

## 134. 癌抑制のためのエピゲノム編集プラットフォームの開発

佐久間 哲史

広島大学 大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻 分子遺伝学研究室

Key words : 癌, エピゲノム編集, CRISPR-Cas9, dCas9-VP64, dCas9-KRAB

### 緒言

ゲノム編集技術の急速な発展に伴い、その関連技術として、クロマチン標識やクロマチン免疫沈降などへの応用と共に、転写制御やエピゲノム編集を目的とした技術開発が盛んに進められている。代表的なものとして、ジンクフィンガー (ZF) や TAL エフェクター (TALE) などの DNA 結合タンパク質に、単純ヘルペスウイルス由来の転写活性化ドメインである VP16 またはその 4 量体である VP64 を融合させた人工転写因子が挙げられる。ZF-VP64 や TALE-VP64 を任意の遺伝子のプロモーター領域に作用させることで、当該遺伝子の発現を人工的に活性化させることが可能である。一方で、転写を抑制する場合には、KRAB ドメインを融合させた ZF-KRAB または TALE-KRAB の使用例が報告されている。更にこれらを第 3 世代のゲノム編集ツールである CRISPR-Cas9 システムに応用し、ヌクレアーゼ活性を不活化させた Cas9 (dead Cas9: dCas9) に融合させることによって、ZF-modulator や TALE-modulator よりも簡便に機能的分子を作製することが可能となっている。しかしながら、ゲノム編集の目覚ましい進歩と比すれば、転写制御やエピゲノム編集は未だ実証実験の域を出ていない状況である。

このような状況の中、癌研究において、様々な癌関連遺伝子上に段階的に蓄積されたゲノム異常やエピゲノム異常が、癌の発症に関わると共に多様性をもたらしていることが明らかとなってきた。最近では、癌の発症プロセスを生物の進化と見立てて論じられることもしばしばである。このことから、癌に関与する遺伝子発現の異常をエピゲノム編集によって正常化するには、単一遺伝子の発現制御だけでは十分でなく、複数の遺伝子の発現を同時または段階的に制御する必要があることが示唆されている。

### 方法、結果および考察

ZF や TALE では、標的配列が変わる毎に、それに対応する ZF-modulator や TALE-modulator をその都度作製する必要があるため、複数遺伝子を同時に標的とするためには、多数のベクターを同時に導入する必要がある。それに対し、CRISPR-Cas9 システムでは、様々な標的配列に結合する複数種類のガイド RNA (gRNA) を、共通の Cas9/dCas9 タンパク質と共に発現させることによって、複数の遺伝子座を同時に標的とすることが可能である。本研究では、癌抑制を目指したエピゲノム編集の技術基盤を確立するため、複数遺伝子の転写の同時制御を効率的に実現させられると考えられる CRISPR-Cas9 システムを採用した。筆者らは、CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集において、Cas9 と複数の gRNA の発現カセットを搭載可能なベクターシステムを開発しており、ヒト培養細胞やマウス受精卵での複数遺伝子の同時破壊や染色体の広域欠失を効率化させることに成功してきた<sup>1,2)</sup>。更に、本システムを遺伝子ノックインに応用し、簡便かつ効率的な新規遺伝子挿入法である PITCh 法を開発している<sup>3-5)</sup>。これらのノウハウをエピゲノム編集システムの開発に活かし、最大で 7 つまでの gRNA と dCas9-VP64/KRAB を同時に発現させられる多重エピゲノム編集用の all-in-one ベクターシステムを構築した (図 1)。

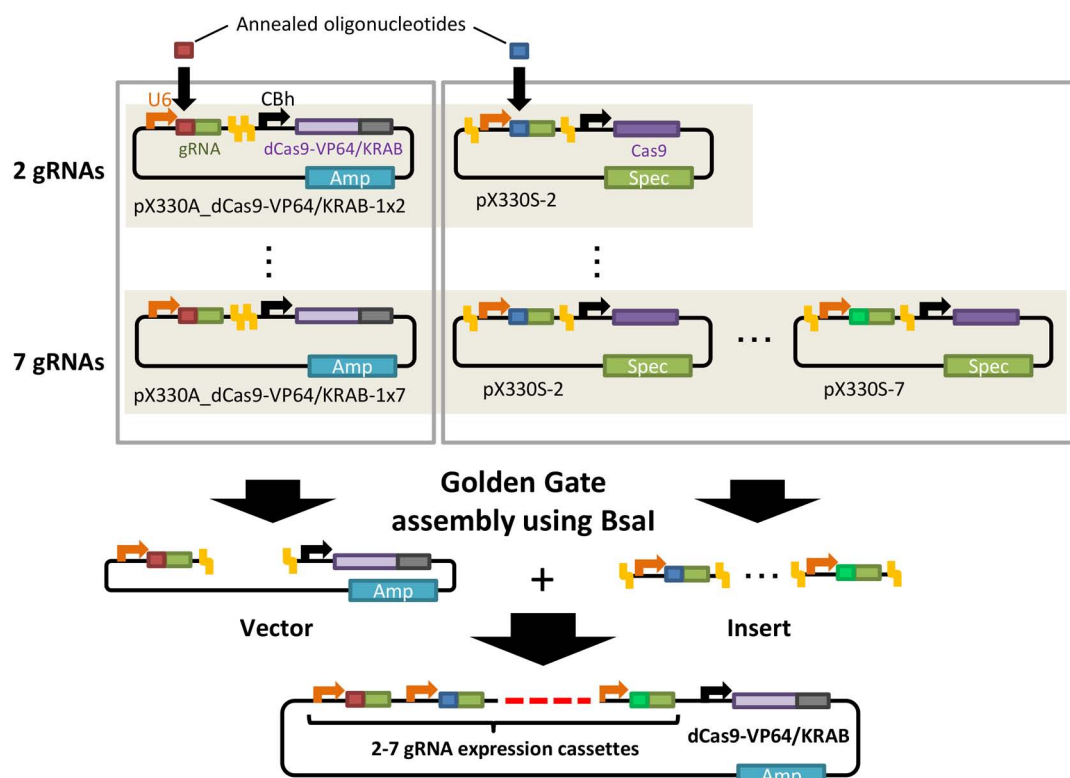


図1. 多重エピゲノム編集のための dCas9-VP64/KRAB ベクターシステム

各 gRNA の標的となる配列を、アニーリングした合成オリゴの挿入によってベクターに組み込んだ後、Golden Gate 法（後述）によって複数の gRNA 発現カセットを連結する。U6 はヒト U6 プロモーターを、CBh はニワトリ  $\beta$  アクチンハイブリッドプロモーターを、Amp はアンピシリン耐性遺伝子を、Spec はスペクチノマイシン耐性遺伝子を、それぞれ示す。

本システムでは、gRNA の鋳型となる DNA 配列をアニーリングした合成オリゴで供し、これらを組み込んだ後に、Golden Gate 法と呼ばれる手法によって統合ベクターを作製する。Golden Gate 法は、多数のインサートを任意の並びで任意の数連結させられるクローニング法であり、TALE スクレアーゼ (TALEN) の DNA 結合リピートの連結に類用される。筆者らは TALEN の作製システムの開発・改良のため、Golden Gate 法を用いたモジュールのアセンブリーシステムを複数構築しており<sup>6-8)</sup>、その経緯から本システムの開発に至った。現時点では、単一のベクターに搭載できる gRNA カセットの数は最大で7つであるが、TALEN のモジュール連結の際には、2 段階の Golden Gate クローニングを経ることで、最大で 30 程度まで連結できることが確認されており、今後本システムを拡充することにより、更なる多重化も実現可能であると考えられる。

次に、本システムの機能性を実証するため、特定の癌において発現が亢進することが見出されている遺伝子（本稿では遺伝子 X と仮称）の転写抑制を目的とした all-in-one dCas9-KRAB ベクターを構築した。この際に、遺伝子 X の転写開始点付近の 2 種類の配列に対応する gRNA (A, B) を設計し、単一の gRNA (gRNA\_A) と dCas9-KRAB を発現するベクターと、複数の gRNA (gRNA\_A と gRNA\_B) と dCas9-KRAB を発現するベクターを構築した (図 2A)。共同研究者である川崎医科大学総合外科学教室の深澤拓也氏の協力を得て、これらのベクターの転写抑制効果をレポーターアッセイによって検証したところ、単一の gRNA のみを発現させた場合と比較して、複数の gRNA を発現させた際に、転写抑制効果が有意に増強されることが明らかとなった (図 2B)。

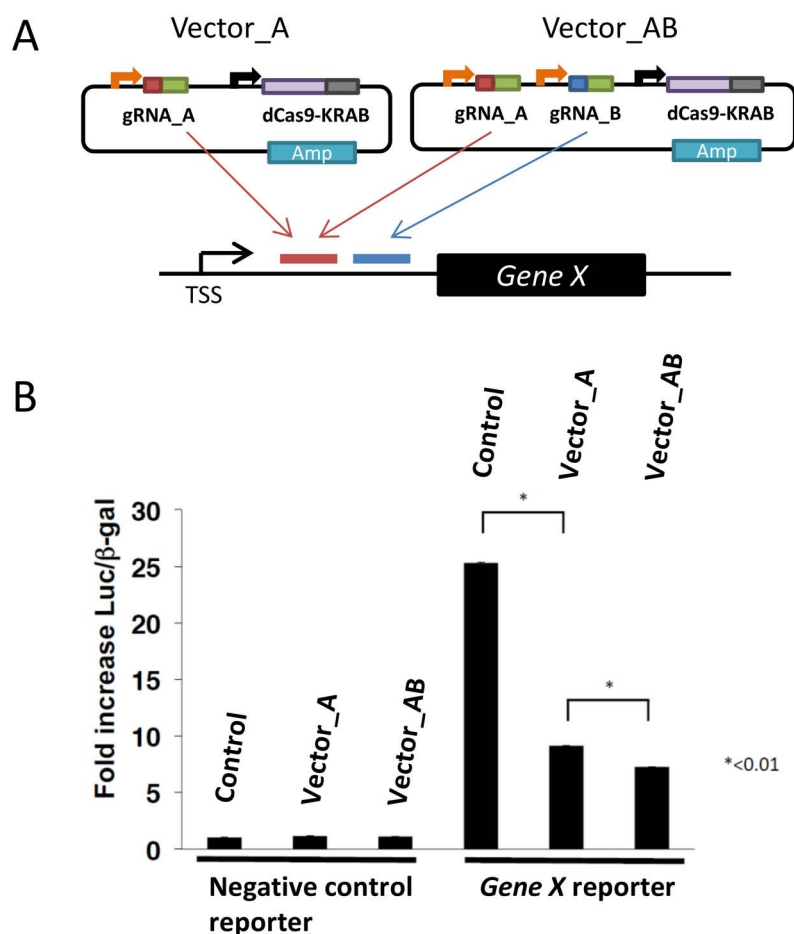


図2. all-in-one エピゲノム編集ベクターシステムの機能性評価

(A) 遺伝子 X の転写を抑制する dCas9-KRAB ベクターの模式図。TSS は転写開始点を示す。(B) レポーターアッセイによる各転写抑制ベクターの機能性評価。複数の gRNA を発現させた場合に、より強い転写の抑制効果が認められた。統計処理は student's t-test により行った。(川崎医科大学・深澤拓也氏より提供)

以上より、本研究で確立した all-in-one 多重エピゲノム編集ベクターシステムは、複数遺伝子の同時制御を可能にするだけでなく、単一遺伝子の転写制御能を増強させる働きも有することが示された。更に、本ベクターを用いて内在の遺伝子 X の転写量が減少することや、その他の遺伝子においても同様の効果が見られることが深澤らによって示されており、これを応用して複数の遺伝子座の同時転写制御に現在取り組んでいるところである。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、広島大学大学院理学研究科の山本卓、および川崎医科大学総合外科学教室の深澤拓也である。最後に、本研究をご支援頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

### 文献

- 1) Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K, Yamamoto T. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Sci Rep.* 2014;4:5400. doi: 10.1038/srep05400. PubMed PMID: 24954249.
- 2) Nakagawa Y, Sakuma T, Sakamoto T, Ohmuraya M, Nakagata N, Yamamoto T. Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed fertilized oocytes. *BMC Biotechnol.* 2015;15:33. doi: 10.1186/s12896-015-0144-x. PubMed PMID: 25997509.
- 3) Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, Yamamoto T, Sakuma T, Suzuki KT. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells

- and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun.* 2014;5:5560. doi: 10.1038/ncomms6560. PubMed PMID: 25410609.
- 4) Hisano Y, Sakuma T, Nakade S, Ohga R, Ota S, Okamoto H, Yamamoto T, Kawahara A. Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Sci Rep.* 2015;5:8841. doi: 10.1038/srep08841. PubMed PMID: 25740433.
  - 5) Sakuma T, Nakade S, Sakane Y, Suzuki KT, Yamamoto T. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nat Protoc.* 2016;11(1):118-33. doi: 10.1038/nprot.2015.140. PubMed PMID: 26678082.
  - 6) Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki K, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S, Yamamoto T. Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes Cells.* 2013;18(4):315-26. doi: 10.1111/gtc.12037. PubMed PMID: 23388034.
  - 7) Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, Suzuki K, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S, Yamamoto T. Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Sci Rep.* 2013;3:3379. doi: 10.1038/srep03379. PubMed PMID: 24287550.
  - 8) Sakuma T, Yamamoto T. Engineering Customized TALENs Using the Platinum Gate TALEN Kit. *Methods Mol Biol.* 2016;1338:61-70. doi: 10.1007/978-1-4939-2932-0\_6. PubMed PMID: 26443214.