

ゲノムのほぼ全域で正確に編集できる新ゲノム編集法の開発

—ゲノム SNPs の自在編集を可能に—

概要

植田充美 京都大学農学研究科教授、黒田浩一 准教授、里村淳 博士課程学生の研究グループは、ゲノムワイドで高効率な編集技術を構築するために、一本鎖切断酵素である Cas9 Nickase を用いた CRISPR/Nickase システムを確立しました。

近年、ゲノム編集¹法として CRISPR/Cas9 システムが注目を集めています。しかし、CRISPR/Cas9 システムは全てのゲノム領域を編集することはできないという大きな欠点があります。また、ガイド RNA 認識配列外の塩基を編集する場合、相同組換え後もガイド RNA 認識配列が残るため、Cas9ヌクレアーゼにより、ゲノムが繰り返し切断・修復された結果、最終的には非相同末端結合により望まない塩基の挿入、欠失が生じてしまうという大きな欠陥もあります。

今回開発した CRISPR/Nickase システムでは、CRISPR/Cas9 が持つこれらの欠陥を克服しました。理論上、ゲノムのほぼ全域を編集できます。これにより、ゲノム上のほぼすべての SNPs（一塩基多型）の修復編集が可能になるとともに、逆に、目的どおりの SNPs の導入も可能になり、これからのゲノム科学の発展に貢献できると考えております。

論文は 5 月 18 日（木）午後 6 時（日本時間）、英国の学術雑誌 *Scientific Reports* に掲載されました。

1. 背景

近年、ゲノム編集法として CRISPR/Cas9 システムが注目を集めています。しかし、このシステムが正確に編集できる領域は、Cas9 が認識できる NGG 配列とそれに続く 20 塩基のみであり、これはゲノム中にわずか 60%程度しか存在しません。また、ガイド RNA 認識配列外の塩基を編集する場合、相同組換え後もガイド RNA 認識配列が残るため、Cas9ヌクレアーゼにより、ゲノムが繰り返し切断・修復された結果、最終的には非相同末端結合により望まない塩基の挿入、欠失が生じてしまうという大きな欠陥が目立ってきています。近年遺伝病に関係する多種多様な SNPs の存在が明らかになってきたため、これらの SNPs をゲノムの全域にわたって、正確かつ自在に編集できるゲノム編集技術の発展が望まれています。

2. 研究手法・成果

一般的な手法による変異導入は時間と手間がかかるうえ、効率も 50%以下と低いため、より短期間に変異株を構築するための変異の同定に加え、効率的な変異導入法の開発が求められています。近年、高効率で容易な変異体作製法として CRISPR/Cas9 システムが注目を集めています。このシステムでは、ガイド RNA が PAM 配列（NGG: N は任意の塩基）に続く 20 塩基を認識して、Cas9 が DNA を切断します。切断領域に相補的な

¹ CRISPR/Cas9 システム—ガイド RNA が PAM 配列（NGG: N は任意の塩基）に続く 20 塩基を認識して、Cas9 が DNA を切断する。切断領域に相補的なドナーDNAを加えると相同組換えにより任意の配列をノックインできる。また、非相同末端結合により切断配列をランダムに修復するとノックアウトが可能。

ドナーDNA を加えると相同組換えにより任意の配列をノックインできます。また、非相同末端結合により切断配列をランダムに修復するとノックアウトが可能になります。しかし、CRISPR/Cas9 システムは全てのゲノム領域を編集することができないという大きな欠点があります (図 A)。認識配列と PAM 配列以外の部位に変異を導入するように相同組換えを行うと編集後も認識配列が残るため、Cas9 による再切断が起こってしまいます。生じた二本鎖切断は再度鋳型 DNA をもとにした相同組換えや非相同末端結合により修復されます。相同組換えにより修復された場合、認識配列が残るためさらに再切断されます。そのため、最終的には非相同末端結合により標的配列に望まない塩基の挿入、欠失が生じてしまうという大きな欠陥があります。従って、このシステムが正確に編集できる領域は、Cas9 が認識できる NGG 配列とそれに続く 20 塩基のみであり、これはゲノム中にわずか 60%程度しか存在しません。

我々は、上述の旧来法よりもはるかにゲノムワイドで高効率な編集技術を構築するために、一本鎖切断酵素である Cas9 Nickase を用いました (図 B)。Cas9 Nickase で生じる一本鎖切断 (ニック) は正確に修復されます。また旧来の Cas9 により生じる二本鎖切断と異なり、ニックは相同組換えを誘導するが、非相同末端結合は誘導しません。そのため、Nickase による相同組換え後に標的配列が残った時でもニックが再度導入されるだけで、非相同末端結合による余分な配列の挿入や欠損は起こりません。また、本システムはニックから 50 塩基対離れた領域でも正確に編集できました。これは、本システムが編集可能塩基に制限がある CRISPR/Cas9 よりも、理論上 40%以上も広いゲノム領域、すなわち、ほぼゲノム全域を編集できることを示しています。

新規開発した CRISPR/Nickase システムは、ガイド RNA の発現配列と、ドナーDNA 配列をそれぞれベクターに組み込む必要があります。ベクター構築に 1 週間ほどの手間を要するため時間がかかるのが課題でした。そこで、煩雑なベクター構築作業を省くため、酵母の Gap Repair Cloning (GRC) を採用しました。相同領域をそれぞれ両端に有する DNA 断片を酵母に導入すると、酵母内で GRC によりプラスミドが自動的に構築されます。GRC を用いてベクター構築段階を省略することで、CRISPR/Nickase による酵母などの場合は、変異体構築をわずか 5 日で 50%以上の効率で達成することができました。

3. 波及効果

動物細胞にも展開することも可能で、ゲノム上のほぼすべての SNPs の修復編集が可能になります。逆に、目的通りの SNPs の導入も可能になり、これからの全生物のゲノム科学の発展に貢献できると考えております。

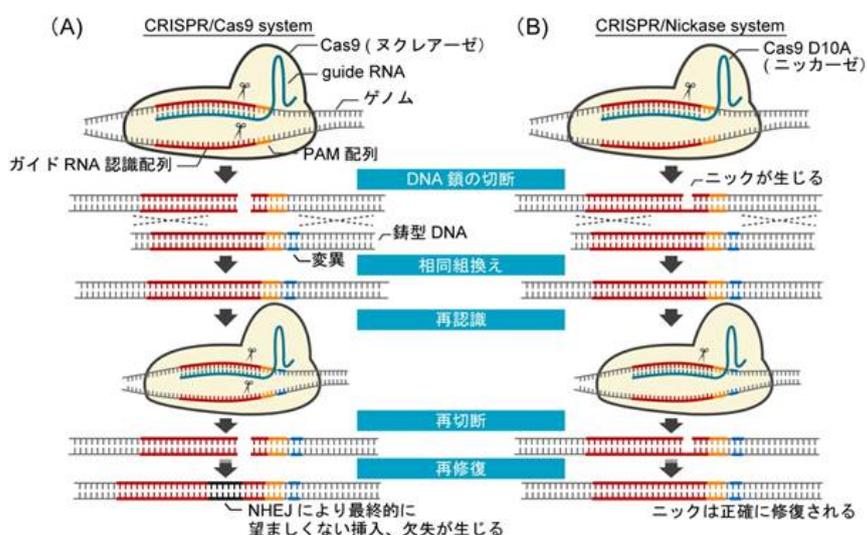


図 (A) CRISPR/Cas9 システムと (B) CRISPR Nickase システムによるゲノム編集 Cas9 一塩基置換体である Cas9 D10A は一本鎖切断酵素として働く

<論文タイトルと著者>

タイトル : Precise genome-wide base editing by the CRISPR Nickase system in yeast

著者 : Atsushi Satomura (日本学術振興会特別研究員 PD、現在ノースウエスタン大学に滞在中) ,
Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda

掲載誌 : *Scientific Reports*

<お問い合わせ先>

植田 充美

京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻 応用生化学講座 生体高分子化学分野 教授

TEL: 075-753-6110 FAX: 075-753-6112

e-mail: miueda@kais.kyoto-u.ac.jp