

日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 安全な遺伝子治療を目指した万能塩基編集ツールの創出
(英語) Generation of versatile base-editing tools toward safe gene therapy

研究開発実施期間: 令和元年10月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 濡木理
(英語) Osamu Nureki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人 東京大学
(英語) The University of Tokyo・Graduate School of Science・Professor

II 研究開発の概要

【和文】

Cas9 や Cas12 はガイド RNA と複合体を形成し標的 DNA を切断するため、革新的なゲノム編集ツールとして広く利用されている (Cong *et al. Science* 2013, Zetsche *et al. Cell* 2015)。しかし、ゲノム DNA の切断に伴う数 kb の欠失を引き起こすこともあり、“切る”ゲノム編集に警鐘が鳴らされている。これに対し、“切らない”ゲノム編集である塩基編集技術が注目されている。DNA 切断活性を欠損させた Cas9/Cas12 に脱アミノ化酵素を融合した塩基編集ツール (Base editor ; BE) は、標的 DNA に C→T 置換や A→G 置換を引き起こす (Komor *et al. Nature* 2016)。特に、先天性遺伝性疾患の 6 割が点変異によるものであり、その多くは 1 塩基置換により修復が可能であるため、塩基編集技術の遺伝子治療への応用が期待されている。しかし、Cas9/Cas12 が標的 DNA を認識するためには特定の塩基配列 (PAM) が必要であることから、塩基編集が可能なゲノム領域は限定されている。さらに、生体内での塩基編集のためには、ウイルスベクターに搭載可能な小型の塩基編集ツールの開発が必須である。本研究では、小型の Cas9 や Cas12 の分子改変による適用範囲の拡張した万能の塩基編集ツールセットを開発し、血友病、遺伝性心筋症、アルツハイマー症候群を先天性疾患モデルとした疾患 iPS 細胞および疾患モデルマウスにおいて、開発した塩基編集ツールを用いた疾患変異の修復を行うことで、塩基編集による遺伝性疾患治療戦略の確立を試みた。

SaCas9 (1053 残基)、CjCas9 (984 残基)、および BICas9 (1092 残基) は SpCas9 (1368 残基) に比べて小型であるため AAV ベクターへの導入効率が高く、したがって、SaCas9/CjCas9/BICas9 を用いた BE は塩基編集の適用範囲の拡張につながることが期待される。しかし、これら 3 種の Cas9 は比較的長い PAM (SaCas9: NNGRR (R は A/G)、CjCas9: NNNVRYAC (V は A/G/C、Y は T/C)、BICas9: NNNNCNAA) を認識するため、適用範囲が限定されているという問題点が残されていた。そこで本研究開発では、SaCas9、CjCas9、および BICas9 の結晶構造をもとに、それぞれの PAM 認識に関与するアミノ酸残基に複数の変異を導入することで、短縮された PAM を認識する各種 Cas9 改変体を開発した。具体的には、一文字の G を PAM として認識する SaCas9-NNG、七文字目の A に対する特異性を緩和した enCjCas9 (Nakagawa *et al. Commun. Biol.* 2022)、七文字目と八文字目の A に対する特異性を緩和した enBICas9 をそれぞれ開発した。さらに、SaCas9-NNG、enCjCas9、enBICas9 をそれぞれ脱アミノ化酵素と融合させた BE を作製し、哺乳類培養細胞において各種 Cas9 改変体を利用した BE によって一塩基置換を誘導可能であることを確認した。SaCas9-NNG に関しては、SaCas9-NNG および sgRNA を搭載した all-in-one AAV ベクターをマウスに投与し、SaCas9-NNG が野生型 SaCas9 と比べて広い標的範囲に対してゲノム編集が可能であることを動物個体レベルで実証した。ABE を搭載した SaCas9-NNG を用いて、マウス肝臓細胞株で PAM 配列部位が拡張することを確認した。さらに種々の血友病 B 変異、及び OTC 欠損症変異に対する塩基編集効率を検証し、SaCas9-NNG における塩基編集効率の改善を確認した。ヒト血漿の凝固時間が濃度依存性に延長するプロテイン C 改変体を作製し、新生仔マウスに対する AAV ベクターを用いた *in vivo* ゲノム編集で 5%以上の肝細胞に HDR によるノックインを可能とし、実際にプロテイン C 欠損マウスの生存が延長した。さらに、SaCas9-NNG-sgRNA-標的 DNA 複合体の異なる反応経路に対応するクライオ電子顕微鏡構造を取得し、SaCas9-NNG による標的 DNA 認識機構の詳細な分子基盤を解明した。

Cas9 を利用した塩基編集の際には、設計した sgRNA のガイド配列中の target window と呼ばれる特定の領域に存在する任意の塩基 (ABE の場合はアデニン、CBE の場合はシトシン) に対して編集が生じ、この編集パターンが標的遺伝子座や Cas9 の種類によって異なる場合がある。本研究開発では、大量の超並列シーケンシングデータを用いた機械学習モデルを構築し、様々な塩基編集ツールによって任意のゲノム領域をターゲットした場合に誘導される塩基編集パターンを予測する技術を開発した。学習モデルの評価実験を行った結果、いずれの塩基編集ツールにおいても一つのターゲットサイトに多様な塩基編集パターンを様々な頻

度で生じること、機械学習モデルがこのパターン（どのような編集パターンがどのような頻度で生じるか）を実データとピアソン相関係数 0.7 程度で予測できることを示した。さらに、意図しない塩基編集を誘導するリスクを見積もって sgRNA を設計するソフトウェア開発の基盤データを得た。アンプリコンシーケンシングデータから任意の塩基編集ツールによって任意のゲノム領域をターゲットした場合に誘導される塩基編集パターンを予測する技術を開発した。これらのソフトウェアツールのパッケージ化を進めるとともに、意図しない塩基編集を誘導するリスクを見積もって sgRNA を設計するソフトウェアの開発を行った。

最近の研究から、Cas9 とは独立したファミリーに属する Cas 酵素として、多様な性質をもつ Cas12 酵素 (Cas12a~Cas12n) が同定されている (Zetsche *et al. Cell* 2015 ; Harrington *et al. Science* 2018 ; Yan *et al. Science* 2019 ; Pausch *et al. Science* 2020 ; Wu *et al. Mol. Cell* 2022)。中でも Cas12c は、TN という短い PAM を認識するため、標的範囲を拡張した塩基編集ツールとして有用であり、また AsCas12f は既存の Cas9/Cas12 酵素の中で最小の大きさである 422 残基で機能することから、AAV ベクターへ効率的に搭載可能な塩基編集ツールとして期待されている。本研究開発では、クライオ電子顕微鏡構造解析によって、Cas12c-sgRNA-標的 DNA 複合体の立体構造を決定し、Cas12c による一文字の PAM 認識機構を解明した (Kurihara *et al. Mol. Cell* 2022)。同じくクライオ電子顕微鏡構造解析によって、AsCas12f-sgRNA-標的 DNA 複合体の立体構造を決定し、AsCas12f が一分子の sgRNA 上に二分子の AsCas12f タンパク質が結合した非対称な二量体として機能することを明らかにした (Hino *et al. Cell* 2023)。AsCas12f のゲノム編集ツールとしての有用性を向上させるため、分子改変による AsCas12f 活性向上変異体の開発を行った。具体的には、Deep mutational scanning (DMS) とよばれる網羅的変異体スクリーニング手法を AsCas12f に適用し、哺乳類培養細胞において AsCas12f によるゲノム編集効率を向上させる点変異を 200 個以上同定した。同定した変異を構造情報に基づき合理的に組み合わせ、最終的には野生型と比べて 20 倍以上の活性を有する二種類の AsCas12f 四重変異体 (AsCas12f-YHAM および AsCas12f-HKRA) を開発した。また、構造情報に基づき、sgRNA 中の溶媒に露出した領域を欠失させた改変型 sgRNA を開発し、この改変型 sgRNA が野生型 sgRNA に比べて哺乳類培養細胞中における発現量が増加することを明らかにした。AsCas12f 四重変異体と sgRNA 改変体を組み合わせることで、哺乳類培養細胞において SpCas9 や改変型 Cas12a と同等のゲノム編集効率を有する AsCas12f 改変体の開発に成功した。さらに、改変型 AsCas12f-改変型 sgRNA-標的 DNA 複合体のクライオ電子顕微鏡構造を決定することで、AsCas12f に導入した各アミノ酸変異が活性向上にどのように寄与したのか、その詳細な分子基盤を明らかにした。

二種類の改変体 AsCas12f のうち AsCas12f-HKRA に関して、筋ジストロフィーで見られる DMD 遺伝子の Exon 44 が欠損した iPS 細胞由来心筋細胞において Exon 45 をさらに欠損させることでリーディングフレームを戻し、DMD タンパクの再発現させることに成功し、マウスレベルではノックアウトによりトランスサイレチンアミロイドーシスの治療が可能となる血中トランスサイレチンの低下、ノックインを用いて血友病 B マウスの病態改善に成功した。また、マウス個体内での CRISPRa に成功し、Luciferase の転写活性を 10 倍に上げることに成功した。

【英文】

The CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9 and Cas12 cleave double-stranded DNA targets complementary to the sgRNA guide and have been harnessed for genome editing technologies. Besides the guide RNA–target DNA complementarity, Cas9 and Cas12 require specific sequence as the protospacer adjacent motif (PAM) for target DNA recognition, thereby restricting the targetable genomic sites. Moreover, their relatively large gene size poses a limitation for delivery by cargo-size-limited adeno-associated virus (AAV) vectors.

Based on the previously reported crystal structures, we rationally engineered small Cas9 variants (SaCas9-NNG, enCjCas9, and enBICas9) that recognizes relaxed PAMs. These Cas9 variants efficiently induces indels in human cells and mice with broader targetable range as compared to those of wild type. Furthermore, these Cas9 variants fused to cytosine deaminase or adenosine deaminase efficiently mediated C-to-T or A-to-G conversions in human cells. These results indicated that our engineered Cas9 variants exhibits the expanded target scope in mice, and can be utilized for a therapeutic genome-editing tool deliverable using a single AAV vector. In addition, we determined the cryo-EM structures of SaCas9-NNG in complex with its cognate sgRNA and dsDNA targets in multiple functional states. These structures provide explanations for how the introduced mutations relax the PAM specificity.

Besides Cas9 orthologs, recent studies have identified a dozen functionally divergent type V Cas12 effector proteins. Among them, Cas12c recognizes short TN PAM, thereby potentially expanding the target space in genome editing, while minimal AsCas12f which consists of only 422 amino acids shows great promise as a miniature genome-editing tool that can be packaged into a single AAV vector. In this study, we determined the cryo-EM structure of Cas12c-sgRNA-target DNA ternary complex, providing mechanistic insights into the short PAM recognition by Cas12c. We also determined the cryo-EM structure of AsCas12f-sgRNA-target DNA ternary complex, revealing that two AsCas12f molecules (AsCas12f.1 and AsCas12f.2) assemble with one sgRNA molecule to form an asymmetric homodimer to compensate for its small size. Additionally, we present a comprehensive effort to improve the AsCas12f system for genome editing. By combining structural analysis and deep mutational scanning (DMS) methods, we revealed the molecular basis and identified a detailed landscape of amino acid substitutions that greatly augment the nuclease activity of AsCas12f. The synergistic effects of these mutations, coupled with guide RNA engineering, remarkably enhanced the genome-editing efficiency of AsCas12f in human cells to levels comparable with those of both SpCas9 and engineered AsCas12a effectors.