

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019

受付番号 201906229

氏名 中出 翔太

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

## 記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：ボストン（国名：アメリカ合衆国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

自己標的型 CRISPR によって細胞外刺激の受容を記録する細胞内デバイスの開発

3. 派遣期間：令和 1 年 5 月 7 日～令和 3 年 5 月 6 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名：マサチューセッツ工科大学 (MIT)

部局名：Department of Biological Engineering

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

## 研究・調査実施状況

本研究においては、ゲノム編集ツールを利用して、これまで解析が困難とされてきた生命現象を一細胞単位で追跡するデバイスの構築を目指す。そのために、以下の研究を実施した。

## 自己標的型記録デバイスの特徴と課題

CRISPR-Cas9 の応用技術である“細胞内記録デバイス”は、細胞が受け取った刺激の強度や時間などの情報を DNA に記録して追跡するために用いられる。代表的なデバイスは、派遣者の受入研究室が開発した mSCRIBE があり (S. D. Perli., et al, Science, 2016)、これは自己の sgRNA 配列を認識するように改変した自己標的型 sgRNA (self-targeting sgRNA: stgRNA) を利用する。stgRNA は、Cas9 タンパク質と複合体を形成して自身の配列を標的にして何度も変異を導入するため、蓄積した変異を解析することで stgRNA もしくは Cas9 タンパク質の発現量を推定することが可能である。このデバイスは、システムの転写を制御するプロモーターなどを組み替えることで、様々な遺伝子ネットワークやシグナル伝達の活性を長期的に追跡することが可能である。しかし、mSCRIBE は Cas9 の変異がランダムに生じることが問題だった。この非正確な改変のために、変異の導入回数を精密に推定することが難しい。そこで、まずは導入される変異を正確に制御することを目指し、新しい遺伝子改変技術をデザインした。

## これまでのゲノム編集技術を自己標的型記録デバイスに応用するときの問題点

Cas9 は、sgRNA と Cas9 の複合体によって構成される。sgRNA は約 23nt のスペーサー配列を利用して標的の領域を認識し、Cas9 は二本鎖切断 (DSB: double-strand break) を導入する。切断末端は、生体が持つ DNA 修復機構である非相同末端結合 (NHEJ: non-homologous end joining) などによって修復され、そのときに生じるエラーによって欠失や挿入が導入される。

しかし、これは完全に細胞の修復機構に依存しているため、標的に導入される変異がランダムだった。そこで、Cas9 を用いたゲノム編集が実用化された当初から、修復の鉄型となるドナー-DNA を利用した正確な改変が利用してきた。ここでも同様に DSB 修復経路が利用されるが、ランダムな変異を導入する NHEJ ではなく、修復の鉄型となるドナーを要求する相同配列依存型修復 (HDR) が用いられる。また、デアミナーゼと連結することで一塩基置換を誘導する Base editing や、逆転写酵素と sgRNA に付加したテン

プレートを利用して任意の変異を導入する prime editing なども、正確な変異を導入するゲノム編集技術として登場した。しかし、このすべての手法が stgRNA を用いた記録デバイスへの応用には向いていない。ドナーが必要な HDR を利用した編集や prime editing は、ドナー配列に従った配列の変異しか導入できないので、自身の配列に何度も変異を導入する記録デバイスには利用できない。また、Base editing が誘導する一塩基置換は、塩基を置換してしまうとそれ以上は改変は導入できない。

#### 特定の長さの塩基対を挿入／欠失させるゲノム編集技術の考案

そこで、特定の塩基対の挿入や欠失を誘導するための新規ゲノム編集ツールを開発することにした（申請書:A. 高解像度 mSCRIBE の開発”に従う）。ドナーを用いず、挿入や欠失を正確な長さで導入することができれば、自身の配列に変異が導入された回数をその長さで推定することが可能になる。

この技術は、高解像度の記録デバイスの基盤になるだけでなく、DNA ドナーなしでフレームシフト変異の修復を可能にする画期的なツールとなる。フレームシフト変異が原因の疾患は、がん、パーキンソン病、筋ジストロフィー、パーキンソン病、筋ジストロフィー、心筋症、貧血性疾患、クローン病、囊胞性線維症、結節性硬化症など無数にあるため、よりシンプルな方法でこれらを治療できる派遺者の新規ツールの開発は、新たな遺伝子治療法の確立にも繋がる。

#### 特定の長さの塩基対を挿入／欠失させるツールの検討

Cas9 と特定の要素を組み合わせることによって、正確な長さの塩基対を挿入あるいは欠失させることにした。派遺者は、このシステムによって、ドナー・テンプレートを使用せずに正確で予測可能な突然変異を誘導することができる。

#### 編集用ツールの候補のリストアップと作製

派遺者は、この技術の実現のために編集用ツールの組み合わせをリストアップし、どのツールが効果的かを確かめるためのスクリーニングを実施した。これらのツールをコードした配列をヒト発現用ベクターに挿入することで、ライプラリを作製した。

#### 最適な編集用ツールの決定

作製したスクリーニング用ベクターを、リポフェクション法によって HEK293T に導入した。48 時間後にゲノムを回収した後、それぞれの標的配列を PCR によって増幅した。得られた PCR 産物を解析機関に提出し、サンガー・シークエンスの波形データを取得、TIDE と呼ばれる変異解析ツールによって挿入／欠失割合を算出した。結果的に、特定の組み合わせのうちのいくつかで正確な長さの挿入／欠失を高効率に誘導させることができたことが明らかになった。

以上の結果から、特定の長さの塩基対を挿入／欠失させるゲノム編集技術の開発が完了した。以後は成果の論文化と並行し、このツールを用いた自己標的型記録デバイスの開発を実施する。これについては、派遺研究室が開発した mSCRIBE に開発したツールを組み合わせることで容易に達成できるだろう。

報告書の内容に今後の知財申請や論文発表に関する記載が含まれるため、現時点での公開可能内容を記載する。公開可能時期以降に規程ページ数の報告書を掲載予定

#### 成果の発表・関係学会への参加状況

CRISPR-Cas9 による変異パターンを特定するための解析基盤とそのプログラムについて、発表者らが CHSL meeting, Keystone symposia に参加した。また、ゲノム編集法の概要や CRISPR-Cas9 を用いた記録デバイスについて日本の学術誌等へ寄稿した。現在、派遺者の研究は米国特許出願中である。