

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14740

研究課題名（和文）自律活性化型CRISPRを利用した正確なゲノム編集に必要な要素の探索

研究課題名（英文）Exploring the Elements Required for Accurate Genome Editing Using Autonomous Activated CRISPR

研究代表者

松本 大亮 (Daisuke, Matsumoto)

広島大学・医系科学研究科（薬）・助教

研究者番号：20889381

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに開発したAnti-CRISPRを用いた細胞周期依存的なCRISPRの活性化系をCas9自体の細胞周期依存的な発現制御と組み合わせることによって、相同性組換え効率に対して相乗効果が得られるのかを評価した。その結果、Cas9の細胞周期依存的な発現自体でも通常のCas9と比較して相同性組換え効率の向上が見られたが、オフターゲット作用が高頻度で起きていた。一方で、Anti-CRISPRを用いた活性化系と組み合わせることによって、相同性組換え効率がさらに向上し、オフターゲット作用も低くなることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集を臨床といった正確な遺伝子の書き換えを行う上で、相同性組換えを介した修復は重要である。本研究によって、細胞周期を厳密に限定したCRISPR-Cas9の活性制御によって相同性組換えの向上とオフターゲット作用の低減が可能であることが示唆された。この結果を踏まえ、より詳細な遺伝子修復とCRISPRを用いたDNA切断の関係性を解明していくことによって、より安全なゲノム編集技術の開発に貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：We evaluated whether a synergistic effect on homologous recombination efficiency could be obtained by combining the cell cycle-dependent activation of CRISPR using Anti-CRISPR with the cell cycle-dependent regulation of Cas9 expression itself. The results showed that cell cycle-dependent expression of Cas9 itself improved homologous recombination efficiency compared to normal Cas9, but off-target effects occurred at a higher frequency. On the other hand, the combination with the activation system using Anti-CRISPR further improved the homologous recombination efficiency and reduced the off-target effects.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：ゲノム編集 CRISPR-Cas9 Anti-CRISPR 相同性組換え 細胞周期

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集は CRISPR-Cas9 システムの登場により、多くの生物系研究者にとって一般的なものとなりつつある。CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子改変には Cas9 による DNA 切断後の細胞の持つ遺伝子修復機構が大きな役割を担う。代表的な二種類の遺伝子修復機構として、相同性組換え (homologous recombination; HR または homology directed repair; HDR) と非相同末端連結 (non-homologous end joining; NHEJ) がある。Cas9 による DNA 二本鎖切断後には主に NHEJ を介した修復が行われ、ランダムな変異が導入される。一方で、標的配列周辺と相同的な DNA 配列を持つプラスミド DNA や一本鎖オリゴ DNA (single strand oligo DNA; ssODN) をドナー遺伝子として導入することにより、HDR を介して修復できる。特に医療分野におけるゲノム編集の応用において、この HDR を介した標的配列の正確な修復が必要不可欠となる。しかし、Cas9 による切断後の修復の多くは NHEJ を介して行われる (Frit, P. *et al* DNA Repair 2014 等)。研究代表者らはこれまでに、AcrIIA4 という Anti-CRISPR に対し、細胞周期依存的に発現量が変化する

Cdt1 ドメインの融合を試みた (図 1)。実験の結果、期待通りの AcrIIA4-Cdt1 の発現が確認された。また、HDR を介した標的配列の修復を試みた結果、HDR を介した修復効率が向上し、標的外の類似配列 (オフターゲット配列) での NHEJ を介した変異導入率の顕著な減少も確認された。

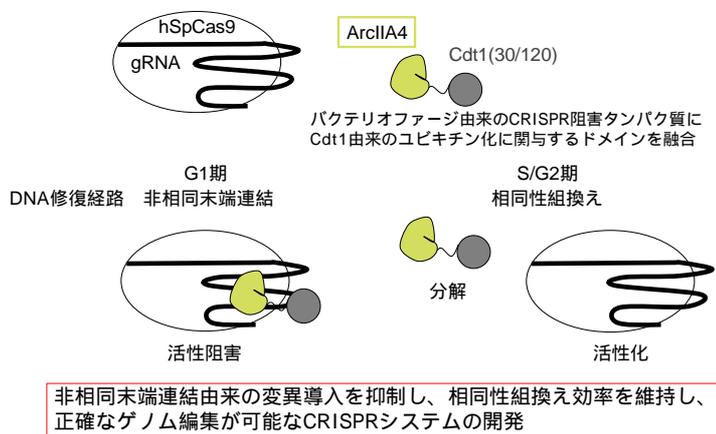


図 1 Anti-CRISPR を用いた細胞周期依存的な自律活性型の CRISPR システムの概略図

2. 研究の目的

本研究では独自に開発した細胞周期依存的に自立的な活性化が可能な CRISPR システムを利用して、正確なゲノム編集に重要な要素である CRISPR による切断と修復における HDR と NHEJ の選択性に関して詳細な原理の探究を目的とした。

3. 研究の方法

(1) AcrIIA5 への拡張

これまでに構築した AcrIIA4 は化膿レンサ球菌由来の Cas9 に阻害指向性が高いことが知られている。そこで、より広い Cas9 に対して阻害活性を示す AcrIIA5 と呼ばれる anti-CRISPR を用いた細胞周期依存的な Cas9 の活性化を検証した。具体的には、AcrIIA5-Cdt1 と Cas9 を共発現するベクターの構築を行い、293A 細胞を用いてゲノム編集効率を確認した。

(2) 細胞周期依存的な Cas9 の発現による HDR への影響評価と細胞周期依存的な Anti-CRISPR 発現との組み合わせ

Cas9 の活性を細胞周期依存的に活性化する方法として、Cas9 自体の発現を細胞周期依存的に行うことも考えられる。そこで、細胞周期 G1 期での分解を促進するために、Geminin 由来の分解に関わるドメインを Cas9 に付与した Cas9-Geminin を構築し、HR と NHEJ による修復の違いを評価した。また、AcrIIA4-Cdt1 や AcrIIA5-Cdt1 と組み合わせることによる変化も評価した。

(3) Cas9 変異体への拡張

これまでの Cas9 を用いた遺伝子改変において、標的外配列への変異が導入される、オフターゲット作用が課題であった。近年、このオフターゲット作用を低減した変異体が報告されており、その変異体に対する AcrIIA4-Cdt1 及び AcrIIA5-Cdt1 を用いた細胞周期依存的な Cas9 変異体の活性化により、HR と NHEJ 効率への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) AcrIIA5 への拡張

AAVS1 遺伝子(図 2(A))及び EMX1 遺伝子(図 3(A))を標的とした sgRNA と鋳型 DNA を用いて、AcrIIA5-Cdt1 による細胞周期依存的な活性化による HR 及び NHEJ 効率の評価を行った結果、AAVS1 遺伝子を標的とした場合に HDR 効率の向上が確認された(図 2(B))。その一方で、標的配列での NHEJ を介した変異導入率は減少した(図 2(C))。また、オフターゲット作用の減少も確認された(図 2(D))。一方で、EMX1 遺伝子を標的とした場合、AcrIIA5 を用いた細胞周期依存的な Cas9 の活性化による HDR 効率の向上は確認されなかった(図 3(B))。また、標的配列における変異導入率はあまり減少しなかった(図 3(C))。その一方で、オフターゲット配列での変異導入率は減少した(図 3(D))。これらの結果から、AcrIIA5-Cdt1 による細胞周期依存的な Cas9 の活性化では、AcrIIA4-Cdt1 と比較すると標的配列に依存することが示唆された。

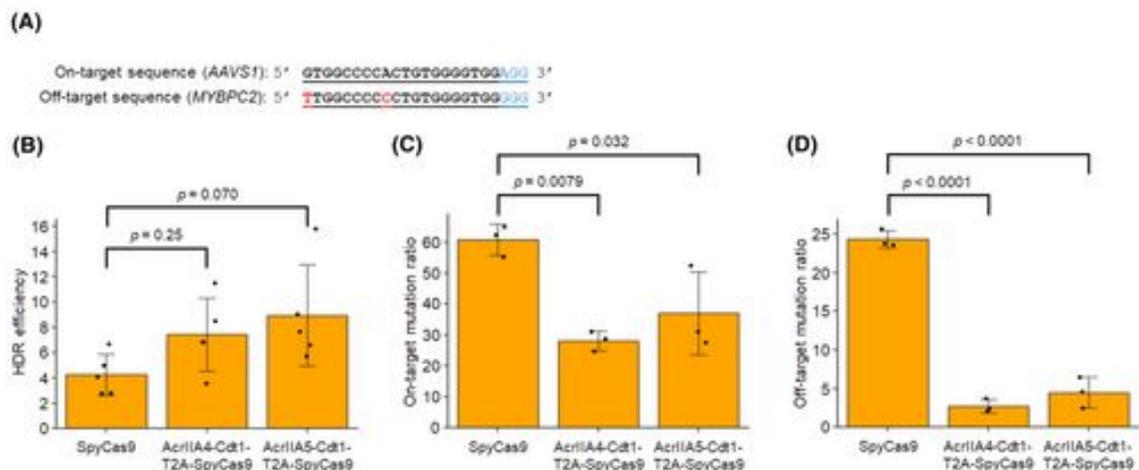


図 2 AAVS1 遺伝子を標的とした場合の AcrIIA4-Cdt1 および AcrIIA5-Cdt1 による細胞周期依存的な活性化

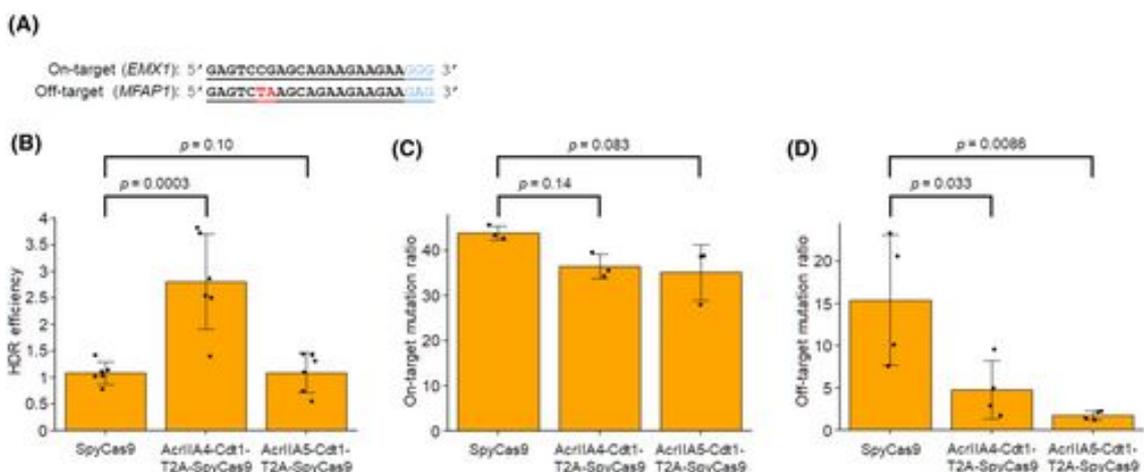


図 3 EMX1 遺伝子を標的とした場合の AcrIIA4-Cdt1 および AcrIIA5-Cdt1 による細胞周期依存的な活性化

(2) 細胞周期依存的な Cas9 の発現による HDR への影響評価と細胞周期依存的な Anti-CRISPR 発現との組み合わせ

細胞周期依存的に Cas9 の活性を制御する方法として、Geminin の分解に関わるドメインを Cas9 に融合 (Cas9-Gem) することによって、Cas9 自体の発現量を細胞周期に応じて変化させる方法も報告されている (Gutschner, T. *et al* Cell Rep. 2016 等)。Cas9 自体の細胞周期依存的な活性化と Anti-CRISPR を用いた制御による HDR への影響に対する比較とそれらを組み合わせた時の影響を評価した。AAVS1 遺伝子 (図 4A) における評価の結果、Cas9-Gem を用いた場合に HDR 効率が 6.3% と Cas9 のみ (4.2%) と比べて HDR 効率の向上が確認された (図 4B)。しかし、その効率の上昇度合いは Anti-CRISPR を用いた細胞周期依存的な活性化 (7.4%) と比較すると低かった。また、AcrIIA4-Cdt1 と Cas9-Gem を併用することによって、更に HDR 効率が向上することが示唆された (図 4B)。一方で、標的配列およびオフターゲット配列での変異導入率は低下していた (図 4C, D)。他にも DYRK1A 遺伝子および EMX1 遺伝子においても評価を行った。どちらの場合においても Cas9-Gem を用いることで Cas9 単体と比較して HDR 効率の向上が見られた。その一方で、AAVS1 遺伝子の場合と比較すると Cas9-Gem の Anti-CRISPR を用いた細胞周期依存的な活性化による HDR 効率の向上は確認されず、同程度の HDR 効率であった。一方で、オフターゲット配列における変異導入効率は Anti-CRISPR を用いた細胞周期依存的な活性化によって減少した。これらの結果より、Cas9 単体と比較すると Cas9-Gem と Anti-CRISPR を用いた細胞周期依存的な活性化を行うことで、HDR の向上とオフターゲット作用の低減が可能であることが示された。単純な Cas9 の分解による細胞周期依存的な活性制御と比較すると、Anti-CRISPR を併用することによって HDR 効率を大きく落とすことなく、オフターゲット作用を大幅に低減できたことから、細胞内での Cas9 の活性は積極的な阻害を行っても十分に維持されていることが示唆された。このことから、細胞内における Cas9 の過剰な発現や活性を抑えていくことが、今後ゲノム編集の正確性を向上していく上で重要になってくると考えられる。これらの結果は、FEBS Journal にて報告した。

(A)

On-target sequence (AAVS1): 5' GTGGCCCCACTGTGGGGTGGAGG 3'
 Off-target sequence (MYBPC2): 5' TGGCCCCCTGTGGGGTGGGGG 3'

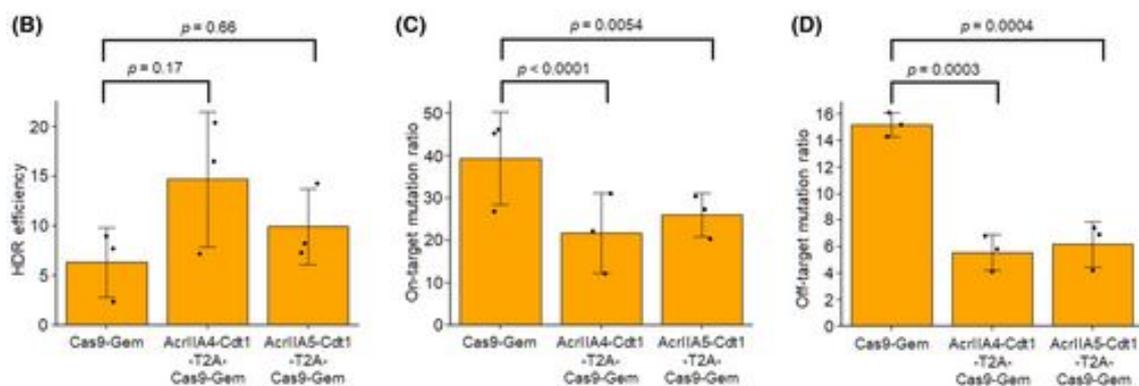


図 4 AAVS1 遺伝子を標的とした場合の AcrIIA4-Cdt1 および AcrIIA5-Cdt1 による細胞周期依存的な活性化と Cas9-Geminin の併用

(3) Cas9 変異体への拡張

最後に、オフターゲット作用が起こりにくいことが知られる Cas9 変異体の細胞周期依存的な活性化による HDR 効率への影響を評価した。AcrIIA4 と AcrIIA5 による活性制御を行うため、まずは各種変異体に対する阻害効果を確認した。その結果、AcrIIA4 および AcrIIA5 のどちらも Cas9 変異体を効率的に阻害できることがわかった。また、各 Cas9 変異体を用いた HDR 効率の比較を行った際に、EMX1 遺伝子を標的とした場合に eCas9 と HF1Cas9 において野生型の Cas9 と比較して高い HDR 効率を得られた。一方で、オフターゲット配列における変異導入率は野生型 Cas9

と比較して低かった。そのため、この eCas9 と HF1Cas9 において AcrIIA4-Cdt1 と AcrIIA5-Cdt1 を利用した細胞周期依存的な活性化を試みた。その結果、AAVS1 および EMX1 を標的とした際に、eCas9 では細胞周期依存的な活性化を行うことで、HDR 効率が減少することがわかった。一方で、HF1Cas9 では特に AcrIIA4-Cdt1 を用いた細胞周期依存的な活性化によって HDR 効率が上昇することが示された。eCas9 の結果に関しては予想外のものではあったが、HF1Cas9 では HDR 効率の向上が見られたことから、両者の変異箇所の違いがこの結果に影響している可能性がある。こちらの結果に関しては、現在論文を投稿中である。今回の結果から、Cas9 変異体ごとに編集特性が異なること、細胞周期依存的な活性化による影響が異なることが示唆された。これらの結果をもとに、今後はより詳細な評価をすることによって HDR を効率良く引き起こすための要素を抽出していきたいと考えている。これにより、正確なゲノム編集が可能な CRISPR-Cas9 システムの利用法の開発につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Matsumoto Daisuke, Nomura Wataru	4. 巻 32
2. 論文標題 Molecular Switch Engineering for Precise Genome Editing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 639 ~ 648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.1c00088	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 -

1. 著者名 Daisuke Matsumoto, Kanae Kishi, Erina Matsugi, Yuto Inoue, Kiyomi Nigorikawa, Wataru Nomura	4. 巻 597
2. 論文標題 Cas9-Geminin and Cdt1-fused anti-CRISPR protein synergistically increase editing accuracy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 985-994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14608	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11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本 大亮、野村 渉
2. 発表標題 細胞周期依存的なCRISPR活性制御によるゲノム編集法の開発
3. 学会等名 2021年若手ペプチド夏の勉強会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daisuke Matsumoto, Wataru Nomura
2. 発表標題 Cell cycle dependent expression of anti-CRISPR improves genome editing accuracy
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸 果苗、濁川 清美、長谷川 有希、松本 大亮、野村 渉
2. 発表標題 CRISPRaを用いた自律制御型ゲノム編集におけるAnti-CRISPR作用の解析
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本大亮、岸果苗、松木依理奈、井上雄翔、濁川清美、野村 渉
2. 発表標題 特定の細胞周期でのCRISPR-Cas9活性化によるゲノム編集効率の向上
3. 学会等名 ケミカルバイオロジー学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Daisuke Matsumoto, Kanae Kishi, Erina Matsugi, Yuto Inoue, Kiyomi Nigorikawa, Wataru Nomura
2. 発表標題 Development of Precise Genome Editing Technology by Cell Cycle Depending Activation of CRISPR-Cas9
3. 学会等名 CBI学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本大亮、岸果苗、松木依理奈、井上雄翔、濁川清美、野村渉
2. 発表標題 細胞周期依存的なhigh fidelity Cas9の活性化によるゲノム編集の正確性向上の検討
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上雄翔、松本大亮、岸果苗、松木依理奈、濁川清美、野村涉
2. 発表標題 特定の細胞周期におけるタンパク質分解の複合化によるゲノム編集と精度の向上
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本大亮
2. 発表標題 高精度なゲノム編集を可能とする手法の開発 -安全なゲノム編集を目指して-
3. 学会等名 香川大学応用生命科学研究センター（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松木 依理奈、長瀬 興平、松本 大亮、濁川 清美、野村 涉
2. 発表標題 細胞周期依存型ゲノム編集のためのSaCas9に対するanti-CRISPR活性の解析
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本大亮、松木依理奈、久保田小茉莉、井上雄翔、岸果苗、濁川清美、野村 涉
2. 発表標題 相同組換え修復を優先的に引き起こすゲノム編集法の検討
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岸 果苗、濁川 清美、長谷川 有希、松本 大亮、野村 渉
2. 発表標題 CRISPRaの仕組みを利用したanti-CRISPRの細胞内でのCas9阻害作用解析
3. 学会等名 日本化学会
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
---------	---------