

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名：新規 CRISPR-Cas9 システムセットの開発とその医療応用
3. 研究開発代表者：濡木 理
4. 研究開発の成果

### ① 新規 CRISPR-Cas9 システムセットの開発

ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 システムを医療に応用するため、ヒト細胞への高い導入効率とゲノムワイドな標的化が可能な PAM 配列を認識する Cas9 変異体セットを開発する必要がある。そこで平成 27 年度は、まず、PAM 認識の異なる Cas9 オルソログと特異的なガイド鎖 RNA、相補鎖 DNA、非相補鎖 DNA からなる四者複合体の結晶構造を決定して PAM 配列の認識機構のデータベースを作成し、得られた情報に基づき、どのような PAM 配列も認識できる Cas9 変異体、あるいはそれぞれの PAM 配列を認識する Cas9 変異体、さらには、ヒト細胞への導入効率を考慮して、ミニマルな Cas9 の四者複合体の構造解析を行ない、これを土台として、改変 Cas9 の作成を試みた。

*Streptococcus pyogenes* 由来 Cas9 (SpCas9) の VQR 改変体、EQR 改変体、VRER 改変体の結晶構造をガイド RNA、PAM (それぞれ、TGA、TGAG、TGCG) を含む標的二本鎖 DNA との四者複合体としてそれぞれ 2.0、2.2、2.2 Å 分解能で決定し、これらの結晶構造から、SpCas9 改変体の PAM 認識機構が明らかになった。具体的には、野生型 Cas9 との構造比較から、複数の変異残基が標的二本鎖 DNA の構造変化を協同的に誘導し、PAM 認識が達成されていることが明らかになった。また、SpCas9 とは PAM 認識の異なる Cas9 オルソログについて、Cas9、ガイド RNA、PAM を含む標的二本鎖 DNA からなる四者複合体の結晶構造を決定した。具体的には、*Staphylococcus aureus* 由来 Cas9 (SaCas9)、ガイド RNA、PAM (TTGAAT PAM、TTGGGT PAM) を含む標的二本鎖 DNA からなる複合体の結晶構造を、また、*Francisella novicida* 由来 Cas9 (FnCas9)、ガイド RNA、PAM (TGG PAM、TGA PAM) を含む標的二本鎖 DNA からなる四者複合体の結晶構造を決定した。SaCas9 と SpCas9 の構造比較から、CRISPR-Cas9 系における立体構造の保存性と多様性が明らかになった。さらに、SpCas9、SaCas9、FnCas9 の構造比較から、CRISPR-Cas9 系における予想外の構造類似性・多様性が原子レベルで明らかになった。特に、これらの Cas9 オルソログは構造の異なる REC-WED ドメインをもち、ガイド RNA の特徴的な構造を特異的に認識することにより直交性を獲得していることが明らかになるなど多様な PAM 認識機構が明らかになった。また、SpCas9 に基づく転写活性化システムを参考に、不活性型 dSaCas9 (D10A/N580A)、MS2 結合アプタマー融合型 sgRNA、転写活性化因子 (MS2-p65-HSF1) を用いて標的遺伝子の活性化に成功した。

上述したように、SpCas9 よりもコンパクトな SaCas9 の四者複合体の結晶構造を決定するとともに、SpCas9 よりもコンパクトで PAM 特異性の異なる CjCas9、CdCas9 の結晶化・構造解析にも成功した。また、分割型 SaCas9 に FKBP/FRB を融合させ誘導型 SaCas9 を開発した。さらに、構造情報を基に FnCas9 の PAM 特異性を NGG から YG に改変することに成功し、群馬大学との連携により、マウス受精卵におけるゲノム編集に成功した。さらに、FnCas9 改変体、ガイド RNA、PAM (TGG PAM) を含む標的二本鎖 DNA からなる四者複合体の結晶構造を決定し、その PAM 認識機構を解明した。Arg1556 の Ala への置換により PAM の 3 文字目の認識が消失し、Arg1369 および His1449 は標的 DNA のリン酸基と相互作用していた。PAM の 1 文字目の T は Cas9 と相互作用していない一方、相補

鎖の A は Arg1474 とスタッキング相互作用を形成していた。Arg1474 はピリミジン塩基よりも大きなプリン塩基と効率的に相互作用することから、FnCas9 改変体の PAM の 1 文字目の Y に対する嗜好性が説明された。

## ② 新規 CRISPR-Cas9 を用いた医療応用

リシール細胞法による Cas9 タンパク質/sgRNA 複合体導入によるターゲットゲノム配列の切断効率を増加させるために様々な条件を検討し、改良型リシール法を開発した。これにより、従来法の十数倍の変位導入活性を検出することができた。また、CRISPR-Cas9 の相同組換え評価用マーカー遺伝子を組み込んだ動物細胞評価系の構築を行った。本システムは、SpCas9/sgRNA によりターゲット部分が切断されると、GFP 蛍光を指標として相同組換え頻度を定量的に見積もることができるものである。具体的には、相同組換えの効率を蛍光顕微鏡観察と、フローサイトメトリーの 2 つの解析法により定量的にアッセイできる相同組換え評価用の細胞株を取得し、これらの細胞に Cas9 を導入することで、相同組換えシグナルが実際に上昇することを確認した。また、相同組換え効率を正確に評価するために、改良型 Cas9-2A-mCherry 発現プラスミドを作製し、これを用いて Cas9 発現細胞をソーティングで濃縮することで、相同組換えマーカーのシグナルが顕著に増大する実験系の構築に成功した。また、酵母実験系で、相同組換え因子や非相同末端結合因子の活性低下が、Cas9 によって誘発される相同組換えにどのような影響をもたらすか評価した。その結果、非相同末端結合にかかわる因子の機能欠損株で、相同組換え比率が上昇することが明らかになった。一方、相同組換えに関わる因子の機能欠損株では相同組換え効率の低下が観察された。この結果をヒト培養細胞で確認するため、RNAi 法により非相同末端結合因子 A の発現抑制を行い、継続的な発現抑制を行うことで相同組換え効率の上昇を引き起こすことが可能であるという知見を得た。また、薬剤 B を添加することにより、相同組換え効率の上昇が起こる可能性を世界に先駆けて見いだした。

X-SCID モデルブタを用いた遺伝子修正造血幹細胞移植治療法の開発を目的として、新生仔ブタをその生産場所から自治医科大学に無菌的に搬送する体制を整備した。帝王切開、子宮切断両法において無菌的分娩に成功し、搬送後も無菌性を維持できたが、蘇生数が低かったことから、胎仔摘出までの所要時間を短縮できるよう分娩用アイソレーターの改良を行った。さらに、ウイルスベクターを用いた Cas9 システム導入法を開発するため、SaCas9 と同時に EGFP 等の蛍光蛋白質を発現するレンチウイルスベクターを作成し、ブタ骨髄細胞に感染させたところ、高頻度の EGFP 発現を認めた。一方、高濃度のウイルス感染後は死細胞も増加する。SCID の治療では、遺伝子修正が成功した造血幹細胞の増殖優位性が認められることから、より低濃度でのウイルス感染も有効と思われる。Cas9 を用いた遺伝子修復は一過性の発現においても治療効果が永続することが、現行の遺伝子治療に対しての優位点である。そこで、一過性発現にとどまるレンチウイルスベクター作製系を構築した。また、効率的な遺伝子修正造血幹細胞の移植には造血幹細胞領域を濃縮し、より少ない細胞数で移植効率を高める必要がある。フローサイトメトリーにて、マウス造血幹細胞を濃縮し、わずか 100-500 個の細胞で 200,000 個の骨髄細胞と同等の生着能を有することを確認した。

受精卵の Cas9 検定系の確立をおこない、培養に際して様々な諸条件を最適化することによりインジェクション後の胚盤胞までの発生率が 30%であったものを 60%以上まで引き上げることに成功した。また、DNA メチル化編集の効率の改良をおこない、その効率を上昇させられるか検討した。メチル化制御関連因子を用いてメチル化率を培養細胞において 30%以上変化させることに成功、in vivo においてもフローサイトメトリーによりメチル化の変化を検定する系を確立した。