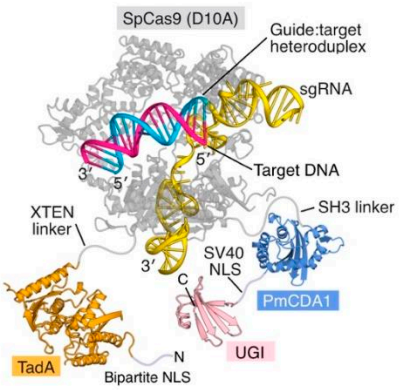
56　多重塩基編集技術の開発	谷内江　望

【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 誘導性の相同的組換え（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



56. 多重塩基編集技術の開発

谷内江　望

東京大学 先端科学技術研究センター 合成生物学分野

Key words：ゲノム編集，塩基編集，ヌクレオシド脱アミノ化，超並列 DNA シークエンシング，機械学習

緒　言

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 誘導性の相同的組換え（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［1］。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［2, 3］と A→G 塩基編集ツール［4］が開発されてきた。C→T 塩基編集ツールでは一般的に dCas9 または nCas9 にシチジン脱アミノ化酵素とウラシルグリコシラーゼ阻害剤（UGI：uracil glycosylase inhibitor）タンパク質が融合しており、C の脱アミノ化によるウリジン（U）への置換後、UGI による一塩基除去修復の阻害によって、DNA のミスマッチ修復と複製を介してこれを T にすることができる。C→T 塩基編集ツールの中でも BE3 や BE4 などでは rAPOBEC1 が、Target-AID では PmCDA1 がシチジン脱アミノ化酵素として用いられる。A→G 塩基編集ツールでは、アデノシン（A）をイノシン（I）に変換するアデノシン脱アミノ化酵素が用いられる。DNA を基質にしたアデノシン脱アミノ化酵素は天然に存在しないが、これまでに大腸菌 tRNA アデノシン脱アミノ化酵素である TadA の人工進化実験によって得られた変異体と野生型のヘテロ二量体が dCas9 または nCas9 に融合すると、標的とする A を I に置換できることが明らかになった。I は DNA 複製によってグアニン（G）に置換されるため、最終的に A→G 塩基編集が可能になる。また nCas9（D10A）を利用して gRNA と結合する DNA 鎖側にニックを入れると、脱アミノ化を受けた塩基を持つ DNA 鎖が DNA 修復のテンプレートとして仕様されるために、塩基編集効率が高くなることも知られている。

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。したがって、本研究では C→T 塩基編集活性と A→G 塩基編集活性の両方を有する多重塩基編集ツールを開発した。

方法および結果

1. 多重塩基編集ツールの設計

本研究では C→T 編集と A→G 編集を同時に実現する多重塩基編集ツールを開発するために、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単一の nCas9 (D10A) に融合させた Target-ACE (adenine cytosine editor)、Target-ACEmax、ACBEmax（adenine cytosine base editor）の 3 種類の酵素を設計した。Target-ACE は、Target-AID の PmCDA1 が C 末端に、ABE の TadA ヘテロ二量体が nCas9 の N 末端に融合し、UGI や核局在シグナル（NLS）を含む Target-AID と ABE に用いられている他の機能ドメインから構成されるようにした。Target-AID で用いられている PmCDA1 は、BE3 や BE4 で用いられている rAPOBEC1 と比較して、細胞内 RNA 分子に対するオフターゲット編集効果が低いことが報告されている。また、これまでに GenScript 社のプログラムによる ORF（open reading frame）のコドン最適化と N 末端の bipartite NLS の追加によって、BE4 や ABE の効率を向上させた BE4max と ABEmax が報告されている［5］。したがって、Target-ACE に対してもさらに同様のコドン最適化と bipartite NLS の追加を適用して Target-ACEmax を導出した（図 1a）。これらに加えて、Target-ACEmax の C 末端 PmCDA1 ドメインを BE4max の rAPOBEC1 ドメインと置き換えた ACBEmax を得た。さらに対照とする単一塩基編集ツールとして Target-AID、BE4max、ABE、ABEmax に加えて、Target-ACEmax の対照として Target-AIDmax を、ACBEmax の対照として Target-AIDmax の C 末端 PmCDA1 ドメインを BE4max の rAPOBEC1 ドメインで置き換えた BE4max（C）を準備した。

2. 多重塩基編集ツールの異種塩基編集活性

はじめに、標的 DNA 配列のシークエンシングによる評価を行わずに、細胞における C→T 編集および A→G 編集の活性を簡便にスクリーニングできるように、対応する塩基置換が EGFP タンパク質の翻訳を活性化するように設計された C→T および A→G 塩基編集レポーターを構築した。C→T レポーターでは、EGFP の翻訳開始コドン（ATG）が GTG に置き換わっており、タンパク質翻訳が生じないが、このアンチセンス鎖の C→T 編集によって開始コドンを復元させることができる。A→G レポーターでは EGFP の上流に翻訳停止コドン（TAA）が配されており、タンパク質翻訳が生じないが、このアンチセンス鎖の A→G 編集によって停止コドンを破壊して、EGFP の翻訳を誘導することができる。これらのレポーターをそれぞれレンチウィルスによってヒト HEK293Ta 細胞に導入し C→T レポーター細胞株および A→G レポーター細胞株を樹立、これらに上で準備した様々な塩基編集ツールと標的 gRNA および非標的 gRNA の組み合わせをトランスフェクションによって導入して EGFP の蛍光発現パターンを観察した。この結果、全ての C→T 編集ツールである Target-AID、Target-AIDmax、BE4max（C）および BE4max は、C→T レポーター細胞を活性化することはできたが、A→G レポーター細胞を活性化することはできなかった。同様に、A→G 編集ツールである ABE および ABEmax は、A→G レポーター細胞を活性化することはできたが、C→T レポーター細胞を活性化することはできなかった（図 1b）。一方で、多重塩基編集ツールとして構築した Target-ACE、Target-ACEmax および ACBEmax、ならびにそれらに対応する単一塩基編集ツールの混合剤として準備した Target-AID＋ABE、Target-AIDmax＋ABEmax、BE4max（C）＋ABEmax、および BE4max＋ABEmax はすべて C→T レポーター細胞および A→G レポーター細胞の両方を活性化することができた。

3. 多重塩基編集ツールの異種塩基編集活性

次に異なる準備した全ての塩基編集ツールによる C→T および A→G 編集の活性を測定するために、それぞれを用いて HEK293Ta 細胞の 47 箇所のゲノム領域を編集後（3 レプリケート実験）、これらの領域を PCR 法によって増幅し、超並列 DNA シークエンシングによって解析した（計 1,833 アッセイ）。全てのターゲット領域について PAM からの相対距離における C→T および A→G 編集の頻度の平均を解析した結果、全ての多重塩基編集ツールまたは単一塩基編集ツールの混合は C→T および A→G 編集それぞれについて対応する単一塩基編集ツールの編集スペクトラムを受け継いでいることが確認された（図 1c）。各ターゲット領域についてそれぞれいくつの C または A を含むかによって、その領域が何らかの編集を受ける頻度というものは大きく変わってきたが、この値も全体的に塩基編集スペクトラムのデータと一致していた。また塩基編集レポーター細胞を用いた実験とも良く一致した。

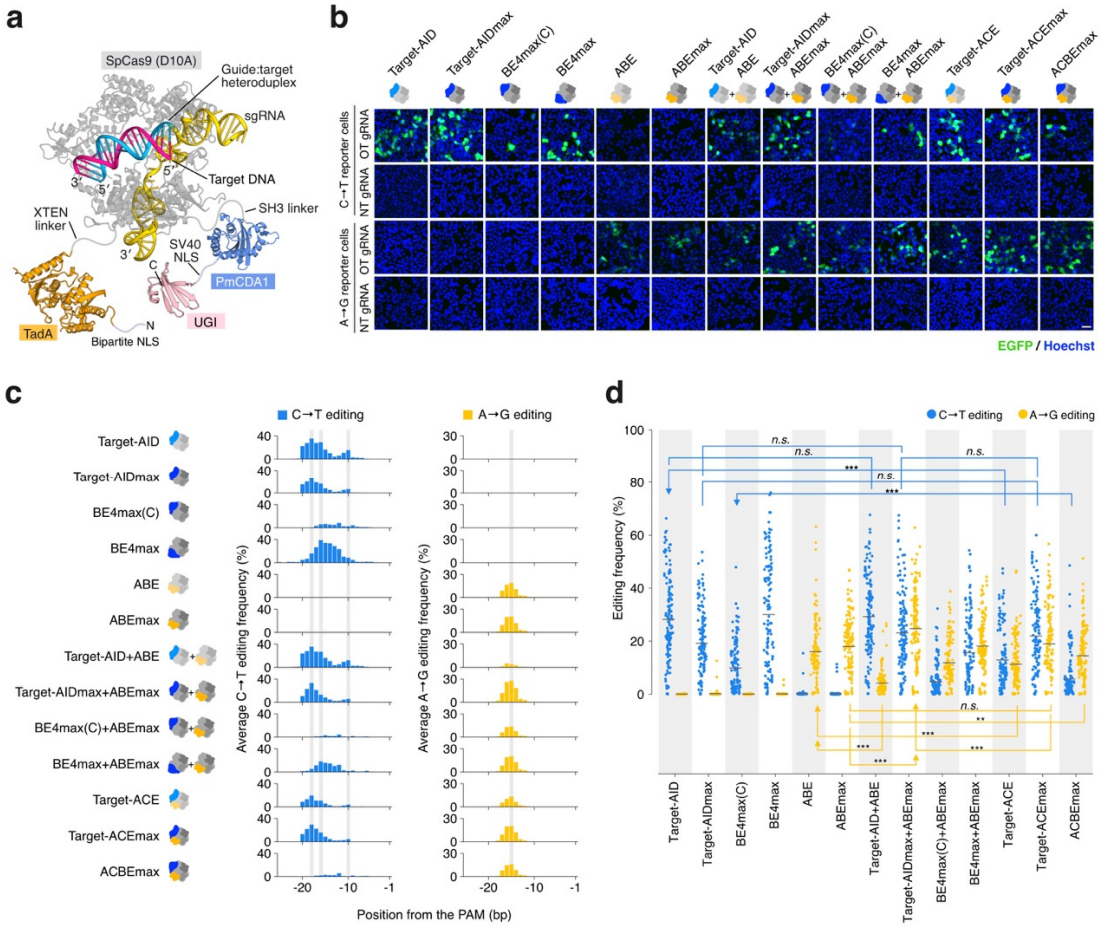


図 1. 多重塩基編集ツールと単一塩基編集ツールの C→T および A→G 編集活性

a) Target-ACEmax の構造。

b) C→T レポーター細胞、A→G レポーター細胞をオンターゲット (OT) またはノンターゲット (NT) gRNA で編集した結果。スケールバーは 40 μm。

c) C→T および A→G 塩基編集スペクトラム。

d) C→T および A→G 塩基頻度。*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001 (Mann-Whitney U 検定)。

4. 異種塩基の同時編集効率

さらに、ヒトゲノム中の 47 のターゲット領域について、多重塩基編集ツールおよび単一塩基編集ツールの混合によって同時に生じる異種塩基編集パターンについて解析した。この結果、0.1%以上の頻度で C→T および A→G の両方を保持する編集パターンが計 722 確認された (図 2a)。全体的に、Target-ACEmax と Target-ACE とこれらが対応する単一塩基編集ツールの混合は、ACBEmax とこれが対応する単一塩基編集ツールの混合とは異なる異種塩基同時編集パターンを示した。次に、それぞれの多重塩基編集ツールがどのような位置にある C と A の同時編集を得意とするのか解析するために、二塩基同時編集スペクトラムを解析した。この結果、Target-ACEmax および Target-AIDmax+ABEmax は、PAM から−18 bp の C および−15 bp の A の周辺を同時に編集することが分かり、それぞれピークポジションの組み合わせにおいて 19.2%および 21.0%という高い同時編集頻度が観察された。一方で、ACBEmax および BE4max+ABEmax は、これとは異なる同時塩基編集スペクトラムを示し、PAM から−12 bp の C および−15 bp A をピンポイントとに同時編集するという結果が得られ、それぞれ同時編集頻度は 23.2%と 23.6%であった。

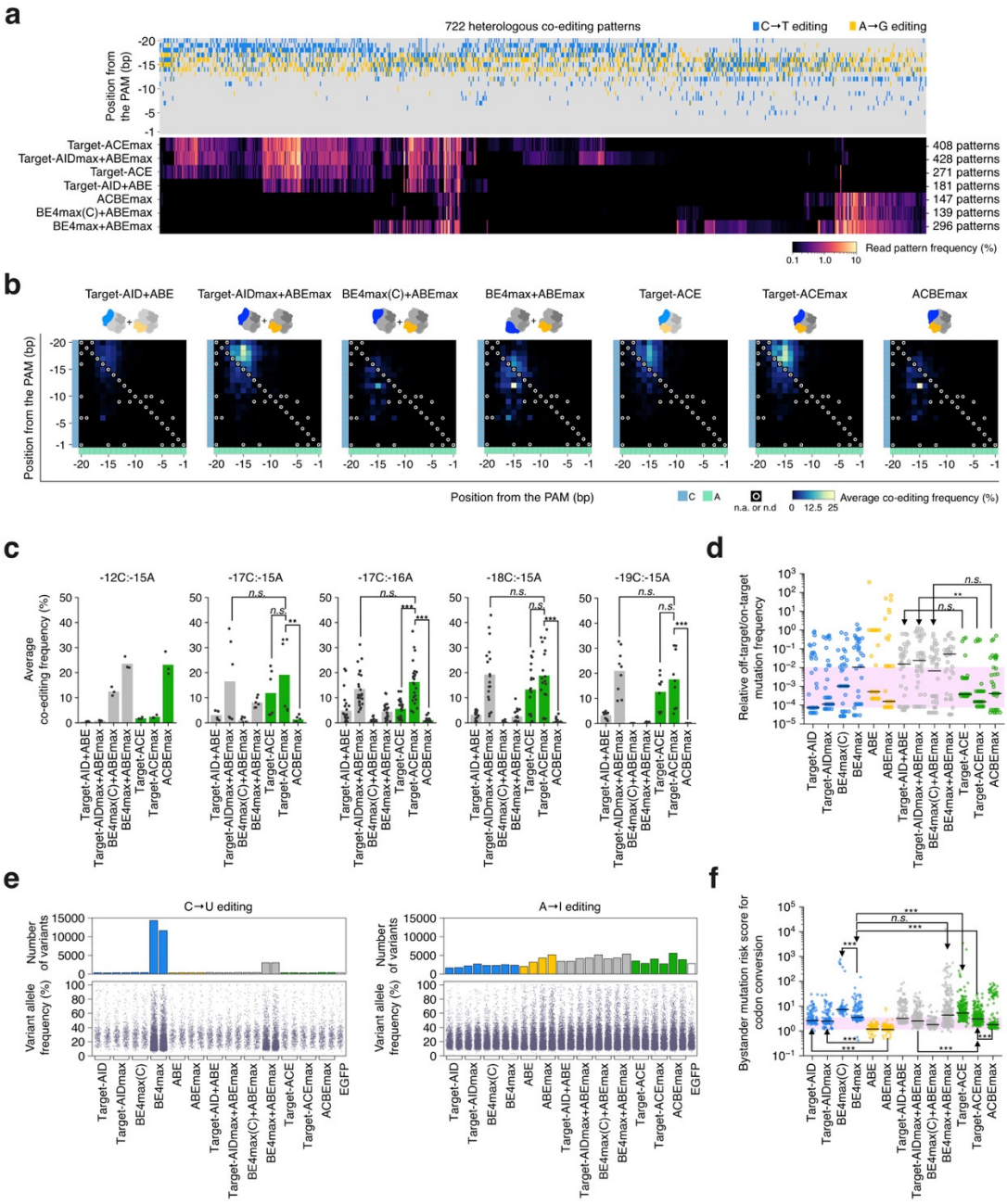


図 2. 多重塩基編集と意図しない編集パターンのリスク

a) C→T および A→G の両方を持つ塩基編集パターン。

b) 異種塩基同時編集スペクトラム。

c) 特定の位置にある C と A の組み合わせについての同時塩基編集頻度。*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001（Mann-Whitney U 検定）。

d) DNA オフターゲットスコア。**P < 0.01（ウェルチの t 検定）。

e) RNA-seq によって同定された非特異的な RNA 編集。

f) バイスタンダーリスクスコア。***P < 0.001（Mann-Whitney U 検定）。

5. オフターゲット効果

近年、gRNA が意図しない領域に Cas9 を誘導して編集してしまう DNA オフターゲット効果や塩基編集ツールが細胞質内に存在する RNA 分子を脱アミノ化反応によって非特異に編集してしまう RNA オフターゲット効果が報告され、

これらの効果を軽減するための様々な変異体も開発が進んでいる。まず本研究で用いた計 13 種類の塩基編集ツールの DNA オフターゲット効果を調べるために、それぞれを 3 種類のゲノム領域を狙う gRNA と組み合わせて用いて HEK293Ta 細胞を編集し、これらの gRNA の DNA オフターゲット領域として報告されているゲノム領域の編集パターンを超並列 DNA シークエンシングによって解析した。この結果からそれぞれの塩基編集ツールの DNA オフターゲットスコアを算出した結果、多重塩基編集ツールのオフターゲットスコアはいずれも単一塩基編集ツールの示したオフターゲットスコアの範囲内であったが、単一塩基編集ツールの混合はそれぞれが対応する多重塩基編集ツールよりも有意に高いオフターゲットスコアを示した。さらに、それぞれの塩基編集ツールで処理した細胞について全エキソームシークエンシング（WES : whole exome sequencing）およびトランスクリプトームシークエンシング（RNA-seq）を用いて、ゲノムワイドの DNA および RNA オフターゲット活性を計測した。この結果、WES データセットにおいては、塩基編集ツールによる非特異な変異誘導は検出されなかったが、rAPOBEC1 を持つ塩基編集ツールからは PmCDA1 を持つ塩基編集ツールよりも有意に多い非特異な C→U RNA 編集が観察された（rAPOBEC1 系からは平均 3,403 の非特異な変異が検出されたのに比べて PmCDA1 系からは 322）。また、非特異な A→I RNA 編集は、ABEmax および ABE または ABEmax を含む塩基編集ツールの混合が他のものよりも有意に高い活性を示した（P 値 = 0.00019）。しかしながら、特筆すべきは、Target-ACEmax の非特異的 A→I 編集活性（2 回のレプリケートで平均 3,359）が、Target-AIDmax＋ABEmax のそれ（平均 4,179）よりも相対的に低かったことである。

6. 機械学習による異種塩基同時編集能力の予測

近年、機械学習によって野生型の Cas9 がターゲット領域に引き起こす編集パターンを予測する手法も登場しつつあるが、本研究においても新たに塩基編集ツールによる編集パターンを予測する機械学習手法を開発した。超並列 DNA シークエンシングによって HEK293Ta 細胞における編集パターンとその頻度を網羅的に計測したデータを学習し、任意の与えられたターゲット領域にどのような編集パターンが生じるか予測する手法を得た。その結果、Target-ACEmax と ACBEmax の多重塩基編集ツールについてはピアソン相関係数がそれぞれ 0.70 と 0.71 で学習に用いていないターゲット領域の編集パターンを予測することができた。この機械学習は多重塩基同時編集の予測が可能であったため、次に、これを用いて異なる塩基編集ツールがヒトゲノム中のタンパク質コード領域のアミノ酸をどのくらいの頻度で別のアミノ酸に変換できるか予測した。この結果、Target-ACEmax とこれに対応する単一塩基編集ツールの混合である Target-AIDmax＋ABEmax が、ゲノムのアミノ酸をコードするコドンの多様化に対して最も高い能力を有することを示した。さらに同様の機械学習法を用いて、目的とするアミノ酸コードの変換がある場合に、それぞれの塩基編集ツールがどのくらいの頻度で望まない塩基編集を生み出してしまうか（バイスタンダーリスク）を予測した。この結果、Target-ACEmax と ACBEmax のバイスタンダーリスクは、これまでに報告されてきた単一塩基編集ツールのリスク範囲内であることが示された。ACBEmax のバイスタンダーリスクは Target-ACEmax よりも有意に低かったが、これは ACBEmax がそもそもゲノム中のコドンをあまり変換できないという結果と一致していた。最後に、Target-ACEmax は単一の塩基編集ツールとして ClinVar データベースで報告されている複数の異種疾患変異の組み合わせを最も効率良く同時に修正できる可能性があることが示された。

考　察

本研究では、gRNA のターゲット領域に高い確立で C→T および A→G の異種同時塩基編集を引き起こすことのできる Target-ACEmax と ACBEmax という多重塩基編集ツールを創出することができた。本研究では HEK293Ta 細胞のみが用いられており、実際の動物や他の生物における性能試験は今後の課題であるが、これらの多重塩基編集ツールの遺伝子サイズが二つの単一塩基編集ツールの混合を想定した場合のそれらの遺伝子サイズの和よりも飛躍的にコンパクトであることを考えると、これらの新規多重塩基編集ツールは明らかに高い細胞デリバリー効率を持つと考えられる。このことは、治療を含む様々な場面で多重塩基編集を誘導するゲノム編集ツールとして高い可能性を示唆する。近年、他の塩基編集ツールとして変異型ヒト AID を用いた CRISPR-X などがあり［6］、これらは gRNA ターゲット領域周辺の数百 bp 領域に C→A/G/T 置換を誘導する変異誘導ツールとして開発された。しかしながら、各ポジションあたりの絶対塩基編集効率が極めて低かった。一方で、Target-ACEmax は CRISPR-X よりもはるかに

高い異種塩基編集効率を示しており、生体内で *in vivo* でのターゲット配列を高効率に多様化できるツールとして、変異スキャン解析によるタンパク質機能の解析や人工タンパク質進化実験などに応用できる可能性がある。

さらに、Target-ACEmax は、ゲノム編集と DNA バーコードを組み合わせた最近の細胞系譜トレーシング手法のためにも強力なツールとなり得る［7］。現在このような細胞系譜トレーシング手法のほとんどは DSB を誘導する野生型 Cas9 を利用している。これらの DSB は細胞毒性をもたらし、標的部位の欠失によって DNA バーコードに蓄積する変異パターンを急速に飽和させ、DNA バーコードから再構成される細胞系譜の解像度を大きく制限する。塩基編集ツールは DSB によって引き起こされるこれらの影響を最小限に抑えることができると考えられるが、これまでに単一塩基編集ツールによって引き起こすことのできる編集パターンは一方向性であり、これも DNA バーコードに蓄積する変異を飽和させる（たとえば C→T 編集ツールにおいて全ての C が T に変換された段階において新たな変異は蓄積できなくなる）。対照的に、Target-ACEmax は可逆的な C·G⇄T·A 活性を有するため、この飽和の問題を緩和して高解像度の細胞系譜トレーシングの実現に貢献できる可能性がある。このように、今回開発した多重塩基編集ツールは治療薬やバイオテクノロジーの開発を促進する高い可能性を持つ。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学先端科学技術研究センター谷内江研究室の坂田莉奈学部学生、石黒宗研究員、森秀人博士課程学生、田中護技術員、関元昭助教、増山七海博士課程学生、同センター油谷研究室の辰野健二研究員、山本尚吾研究員、油谷浩幸教授、同センター上田研究室の上田宏生講師、神戸大学大学院科学イノベーション研究科の近藤昭彦教授、西田敬二教授、東京大学大学院理学系研究科の濡木理教授、西増弘志准教授、慶應義塾大学先端生命科学研究所の冨田勝教授、荒川和晴准教授である。

文　献

1） Rees HA, Liu DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. Nat Rev Genet. 2018 Dec;19(12):770-788. PMID: 30323312 DOI:10.1038/s41576-018-0059-1

2） Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z, Kondo A. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. Science. 2016 Sep 16;353(6305):aaf8729. Epub 2016 Aug 4. PMID: 27492474 DOI: 10.1126/science.aaf8729

3） Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature. 2016 May 19;533(7603):420-4. Epub 2016 Apr 20. PMID: 27096365 DOI: 10.1038/nature17946

4） Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. Nature. 2017 Nov 23;551(7681):464-471. Epub 2017 Oct 25. PMID: 29160308 DOI: 10.1038/nature24644

5） Koblan LW, Doman JL, Wilson C, Levy JM, Tay T, Newby GA, Maianti JP, Raguram A, Liu DR. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. Nat Biotechnol. 2018 Oct;36(9):843-846. Epub 2018 May 29. PMID: 29813047 DOI: 10.1038/nbt.4172

6） Hess GT, Frésard L, Han K, Lee CH, Li A, Cimprich KA, Montgomery SB, Bassik MC. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells. Nat Methods. 2016 Dec;13(12):1036-1042. Epub 2016 Oct 31. PMID: 27798611 DOI: 10.1038/nmeth.4038

7） Masuyama N, Mori H, Yachie N. DNA barcodes evolve for high-resolution cell lineage tracing. Curr Opin Chem Biol. 2019 Oct;52:63-71. Epub 2019 Jun 15. PMID: 31212208. DOI: 10.1016/j.cbpa.2019.05.014