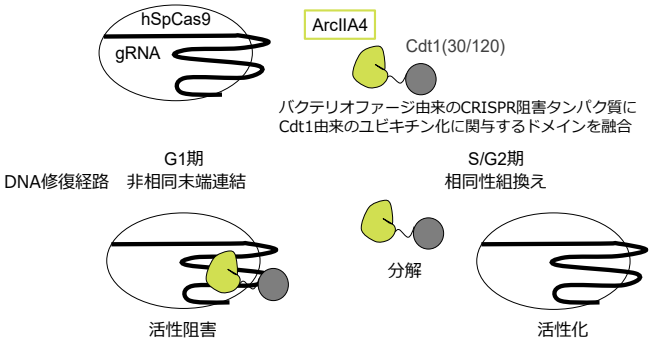
98　相同性組換えを誘導するCas9変異体の取得への挑戦	松本　大亮

【目的】CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集の方法として、Cas9 による二本鎖切断導入後に、細胞の持つ DNA 修復機構を介して DNA 配列を改変する。この時の修復過程には非相同末端結合（Nonhomologous End Joining : NHEJ）と相同組換え修復（Homology Directed Repair : HDR）の 2 つの経路がある。HDR は鋳型 DNA を加えることで修復後に生成する配列を制御でき、より精密なゲノム編集ができる。HDR は細胞周期の S/G2 期に活性が高いことが知られ、NHEJ は細胞周期全体で活性がある。そのため、細胞周期の S/G2 期に DNA 切断を活性化できれば、HDR を介した修復を優先的に引き起こせる。これまでに、細胞周期依存的な Cas9 の活性化による HDR 効率の向上ができることを示した。また、オフターゲット作用も低減できたが、依然として数%のオフターゲット変異が検出された。そこで、これまでに報告されたオフターゲット作用が低い Cas9 変異体に関する網羅的な HDR 効率の評価及び細胞周期依存的な活性化による相乗効果の検討と HDR を引き起こした細胞を回収するスクリーニング系を構築することで HDR を誘発する Cas9 変異体を取得し、HDR を優先的に引き起こすために重要な因子の探索を目的とする。

【方法】ヒト胎児腎細胞（HEK293 細胞）を用いて 10 種類の SpCas9 変異体に関して HDR 効率を評価した。鋳型 DNA として制限酵素 HindⅢの認識配列を持つ一本鎖オリゴ DNA（ssODN）を用いた。エピソーマルベクター上に各種 Cas9 変異体を搭載し、リポフェクション法にて HEK293 細胞に導入した。ハイグロマイシンによる選抜後に *EMX1* 遺伝子を標的とした sgRNA をコードするプラスミドと ssODN を導入した。ゲノム抽出後に標的配列周辺を PCR で増幅し、PCR 産物を HindⅢ処理することで、HDR 効率を算出した。ジフテリア毒素に対する耐性を指標としたスクリーニング系では、野生型 Cas9 と EGFP を自己切断ペプチド（P2A）で連結させた遺伝子をレンチウイルスベクターに乗せて、HEK293 細胞に感染させた。FACS を用いて EGFP 陽性細胞のみ分取した。この細胞をレポーター細胞として条件を最適化した。レポーター細胞に鋳型 DNA のみをエレクトロポレーション法で導入し、鋳型 DNA によるノックインが起こらない DNA 量を検討した。その後、最適な鋳型 DNA 量に固定した際の最適な HBRGF 標的 gRNA の量を検討した。ノックイン効率は鋳型 DNA 上に赤色蛍光タンパク質（*mCherry*）遺伝子が組み込まれるような設計をしたため、蛍光顕微鏡観察及びフローサイトメトリーによって mCherry 陽性細胞を評価した。

【結果】10 種類の SpCas9 のうち、3 種類の Cas9 変異体に関して、*EMX1* 遺伝子を標的とした際に HDR 効率が向上することがわかった。また、その中でも SpCas9-HF1 を細胞周期依存的な活性化を行うことで、HDR 効率の向上とオフターゲット作用の低減の両立が可能であることがわかった。スクリーニング系の最適化において、2.5 μg の鋳型 DNA と 1.5 μg の *hHBEGF* 標的 gRNA プラスミドを導入することによって、Cas9 による DNA 二本鎖切断後に HDR を介したノックインが誘発された。エレクトロポレーションによる鋳型 DNA と gRNA の導入から 48 時間後に DT を添加し、細胞死誘導を評価した結果、3 日以上の DT 処理により、HDR 修復後の細胞のみが選抜されることがわかった。さらに、網膜由来の hTERT 不死化細胞株である hTERT RPE-1 細胞を用いてスクリーニングを実施した。その結果、取得された Cas9 変異体において、野生型の Cas9 よりも高い HDR 活性を示した。

細胞周期依存的な CRISPR-Cas9 活性



98. 相同性組換えを誘導する Cas9 変異体の取得への挑戦

松本　大亮

広島大学 大学院医系科学研究科 創薬標的分子科学研究室

Key words：相同性組換え，CRISPR-Cas9，ゲノム編集，ジフテリア毒素

緒　言

これまでの医薬品は疾患に関与する異常タンパク質を調節する分子を調製し、投与することで疾患の治療を行ってきた。しかし、このような手法では反復的かつ、継続的な医薬品投与が必要であり、患者さんの QOL を考慮した際には、より少ない薬剤投与での疾患改善方法が必要となる。近年の技術進歩に伴い、遺伝子治療や細胞治療といった新規治療法が開発され、より長期的な薬効と患者さんの QOL 向上が期待されている。これらの治療に深く関与する技術として、ゲノム編集技術がある。CRISPR-Cas9 の登場以降、世界中の研究者によって、このゲノム編集技術の医薬品、品種改良などへの応用が盛んに行われている。CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集の方法として、single guide RNA（sgRNA）による 20 塩基程度の標的配列認識と Cas9 エンドヌクレアーゼによる DNA 二本鎖切断導入後に、細胞の持つ DNA 修復機構を介して DNA 配列を改変する。この時の修復過程においては非相同末端結合（Nonhomologous End Joining：NHEJ）と相同組換え（Homology Directed Repair：HDR）の 2 つの経路が存在する。HDR はドナー配列を加えることで修復後に生成する配列を制御でき、より精密なゲノム編集が可能になる。 NHEJ では様々な配列が生成するため、目的配列をもつ細胞をゲノム編集後に選抜するために労力を要する。そのため，HDR を優位に起こす手法も必要とされている。HDR は細胞周期の S/G2 期に活性が高いことが知られ、NHEJ は細胞周期全体で活性がある。そのことから、細胞周期の S/G2 期に DNA 切断を活性化できれば、HDR を介した修復を優先的に引き起こせると考えられる。我々はこれまでに、バクテリオファージ由来の CRISPR-Cas9 阻害タンパク質である、anti-CRISPR を細胞周期依存的に発現させることによって、CRISPR-Cas9 の活性を制御するシステムを開発した [1]。このシステムにより、HDR の効率の向上が確認され、さらには標的外の配列における変異導入であるオフターゲット作用の減少傾向も確認された。一方で、標的配列での NHEJ 効率は依然として高い結果となった。したがって、細胞周期という因子以外にも HDR を効率的に引き起こす因子があると考えられる。我々は、開発した細胞周期依存的な CIRSPR 活性化システムとの併用を見据え、これまでに報告されたオフターゲット作用を抑えられる Cas9 変異体と HDR 効率の関係性について評価した。その結果、その変異体の一つである eSpCas9 において野生型やその他の変異体よりも高い HDR 効率を示した。この eSpCas9 は他の変異体と比較してヌクレアーゼドメインである HNH ドメインと RuvC ドメインの塩基性アミノ酸がアラニンに置換されていることが特徴であった。これにより、DNA との相互作用が弱まっている。その他の変異体も同様の戦略が取られていたが、ヌクレアーゼドメイン以外のドメインにおける変異導入であった。これらのことから、Cas9 のヌクレアーゼドメインにおける変異導入による相互作用の変化に伴い、切断面や切断後の Cas9 の DNA からの解離のしやすさなどが変化し、HDR の向上に繋がった可能性がある。

そこで、本研究では、HDR を引き起こした細胞を回収するスクリーニング系を構築することで HDR を誘発する Cas9 変異体を取得し、HDR を優先的に引き起こすために重要な因子の探索を目的とする。取得した変異体をもとに、DNA 切断における反応速度や切断後の DNA からの解離速度、DNA 切断面の評価、結晶構造解析等を実施することにより、HDR の誘発に重要な因子を抽出する。また、得られた変異体を我々がこれまでに開発してきた細胞周期依存的な CRISPR-Cas9 活性化システムと併用することによって、HDR をさらに優先的に引き起

こし、より正確な DNA 配列編集が可能なシステムへと応用する。

方　法

1. 既知の High Fidelity SpCas9 変異体における HDR 効率の評価

これまでに、4 種類の Cas9 変異体について HDR 効率を評価したところ、eSpCas9 において HDR 効率が高い結果が得られた。そのため、さらに網羅的な解析を実施するために、さらに 6 種類を追加した合計 10 種類の Cas9 変異体の遺伝子はエピソーマルベクター（pEBMulti-Hyg, Fujifilm）上に乗せた。また、*EMX1* 遺伝子を標的としたガイド RNA（gRNA）をコードするプラスミドベクターも構築した。ヒト胎児腎細胞（HEK293 細胞）に対して、Lipofectamine 3000（Thermo Fisher Scientific）を用いて各種 Cas9 変異体をコードするエピソーマルベクターを導入した。ハイグロマイシン b（Fujifilm）を 350 μg/mL で添加した培地中で、3 日間セレクションを行った。その後、*EMX1* 遺伝子標的 gRNA をコードするプラスミド DNA と鋳型となる一本鎖オリゴ DNA（ssODN）をエレクトロポレーション法で導入した。この ssODN には制限酵素 HindⅢによって認識される配列が組み込まれるように設計した。72 時間培養後に、ゲノムを回収し、PCR によって *EMX1* 遺伝子の標的配列周辺を増幅した。その後、制限酵素 HindⅢによって処理をすることで、HDR によるノックインの効率を求めた。

2. Cas9 変異体の細胞周期依存的な活性化

方法 1 の実験結果によって、野生型 Cas9 よりも高い HDR 効率が見られた eSpCas9、SpCas9-HF1、LZ3 Cas9 に対して細胞周期依存的な活性化が可能となるように、AcrⅡA4-Cdt1 及び AcrⅡA5-Cdt1 と共発現するための遺伝子を構築し、エピソーマルベクターに乗せた。Lipofectamine 3000 を用いて、それぞれの遺伝子をコードするエピソーマルベクターを HEK293 細胞へと導入した。ハイグロマイシン b を 350 μg/mL で添加した培地中で、3 日間セレクションを行った。その後、*AAVS1*、*EMX1* または *VEGFA* 遺伝子標的 gRNA をコードするプラスミド DNA とそれぞれの鋳型 ssODN をエレクトロポレーション法で導入した。72 時間培養後に、ゲノムを回収し、PCR によって *EMX1* 遺伝子の標的配列周辺を増幅した。その後、制限酵素 HindⅢによって処理をすることで、HDR によるノックインの効率を求めた。標的配列での変異導入率やオフターゲット配列での変異導入率は Tide ソフトフェア［2］（http://shinyapps.datacurators.nl/tide/）によって算出した。

3. HDR 活性を指標としたスクリーニングシステムの構築と最適化

HDR を誘発する Cas9 変異体を取得するために、ジフテリア毒素（Diphtheria Toxin：DT）耐性に基づいた系を、HDR 活性を指標としたスクリーニングシステムを構築した。DT はジフテリア菌が菌体外へ産生するタンパク質性の細菌毒素である。DT はヒト heparin-binding EGF-like growth factor（hHB-EGF）を受容体として細胞内に取り込まれる。その後、DT はペプチド鎖伸長因子（elongation factor2：EF-2）を ADP リボシル化することで EF-2 を不活性化し、タンパク質合成を阻害することで細胞死を誘発する。マウスにおいても HB-EGF は発現しているが、hHB-EGF とアミノ酸配列が異なることから、DT が結合できない。HDR を介した編集後の細胞は DT 耐性を持つため、DT 処理によって生存可能である。一方で、イントロンを標的としているため、未編集や NHEJ を介した挿入欠失を起こした細胞では、DT 感受性が残る。HEK293 細胞）に対して、hHB-EGF のイントロンを標的とする sgRNA と Cas9 変異体、スプライシング受容配列を持つマウス HB-EGF 変異配列を導入するためのドナーDNA を導入することで、HDR による hHB-EGF の編集の最適化を実施した。野生型 Cas9 と EGFP を自己切断ペプチド（P2A）で連結させた遺伝子をレンチウイルスベクターに乗せて、HEK293 細胞に感染させた。FACS を用いて EGFP 陽性細胞のみ分取した。この細胞をレポーター細胞として条件の最適化を実施した。レポーター細胞に鋳型 DNA のみをエレクトロポレーション法で導入し、鋳型 DNA によるノックインが起こらない最適な鋳型 DNA 量を検討した。その後、最適な鋳型 DNA 量に固定した際の

最適な HBRGF 標的 gRNA の量を検討した。ノックイン効率は鋳型 DNA 上に赤色蛍光タンパク質（*mCherry*）遺伝子が組み込まれるような設計をしたため、蛍光顕微鏡観察及びフローサイトメトリーによって mCherry 陽性細胞を評価した。

結果および考察

1. 既知の High Fidelity SpCas9 変異体における HDR 効率の評価

10 種類の変異体において *EMX1* 遺伝子における HDR 効率を評価した結果、eSpCas9、SpCas9-HF1、LZ3 Cas9 において野生型 Cas9 よりも高い HDR 効率を示した（図 1）。この 3 種類の Cas9 変異体には、共通して RuvCⅢドメインにおいて変異が導入されていた。RuvC は Cas9 の持つヌクレアーゼドメインの一つであり、gRNA と二本鎖形成しない、non-target 鎖を切断する。この結果から、RuvCⅢにおける変異によって、Cas9 タンパク質と non-target 鎖 DNA との相互作用に変化が生じ、DNA 切断面に影響が出た可能性がある野生型 SpCas9 の切断面の多くは平滑末端であることが知られている。RuvCⅢドメインの変異によって切断面が突出末端となったことで、HDR が誘発された可能性が考えられる。

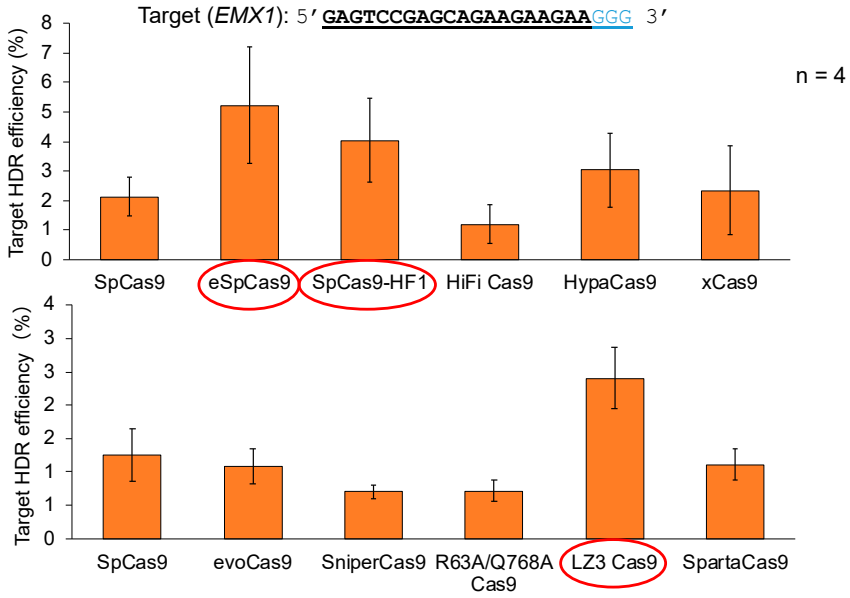


図 1. *EMX1* 遺伝子での High Fidelity 変異体の HDR 活性評価
SpCas9 は野生型 SpCas9 を示す。eSpCas9、SpCas9-HF1、HiFi Cas9、HypaCas9、xCas9、evoCas9、SniperCas9、R63A/Q768A Cas9、LZ3 Cas9、SpartaCas9 は各種 SpCas9 に対する High Fidelity 変異体を示す。

2. Cas9 変異体の細胞周期依存的な活性化

HDR 効率の高かった eSpCas9、SpCas9-HF1、LZ3 Cas9 において、AcrⅡA4-Cdt1 及び AcrⅡA5-Cdt1 を用いた細胞周期依存的な活性化系を評価した。標的遺伝子配列として、*AAVS1*、*EMX1*、*VEGFA* 遺伝子を標的とする gRNA を用いた。その結果、予想に反して、*AAVS1* 遺伝子及び *EMX1* 遺伝子を標的とした場合に、eSpCas9 と LZ3 Cas9 は細胞周期依存的に活性化することで、HDR 効率が減少した。LZ3 Cas9 に関しては、*VEGFA* 遺伝子を標的とした際も細胞周期依存的に活性化することで、HDR 効率が減少した。eSpCas9 に関しては *VEGFA* 遺伝子を標的とした際に、AcrⅡA4-Cdt1 を用いて活性制御をすることで、HDR 効率が上昇した。一方で、SpCas9-HF1 を用いた場合は、AcrⅡA4-Cdt1 を用いて活性制御することで、どの標的配列においても

HDR 効率が SpCas9-HF1 単体よりも向上した。AcrⅡA5-Cdt1 を用いた場合は、*AAVS1* 遺伝子と *VEGFA* 遺伝子を標的とした際に HDR 効率が向上した。この結果から、特にヌクレアーゼドメインに多くの変異を持つ eSpCas9 や LZ3 Cas9 に関しては、AcrⅡA4 や AcrⅡA5 による阻害の影響を大きく受けた可能性が考えられる。

AcrⅡA4-Cdt1 と SpCas9-HF1 の共発現系について *EMX1* 遺伝子と *VEGFA* 遺伝子を標的とした際には、野生型の Cas9 よりも高い HDR 効率を示した（図 2a）。また、*EMX1* 遺伝子を標的とした際に、最大の 6 倍もの向上が見られた。また、標的配列における変異導入率を比較した結果、全ての標的配列において野生型の Cas9 と比較して AcrⅡA4-Cdt1 と SpCas9-HF1 を共発現系することで、変異導入率は減少するという結果が得られた（図 2b）。*AAVS1* 遺伝子を標的とした際に、最大で 72%の変異導入率の減少が見られた。さらに、オフターゲット配列における変異を評価した結果、標的配列と同様に野生型 Cas9 よりも大幅にオフターゲット変異を減少できることが示された（図 2c）。特に *EMX1* 遺伝子を標的とした際のオフターゲット配列において、最大で 98%の減少が見られた。

GC 含量の高い標的配列（*AAVS1* 遺伝子、75%）においては、野生型 Cas9 を用いた場合でも高い HDR 効率が得られた理由として、Cas9 が標的 DNA 切断後も Cas9 が DNA に結合し続けた結果、複製のタイミングで Cas9 が外れ、修復が発生した可能性がある。その場合は、細胞周期依存的な活性化をせずともある程度 HDR の活性がある S/G2 期で修復された可能性がある。一方で、*EMX1* 遺伝子（GC 含量 50%）や *VEGFA* 遺伝子（GC 含量 60%）を標的とした場合では、切断後の Cas9 の安定した標的配列の結合ができず、すぐに切断面から外れることで、NHEJ を介した修復が優先された可能性がある。

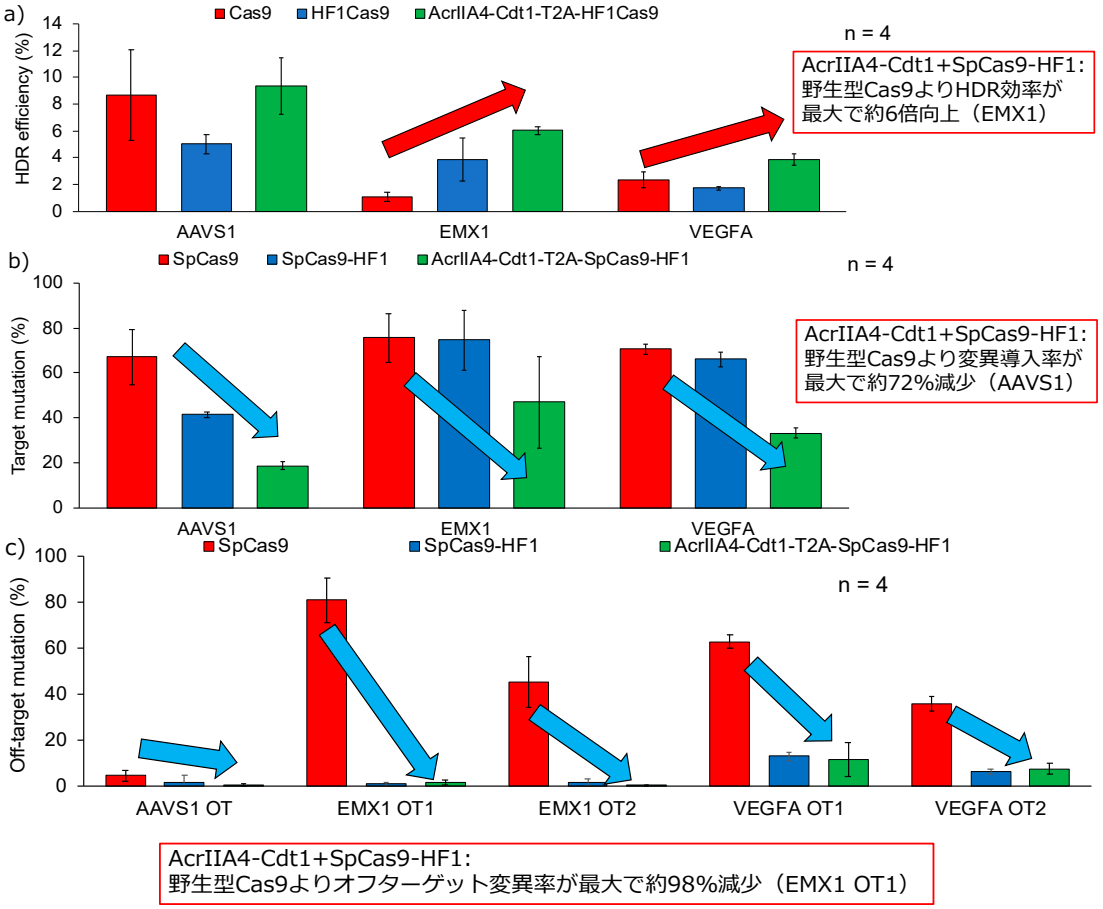


図 2. SpCas9-HF1 の細胞周期依存的な活性化による各種標的遺伝子でのゲノム編集評価

a) SpCas9-HF1 を細胞周期依存的に活性化した際の HDR 効率の比較。

b) SpCas9-HF1 を細胞周期依存的に活性化した際の標的配列の変異導入率の比較。

c) SpCas9-HF1 を細胞周期依存的に活性化した際のオフターゲット配列の変異導入率の比較。

3. HDR 活性を指標としたスクリーニングシステムの構築と最適化

HEK293 細胞を利用して、ジフテリア毒素（DT）耐性を応用したスクリーニング系の条件最適化を行った。その結果、2.5μg の鋳型 DNA と 1.5μg の *hHBEGF* 標的 gRNA プラスミドを導入することによって、Cas9 による DNA 二本鎖切断後に HDR を介したノックインが誘発された。エレクトロポレーションによる鋳型 DNA と gRNA の導入から 48 時間後に DT を添加し、細胞死誘導を評価した結果、3 日以上の DT 処理により、HDR 修復後の細胞のみが選抜されることがわかった。さらに、網膜由来の hTERT 不死化細胞株である hTERT RPE-1 細胞を用いてスクリーニングを実施した。その結果、取得された Cas9 変異体において、野生型の Cas9 よりも高い HDR 活性を示した。本結果より、このスクリーニング系が上手く機能していることが示された。今後、取得された Cas9 変異体の変異箇所から、Cas9 切断と HDR 活性の関係性について解明していく。

共同研究者・謝辞

本研究は、広島大学大学院医系科学研究科創薬標的分子科学分野にて実施した。本研究室の大学院生である岸果苗さん、松木依理奈さん、井上雄翔さん、当時学部生であった久保田小茉利さんに実験の補助をしていただきました。また、本研究室の野村渉教授、濁川清美助教の御助力のもとで、本研究を遂行しました。この場を借りて感謝いたします。また、本研究遂行にあたり、公益財団法人上原記念生命科学財団からのご支援は大きな力となりました。改めて御礼申し上げます。

文　献

1） Daisuke Matsumoto, Hirokazu Tamamura, Wataru Nomura, A Cell Cycle-dependent CRISPR-Cas9 Activation System Based on an Anti-CRISPR Protein Shows Improved Genome Editing Accuracy, Communications Biology, 3 (1), 601, Oct. 23, 2020, PMID: 33097793, DOI: 10.1038/s42003-020-01340-2

2） Eva K. Brinkman, Tao Chen, Mario Amendola, Bas van Steensel, Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition, Nuc. Acids Res., 42 (22), Dec. 16, 2014, PMID: 25300484, DOI: 10.1093/nar/gku936