

【目的】 CRISPR-Cas9 システムでは、ガイド RNA (gRNA : guide RNA) によって Cas9 が gRNA と相補的であり 3'側に PAM 配列を持つターゲット標的 DNA 領域にリクルートされ、二本鎖 DNA 切断 (DSB : double-stranded DNA break) を引き起こす。この性質がこれまでに、DSB 後の DNA 修復エラーに依存した遺伝子破壊や、DSB 誘導性の相対的組換え (HR : homologous recombination) を利用したドナー DNA の染色体へのノックインなどのゲノム編集を可能にしてきた。さらに、DSB 誘導性の HR によってゲノム配列の特定の一塩基を置換あるいは修正するゲノム治療技術も提案されてきた。しかしながら、この DSB を介した塩基編集戦略は、細胞毒性や染色体切断による染色体の欠失や転座を引き起こすことが示されている他、HR 自体の効率が低いなどの問題が知られていた。このような中で、塩基編集ツールと呼ばれる技術も開発されてきた。塩基編集ツールでは、ヌクレオシド脱アミノ化酵素をヌクレアーゼ欠損型またはニカーゼ型の Cas9 (dCas9 または nCas9) と gRNA の複合体に融合させることによって、染色体のターゲット配列に脱アミノ化を介した直接的な塩基置換を誘導することができる。塩基編集ツールではこれまで大きく C→T 塩基編集ツールと A→G 塩基編集ツールが開発されてきた。C→T 塩基編集ツールは変異型 Cas9 がシチジン (C) 脱アミノ化酵素を有し gRNA ターゲット配列の C を T に変換する。A→G 塩基編集ツールは変異型 Cas9 がアデノシン (A) 脱アミノ化酵素を有し gRNA ターゲット配列の A を G に変換する。これらの塩基編集ツールは、染色体を切断しないために、染色体の欠失や転座、あるいは切断による細胞毒性を最小限に抑えたままに狙った染色体配列を編集することができ、「ゲノムの変異を治療する」という分野において期待が高い。また、これだけでなく、人工的な変異の導入による遺伝子の機能解析、人工タンパク質進化実験、ゲノム編集と DNA バーコードを利用した高解像度細胞系譜トレーシング、などの分野においてその応用が期待される。しかしながら、現在の塩基編集ツールは、C→G→T→A または A→T→G→C 置換のいずれかしか実現することができず、これらが生み出すことのできる塩基編集のパターンは限られていた。

【方法】 変異型 Cas9 にシチジン脱アミノ化酵素とアデノシン脱アミノ化酵素の両方を融合したいくつかの多重塩基編集ツールを構築し、これらに対応する単一塩基編集ツールと単一塩基編集ツールの混合とともにヒト培養細胞 HEK293Ta を用いたゲノム編集評価実験を行った。ゲノム編集後、ゲノム中のターゲット領域を超並列 DNA シークエンシングによって解析してその活性を解析した。また、エキソームシークエンシングやトランスクリプトーム解析によるオフターゲット評価を行った。さらに、超並列 DNA シークエンシングデータの学習によって様々な塩基編集ツールの編集パターンを予測できる機械学習モデルを樹立した。

【結果】 多重塩基編集ツールのうち Target-ACEmax が高い C→T および A→G 塩基編集活性を持ち、汎用的にゲノム領域を編集できることを示した。さらにこれが既存の単一塩基編集ツールの RNA および DNA オフターゲット効果を越えずに正確に異種塩基同時編集を引き起こせることが、ゲノムのタンパク質コード領域に対して人工的に大きな多様性を生み出せることを示した。

Target-ACEmax の構造

