヌクレアーゼを用いずに、培養細胞の染色体遺伝子のゲノム編集を行うことが可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾病をDNAレベルで治療する遺伝子治療の1つに、ゲノム(染色体)DNA上の変異配列を正常配列に戻す方法があり、この方法はゲノム編集に含まれる。現在のゲノム編集は、人工DNA分解酵素による染色体DNA切断に基づくが、非標的部位における切断による重篤な副作用が危惧される。そのため、標的DNAを切断することなくゲノム編集を行うことが望ましい。本研究では、研究代表者が考案したtailed duplexによりDNA切断を要しないゲノム編集が可能であることを示した。また、本方法により得られた知見は継続する研究で得られる結果と合わせ、細胞内のDNA修復機構に対する理解を深めるものとなる。

研究成果の概要(英文): We previously developed tailed duplexes, several hundred-base single-stranded DNAs with an oligodeoxyribonucleotide annealed to the 3'-region of the long ss DNAs. In this study, we examined various approaches towards genome editing with tailed duplexes. We found that (i) editing efficiency was enhanced when a second mismatch was introduced into the tailed duplexes and that (ii) tailed duplexes with nearly 100-base single-stranded DNAs and with the single strand and double strand junctions close to the target positions showed high editing efficiencies. We also demonstrated that (iii) genome editing was achieved by the tailed duplex in cultured cells, without artificial nucleases.

研究分野：生物系薬学、分子生物学

キーワード：ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在においても、変異遺伝子により生じる遺伝性疾患の根本治療は困難である。また、体細胞変異により生じる悪性腫瘍に関しては、腫瘍細胞の根絶を目標とした治療は行われるものの、再発の可能性を常に考慮する必要がある。

このような疾病を DNA レベルで治療する遺伝子治療の 1 つに、ゲノム (染色体) DNA 上の変異配列を正常配列に戻す方法がある。この方法はゲノム編集 (技術) に含まれる。現在のゲノム編集は、主として CRISPR-Cas9 や TALEN のような人工 DNA 分解酵素 (ヌクレアーゼ) による染色体 DNA 切断に基づく。しかし、遺伝子治療として考える場合、非標的部位における切断による重篤な副作用が危惧されるため、標的 DNA を切断することなくゲノム編集を行う方法の確立が望まれている。

2. 研究の目的

研究代表者は、以前から DNA 切断を要しないゲノム編集法を研究しており、その中で、鎖長が数百塩基の single-stranded DNA と single-stranded DNA の 3'-末端近傍にオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせることにより部分的に二本鎖とした tailed duplex が標的遺伝子を編集可能であることを報告した (図 1)。そこで、本研究では、tailed duplex 及びそのプロトタイプである single-stranded DNA による核酸編集効率の上昇を指向し、様々なアプローチを行った。

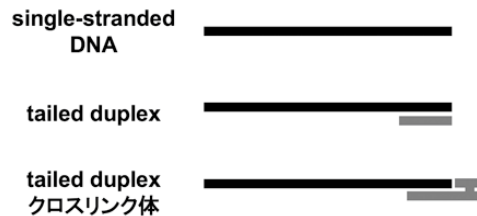


図 1 本研究課題で用いた編集用核酸

3. 研究の方法

鎖長 200 塩基以上の一本鎖 DNA は、一本鎖環状ファージミド DNA (*rpsL* 遺伝子及び *TK1* 遺伝子が標的の場合) またはファージ DNA (*rpsL* 遺伝子が標的の場合) を部分的に二本鎖とした後に制限酵素で処理して調製した。*copGFP* 遺伝子が標的の場合には、二本鎖プラスミド DNA を制限酵素とニックラーゼにより処理して調製した。鎖長 199 塩基以下の一本鎖 DNA は、化学合成を依頼した。

ヒト U2OS (由来) 細胞への核酸導入にはリポフェクション法を用いた。ヒト TK6 由来細胞への核酸導入にはエレクトロポレーション法を用いた。

4. 研究成果

(1) 鎖間クロスリンク体を導入した tailed duplex

上述したように、tailed duplex は長鎖一本鎖 DNA (single-stranded DNA) にオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせた構造を有する。このオリゴヌクレオチドを鎖間クロスリンク体に変更すると、熱的に安定になるとともにヌクレアーゼ耐性を付与することができると考えられ、その結果、編集効率が向上する可能性がある (図 1)。そこで、クロスリンク体を長鎖一本鎖 DNA にアニーリングさせた tailed duplex を作製し、プラスミド中のモデル遺伝子 (*lacZα* 遺伝子) のヒト U2OS 細胞における編集効率を調べた。しかし、クロスリンク体を導入した tailed duplex に優位性は観察されなかった。ただし、下述するように、*lacZα* 遺伝子は例外的な遺伝子である可能性があり、別の標的遺伝子を用いての実験が必要である。

(2) 第二のミスマッチの影響

Tailed duplex の長鎖一本鎖 DNA と標的 DNA の間には標的部位にミスマッチが存在する。それ以外の部位に第二のミスマッチが存在すると編集効率にどのような影響を与えるかを、プラスミド中のモデル遺伝子 (*rpsL* 遺伝子) の U2OS 細胞における編集効率を指標として調べた。その結果、第二のミスマッチにより、編集効率が向上することを見出した (図 2)。

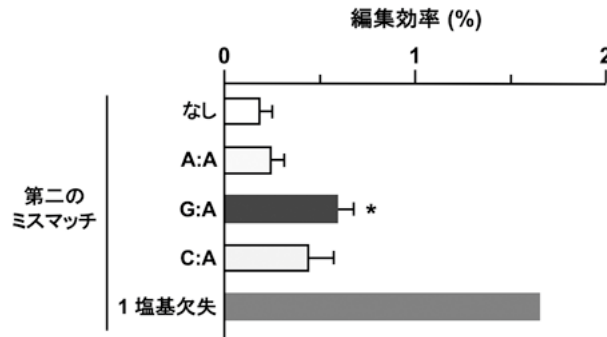


図2 第二のミスマッチの影響

(3) Tailed duplex の供与体核酸としての有用性

ゲノム編集に汎用されるヌクレアーゼの1種であるCRISPR-Cas9による切断と供与体核酸の組み合わせによる編集効率をマウスを用いて調べた。供与体核酸としてはtailed duplexと繁用される短鎖一本鎖オリゴヌクレオチドを用いた。その結果、短鎖一本鎖オリゴヌクレオチドと比較して、tailed duplexの優位性は観察されず、以前に報告した培養細胞における結果とは異なる結果が得られた。

(4) single-stranded DNA と tailed duplex の比較

以前に、EGFP-Hyg 遺伝子と rpsL 遺伝子の編集において、single-stranded DNA よりも tailed duplex の効率が高いことを見出した。今回、lacZα 遺伝子を標的として用いて、U2OS 細胞における single-stranded DNA と tailed duplex の編集能を比較したところ、両者に差は観察されなかった(図3)。アッセイに用いた lacZα 遺伝子の標的部位は遺伝子クローニング用に人工的にデザインされた multiple cloning site 中にあり、多くの制限酵素部位が近傍に集中している。そのため、特殊な構造をとる可能性があり、このことが結果に影響した可能性がある。また、下述するカイアシ GFP (copGFP) 遺伝子を用いた場合、多くの場合においては、tailed duplex による編集効率が single-stranded DNA による編集効率よりも高かったが、鎖長によっては逆転する場合もあった。従って、今後は標的遺伝子・標的部位毎に、single-stranded DNA と tailed duplex の編集効率を比較する必要がある。

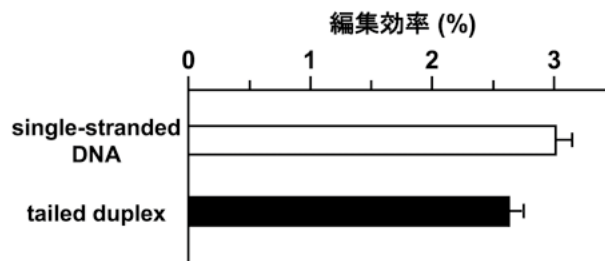


図3 Single-stranded DNA と tailed duplex の比較 (lacZα 遺伝子)

(5) Tailed duplex の改良

copGFP 遺伝子を有するプラスミドを用いたアッセイにより、長鎖一本鎖 DNA の鎖長、センス鎖とアンチセンス鎖の違い、標的部位との位置関係を詳細に調べた。その結果、従来は数百塩基の鎖長の長鎖一本鎖 DNA を用いてきたが、100塩基程度の長鎖一本鎖 DNA を用いた場合の方が編集効率が高くなる場合があることを見出した。また、センス鎖とアンチセンス鎖を比較すると、アンチセンス鎖の方が編集効率が高いことを見出した。さらに、二本鎖部分と一本鎖部分のジャンクションの位置が編集の標的付近に近ければほど編集効率が高い傾向が見出された。これらの結果は、従来の tailed duplex を用いた研究で得られた結果とは異なる新規な情報を含んでおり、さらなる tailed duplex の改良が可能であることを示している。

(6) ゲノム DNA を標的とした tailed duplex の導入

ヒト TK6 由来細胞中のチミジンキナーゼ 1 (TK1) 遺伝子のエクソン 6 の 50 番目の塩基を標的として、鎖長 791 塩基の single-stranded DNA から調製した tailed duplex を用いてゲノム編集を試みた。この部位が C に変異している遺伝子を正常型の A に編集することにより、活性が回復する。しかし、活性を指標に編集効率を調べたものの、正常型に復帰した細胞を検出するには至らなかった。一方、copGFP 遺伝子を染色体に組み込んだ U2OS 細胞を用い、上記の短い一本鎖を有する tailed duplex によりゲノム編集を行った。この実験では、発色団アミノ酸の C (変異型) を T (正常型) に編集して蛍光を発する性質が回復することを指標とした。その結果、約 0.05%

の割合で copGFP 陽性細胞が出現した(図4)。従って、人工ヌクレアーゼを用いずに、培養細胞の染色体遺伝子のゲノム編集を行うことが可能であることが示された。

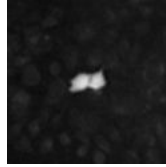


図4 Tailed duplex によるゲノム編集により出現した copGFP 陽性細胞

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 0件）

1. 著者名 Suzuki Tetsuya, Yanai Yuri, Nishigaki Natsuki, Nakatsu Yoshimichi, Tsuzuki Teruhisa, Kamiya Hiroyuki	4. 巻 125
2. 論文標題 Effects of mismatches distant from the target position on gene correction with a 5'-tailed duplex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 619 ~ 623
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2017.12.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 紙谷浩之, 柳井優里, 鈴木哲矢, 河合秀彦
2. 発表標題 核酸のみで行うゲノム編集法確立に向けた high throughput 解析法
3. 学会等名 日本分析化学会 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河合秀彦, 柳井優里, 鈴木哲矢, 紙谷浩之
2. 発表標題 Tailed duplex による培養細胞でのゲノム編集：染色体上 copepod GFP 遺伝子の修復
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第4回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 紙谷浩之
2. 発表標題 遺伝子治療用DNAの開発
3. 学会等名 第11回日本RNAi研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 紙谷浩之
2. 発表標題 DNA損傷による遠隔作用変異誘発と人工ヌクレアーゼを用いないゲノム編集法の開発
3. 学会等名 日本環境変異原学会 変異機構研究会「第32回夏の学校」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢間顕太郎, 鈴木哲矢, 河合秀彦, 紙谷浩之
2. 発表標題 人工ヌクレアーゼを用いない遺伝子編集: 蛍光タンパク質を用いたハイスループットアッセイ系の確立
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤健斗, 鈴木哲矢, 河合秀彦, 紙谷浩之
2. 発表標題 人工ヌクレアーゼを用いない遺伝子修復: 一本鎖DNAとTailed Duplexの比較
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢間顕太郎, 河合秀彦, 鈴木哲矢, 紙谷浩之
2. 発表標題 人工ヌクレアーゼを必要としない遺伝子編集ツール 5'-Tailed Duplex
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木哲矢, 柳井優里, 中津可道, 續輝久, 紙谷浩之
2. 発表標題 Tailed duplexによる配列変換における標的部位と第二のミスマッチの距離の影響
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第3回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 紙谷浩之, 西垣奈津希, 鈴木哲矢, 中津可道, 續輝久.
2. 発表標題 非標的部位に導入した塩基-塩基ミスマッチのtailed duplexによる遺伝子修復への影響.
3. 学会等名 第33回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白濱航, 鈴木哲矢, 小松康雄, 紙谷浩之.
2. 発表標題 新規ゲノム編集核酸tailed duplex ver. 2.
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柳井優里, 鈴木哲矢, 中津可道, 續輝久, 紙谷浩之.
2. 発表標題 標的部位に導入した第二のミスマッチによる遺伝子修復(配列変換)効率の向上.
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 紙谷浩之.
2. 発表標題 DNA損傷による変異誘発と相同組換えを利用するゲノム編集用核酸の開発.
3. 学会等名 日本薬学会第138年会 (招待講演)
4. 発表年 2018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
研究 分 担 者	鈴木 哲矢 (SUZUKI Tetsuya) (20573950)	広島大学・医系科学研究科(薬)・助教 (15401)	