

## ゲノム編集を制御する新たな技術 ～Split-CRISPR-Cpf1 の開発～

### 1. 発表者:

二本垣 裕太 (研究当時:東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 大学院生/  
現:ジョンズホプキンス大学医学部細胞生物学科 博士研究員)  
小田部 堯広 (東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 特任研究員)  
佐藤 守俊 (東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 教授)

### 2. 発表のポイント:

- ◆新たなゲノム編集ツールとして注目されている Cpf1 タンパク質を二分割した split-Cpf1 を新たに開発しました。
- ◆Split-Cpf1 を用いて、光刺激による精度の高いゲノム編集や、極めて高い効率で遺伝子発現を制御することに成功しました。
- ◆Split-Cpf1 によるゲノム編集の技術開発により、CRISPR-Cpf1 によるゲノムエンジニアリングが今後、さらに展開することが期待されます。

### 3. 発表概要:

東京大学大学院総合文化研究科の二本垣裕太大学院生(現ジョンズホプキンス大学医学部細胞生物学科 博士研究員)、小田部堯広特任研究員、佐藤守俊教授らの研究グループは、Cpf1 タンパク質を二分割して得た分割体(split-Cpf1)に基づいて、ゲノム(遺伝子)編集を光によって制御したり、より効率的に遺伝子を発現したりできるツールを開発することに成功しました。

近年報告された CRISPR-Cpf1(注 1)は、従来技術の CRISPR-Cas9(注 2)よりも標的 DNA への特異性が高いため、オフターゲット効果(注 3)が小さく精度の高いゲノムエンジニアリング技術になると期待されています。しかし、Cpf1 の分子構造が Cas9 とは大きく異なるため、Cas9 を基に開発されてきた応用技術が、そのままでは Cpf1 に適用できないという問題がありました。本研究では、この問題を解決するために Cpf1 を分割して split-Cpf1 を開発し、光刺激による精度の高いゲノム編集や極めて高い効率での遺伝子発現制御を実現しました。Split-Cpf1 を基盤として、生体でのゲノムエンジニアリング(注 4)がさらに発展することが期待されます。

本研究成果は、米国科学誌「*Nature Chemical Biology*」(電子版:英国時間 8 月 12 日)に掲載されました。

本研究成果は、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)の戦略的創造研究推進事業(CREST)「光の特性を利用した生命機能の時空間制御技術の開発と応用」(研究総括:影山龍一郎 京都大学ウイルス・再生医科学研究所 教授)における「ゲノムの光操作技術の開発と生命現象解明への応用」(研究代表者:佐藤守俊 教授)および同大学発新産業創出プログラム(START、注 5)「CRISPR-Cas9 システムを光制御するゲノムエンジニアリングツール」(研究代表者:佐藤守俊 教授)の一環として得られました。

### 4. 発表内容:

#### 研究背景

ゲノム(遺伝子)編集技術として CRISPR-Cas9 が発表されて以来、ゲノム上の狙った遺伝子の機能を破壊したり(ノックアウト)、別の塩基配列に置き換えたりすること(ノックイン)が簡単にできるようになりました。また、Cas9 を用いた応用技術により、ゲノム上の狙った遺伝子の発現量を上げたり、下げたり

することも可能になりました。このような Cas9 に基づくゲノムエンジニアリング技術は、基礎研究から医療や創薬、食物の品種改良といった身近な分野にまで広く応用されています。

近年、CRISPR-Cas9 に加えて、CRISPR-Cpf1 がゲノム編集技術として利用できることが報告されました(参考文献 1,2,3,4)。Cpf1 は、ガイド RNA と結合し、ガイド RNA の一部と相補的な二本鎖 DNA を認識します。Cpf1 は、Cas9 と比べて標的 DNA への特異性が高く、オフターゲット効果が小さいことが大きな特徴です。また、ガイド RNA を自身で切り出せる機能を持っていて、複数の遺伝子を同時に標的にすることもできます。しかし、Cpf1 の分子構造は Cas9 とは大きく異なるため、Cas9 を基に開発されてきた応用技術が、そのままでは Cpf1 に適用できないという問題がありました。

### 研究内容

本研究グループは、上述の問題を解決するために、Cas9 を分割することで化合物または光刺激によりゲノム編集を誘導できることに着目し、まず Cpf1 を様々な箇所で二分割しました。得られた 34 種類の分割体(split-Cpf1)の中には、そのままでは N 末端断片と C 末端断片(注 6)が会合しないものが含まれていました。分割した split-Cpf1 の N 末端断片と C 末端断片が会合しないと、標的の遺伝子に結合できないことから、会合を外部から誘導することが必要です。この“誘導型の split-Cpf1”に、本研究グループが開発した光スイッチタンパク質“Magnet システム”(参考文献 5)(注 7)を連結することで、青色光のオン/オフにより DNA 切断活性をオン/オフに誘導することができる光活性化型の Cpf1 (paCpf1)を開発しました(図 1)。そこで、ヒト DNMT1 遺伝子(注 8)を標的としたゲノム編集を指標として paCpf1 を評価したところ、暗所では paCpf1 は全く DNA 切断活性を示さずヒト DNMT1 遺伝子の塩基配列を編集しませんでした。青色光を照射すると DNA 切断活性が観察され、当該遺伝子のゲノム編集を実行できることが確認できました。また、paCpf1 のオフターゲット効果を検証したところ、paCpf1 のオフターゲット効果は、二分割しても、Cpf1 と同程度に小さいことも明らかになりました。

今回、Cpf1 の二分割で得られた split-Cpf1 の中には、上述の“誘導型の split-Cpf1”に加えて、N 末端断片と C 末端断片が自然と会合して機能する“自発会合型の split-Cpf1”も含まれていることがわかりました。本研究グループは、Cas9 について“誘導型”の分割体(split-Cas9)を報告していますが(参考文献 6,7)、CRISPR システムにおいて“自発会合型”として細胞内で高い DNA 切断活性を示したのは、本研究の“自発会合型の split-Cpf1”が初めてです。

本研究グループでは、“自発会合型の split-Cpf1”を用いて、極めて高い効率で遺伝子発現を活性化できる技術を開拓しました。“自発会合型の split-Cpf1”には、Cpf1 が本来持っている N 末端と C 末端に加えて、分割によって新しく生じた N 末端と C 末端があります。Split-Cpf1 の DNA 切断活性を欠失させる変異を導入した(“split-dCpf1”と呼ぶ)上で、split-dCpf1 の 4 つの末端の全てに転写活性化因子(注 9)と核局在化シグナル配列(注 10)を連結し、遺伝子発現の活性化技術として“dCpf1-SA2.0”を開発しました(図 2)。培養細胞における内在性遺伝子の発現を指標として当該技術を実験したところ、“dCpf1-SA2.0”は、CRISPR-Cas9 を用いた従来技術(参考文献 8)よりもはるかに高い効率で遺伝子発現を活性化できることがわかりました。

さらに、本研究グループは、マウスの生体内でも“dCpf1-SA2.0”が効率よく遺伝子発現を活性化できることを示しました。マウスの肝臓に“dCpf1-SA2.0”を導入したところ、当該臓器でルシフェラーゼ(注 11)のタンパク質が効率よく発現していることがわかりました(図 3a,b)。ちなみに、dCpf1 を用いた既存技術(dCpf1-VPR)(参考文献 9)では、ルシフェラーゼの発現がほぼ観察できませんでした(図 3a,b)。また、内在性遺伝子の発現を指標に評価したところ、“dCpf1-SA2.0”は、当該遺伝子の発現をマウスの生体内で非常に強く活性化できることが示されました(図 3c)。

上述のように本研究グループは、新たに“誘導型の split-Cpf1”による青色光によるゲノム編集の光操作技術(paCpf1)を開発するとともに、“自発会合型の split-Cpf1”に基づいて、遺伝子発現の活性化

技術(dCpf1-SA2.0)を開発しました。本研究により、光刺激による精度の高いゲノム編集や極めて高い効率での遺伝子発現を制御することができます。今後、split-Cpf1を基盤として、生体でのゲノムエンジニアリングがさらに発展するとともに、生命科学の原理・現象の解明につながることを期待されます。

#### 参考文献

- 1) Zetsche, B. *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163, 759–771 (2015).
- 2) Kleinstiver, B. P. *et al.* Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.*, 34, 869–874 (2016).
- 3) Kim, D. *et al.* Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.*, 34, 863–868 (2016).
- 4) Yamano, T. *et al.* Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 165, 949–962 (2016).
- 5) Kawano, F. *et al.* Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins. *Nat. Commun.*, 6, 6256 (2015).
- 6) Nihongaki, Y. *et al.* Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nat. Biotechnol.*, 33, 755–760 (2015).
- 7) Nihongaki, Y. *et al.* CRISPR–Cas9-based photoactivatable transcription systems to induce neuronal differentiation. *Nat. Methods*, 14, 963–966 (2017).
- 8) Konermann, S. *et al.* Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517, 583–588 (2015).
- 9) Tak, Y. E. *et al.* Inducible and multiplex gene regulation using CRISPR-Cpf1-based transcription factors. *Nat. Methods*, 14, 1163–1166 (2017).

#### 5. 発表雑誌:

雑誌名:「*Nature Chemical Biology*」(8月12日(英国時間)オンライン)

論文タイトル:A split CRISPR–Cpf1 platform for inducible genome editing and gene activation

著者:Yuta Nihongaki, Takahiro Otabe, Yoshibumi Ueda, Moritoshi Sato\*(\*責任者)

DOI番号:10.1038/s41589-019-0338-y

#### 6. 問い合わせ先:

東京大学大学院総合文化研究科

教授 佐藤 守俊 (さとう もりとし)

<JST事業に関するお問い合わせ>

科学技術振興機構 戦略研究推進部 ライフイノベーショングループ

川口 哲(かわぐち てつ)

## 7. 用語解説:

### (注 1) CRISPR-Cpf1

ゲノムの切断を人為的に行うための技術。Cpf1 と呼ばれる DNA 切断酵素がガイド RNA とともに DNA に結合し、その DNA 配列を部位特異的に切断します。この CRISPR-Cpf1 システムは、バクテリオファージに対する原核生物の免疫システムとして発見されました。CRISPR-Cas9 と同様にゲノム編集に利用されています。

### (注 2) CRISPR-Cas9

ゲノムの切断を人為的に行うための技術。Cas9 と呼ばれる DNA 切断酵素がガイド RNA とともに DNA に結合し、その DNA 配列を部位特異的に切断します。この CRISPR-Cas9 システムは、バクテリオファージに対する原核生物の免疫システムとして発見されましたが、2012 年以降、ゲノム編集に利用されています。

### (注 3) オフターゲット効果

本来の標的とする配列以外の類似配列を認識してしまい、意図しない変異が生じてしまうこと。

### (注 4) ゲノムエンジニアリング

ゲノム上の遺伝子の塩基配列を改変してその機能を破壊したり(ノックアウト)、別の塩基配列で置き換える(ノックイン)技術や遺伝子発現の亢進・抑制したり、特定の遺伝子を書き換える技術のこと。

### (注 5) 大学発新産業創出プログラム (START: Program for Creating Start-ups from Advanced Research and Technology)

日本の大学などの基礎研究成果に関し、大学等発ベンチャーなどを通じた新規マーケットへの事業展開が十分に行われていない現状を踏まえて、平成 24 年度に文部科学省により「大学発新産業創出拠点プロジェクト」として創設され、平成 27 年度より科学技術振興機構が実施している制度です。本制度では、事業化ノウハウを持った人材(事業プロモーター)ユニットを活用して、大学などのポテンシャルの高いシーズの事業化を通じて新産業の創出、新規マーケットの開拓を目指します。大学等発ベンチャーの起業前段階から公的資金と民間の事業化ノウハウを組み合わせることにより、事業戦略・知財戦略を構築しつつ、既存企業にはリスクの負えないポテンシャルの高いシーズの事業化への挑戦を支援しています。本プログラムの成果として「遺伝子や生命の働きをコントローラブルに」をコンセプトとした大学発ベンチャー「株式会社ミーバイオ」が平成 31 年 4 月 1 日に設立されました。本ベンチャーは遺伝子改変動物を提供する事業からスタートし、特定疾患モデルマウスの受託開発や受精卵のライセンス販売を目指しています。

### (注 6) N 末端断片と C 末端断片

酵素(タンパク質)はアミノ酸のアミノ基とカルボキシ基がペプチド結合で繋がったポリマーです。このポリマーの末端のアミノ基側を含む部分を N 末端断片、カルボキシ基側を含む部分を C 末端断片と呼びます。

(注 7) Magnet システム

Magnet システムは、アカパンカビ (*Neurospora crassa*) が有する小さな光受容体のヴィヴィッド (Vivid) に対して多角的にプロテインエンジニアリングを施して開発されたタンパク質の対です。暗所では単量体として存在し、青い光を受容するとヘテロ二量体を形成します。

光による単量体と二量体の変換を利用して、さまざまな光活性化型のツールを設計・開発することができます。

(注 8) DNMT1 遺伝子

ヒト 19 番染色体にコードされた遺伝子。DNA のメチル化の制御に関わる。

(注 9) 転写活性化因子

転写を開始するために必要な複合体を呼び寄せて、転写を活性化するための因子のこと。

(注 10) 核局在化シグナル配列

細胞質で合成されたタンパク質を核に運び、局在化させるアミノ酸配列のこと。

(注 11) ルシフェラーゼ

ホタルや発光キノコなどの、生物発光を触媒する酵素のこと。遺伝子発現のレポーターとして使われています。

## 8. 添付資料:

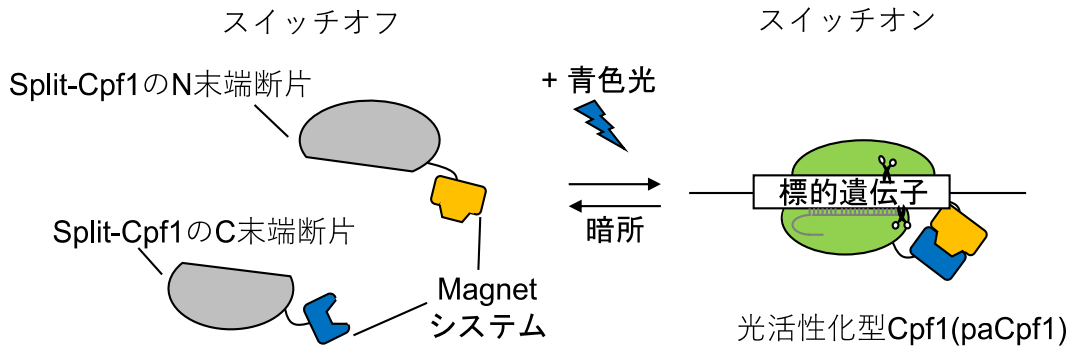


図1 本研究で開発した光活性化型 Cpf1 (paCpf1) の模式図。Split-Cpf1 の N 末端断片と C 末端断片に光スイッチタンパク質 (Magnet システム) 連結して、光活性化型 Cpf1(paCpf1)を開発しました。paCpf1 は青色の光を照射すると、Magnet システムの結合に伴って、本来の Cpf1 のように DNA 切断活性を回復し、標的遺伝子を切断します(スイッチオン)。青色光の照射を止めると、Magnet システムが乖離し、DNA 切断活性を失います(スイッチオフ)。

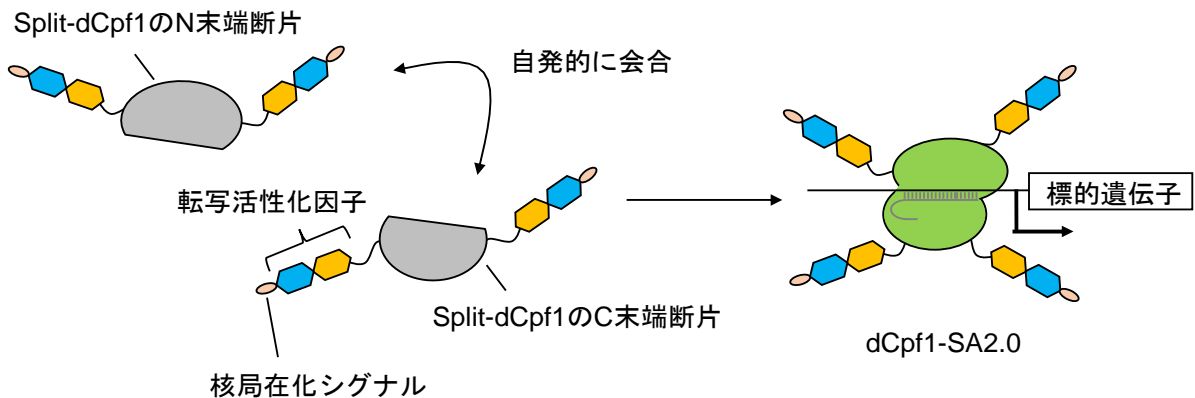


図2 本研究で開発した自発会合型 Cpf1 (dCpf1-SA2.0) Split-dCpf1 には、本来の N 末端と C 末端に加えて、分割によって新しく生じた N 末端と C 末端があります。この 4 つの末端の全てに転写活性化因子および核局在化シグナル配列を連結することで、標的遺伝子を強力に活性化することが可能になりました。

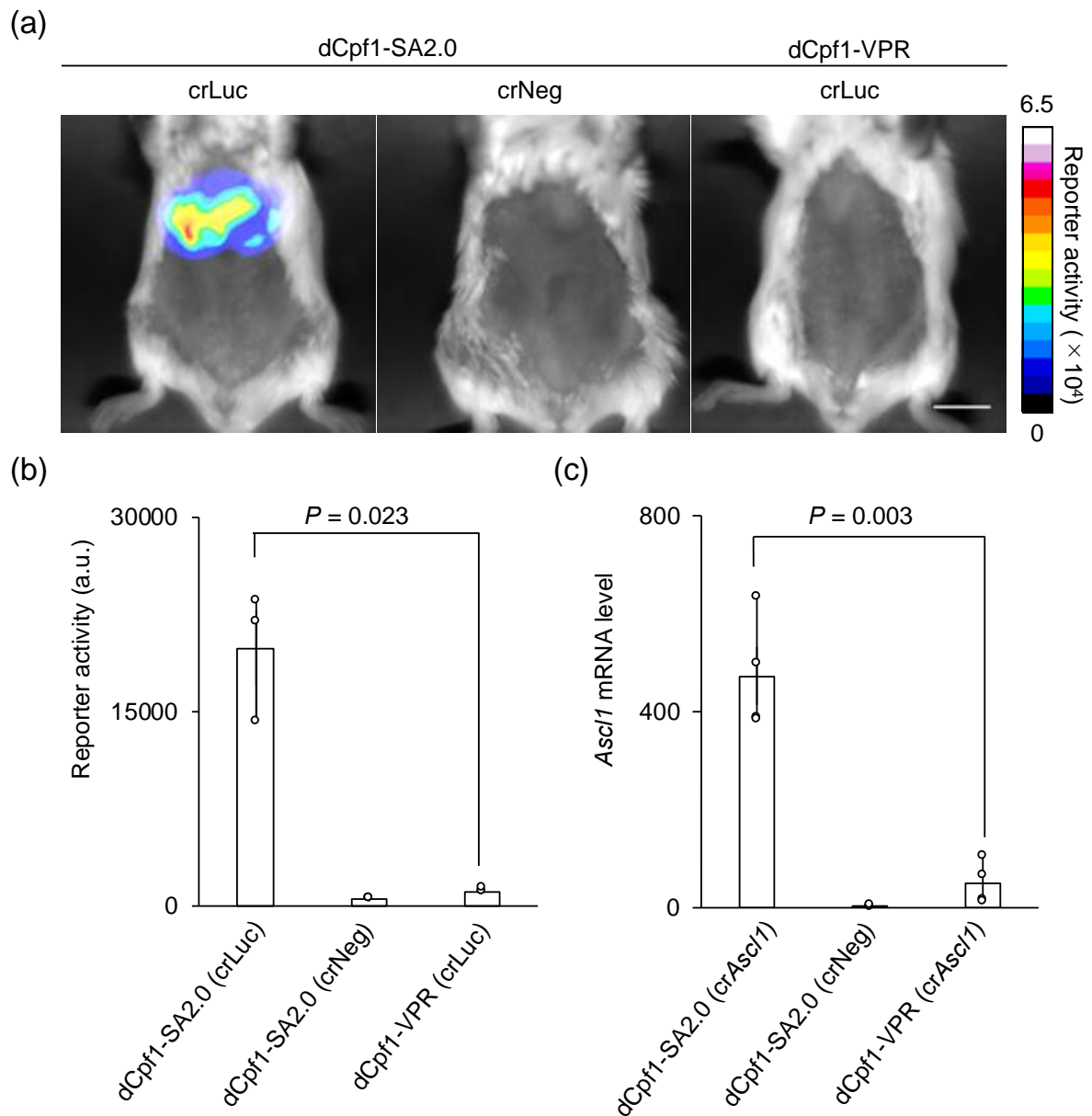


図3 マウスの肝臓におけるルシフェラーゼレポーターの応答

- (a) マウスの肝臓での遺伝子発現を、ルシフェラーゼをレポーターとして用いることで可視化しました。dCpf1-SA2.0は、ネガティブコントロール(crNeg)およびdCpf1を用いた既存技術(dCpf1-VPR)と比べて、非常に高い効率でルシフェラーゼの発現を誘導しました。
- (b) 図3aの画像データから遺伝子発現を数値データで示しています。
- (c) 内在性遺伝子(*Asc1*)の発現を指標に評価した結果、dCpf1-SA2.0は、当該遺伝子の発現を、マウスの肝臓で、既存技術(dCpf1-VPR)よりもはるかに強く、活性化できることが示されました。