

ゲノム編集を制御する新たな技術、Split-CRISPR-Cpf1 の開発

東京大学の研究グループは、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 は、従来技術の CRISPR-Cas9 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がさらに発展することが期待されます。

本研究成果は、8月12日の「Nature Chemical Biology」(電子版)に掲載された。

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 をさまざまな箇所 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” 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)。

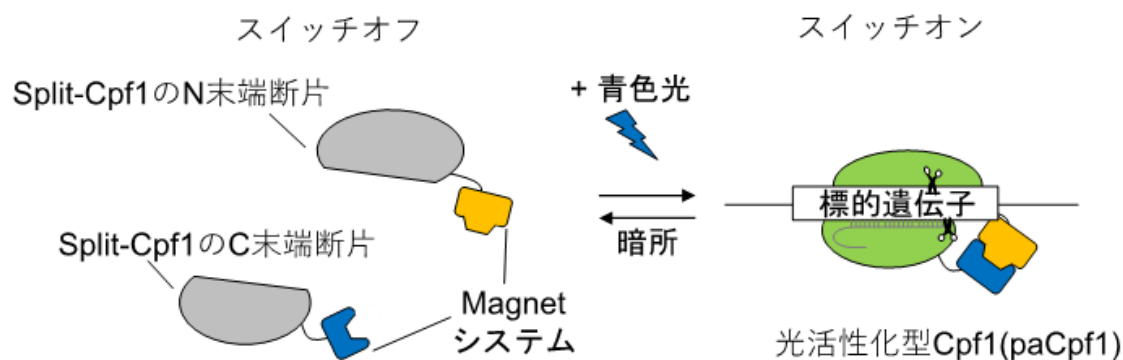


図1 本研究で開発した光活性化型 Cpf1 (paCpf1) の模式図

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分かりました。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、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と核局在化シグナル配列を連結し、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評価したところ、“dCpf1-SA2.0”は、CRISPR-Cas9 を用いた従来技術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分かりました。

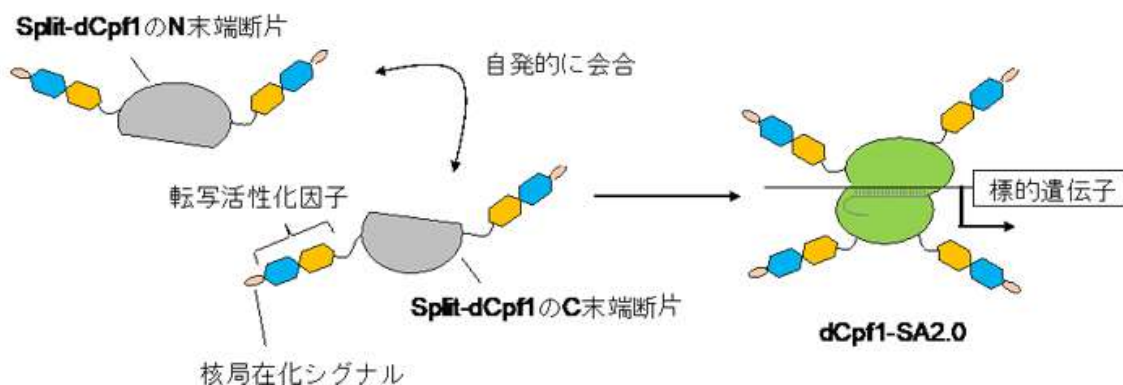


図2 本研究で開発した自発会合型 Cpf1 (dCpf1-SA2.0)

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のタンパク質が効率よく発現していることが分かりました (図3 a、b)。ちなみに、dCpf1 を用いた既存技術 (dCpf1-VPR) 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3 a、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3 c)。

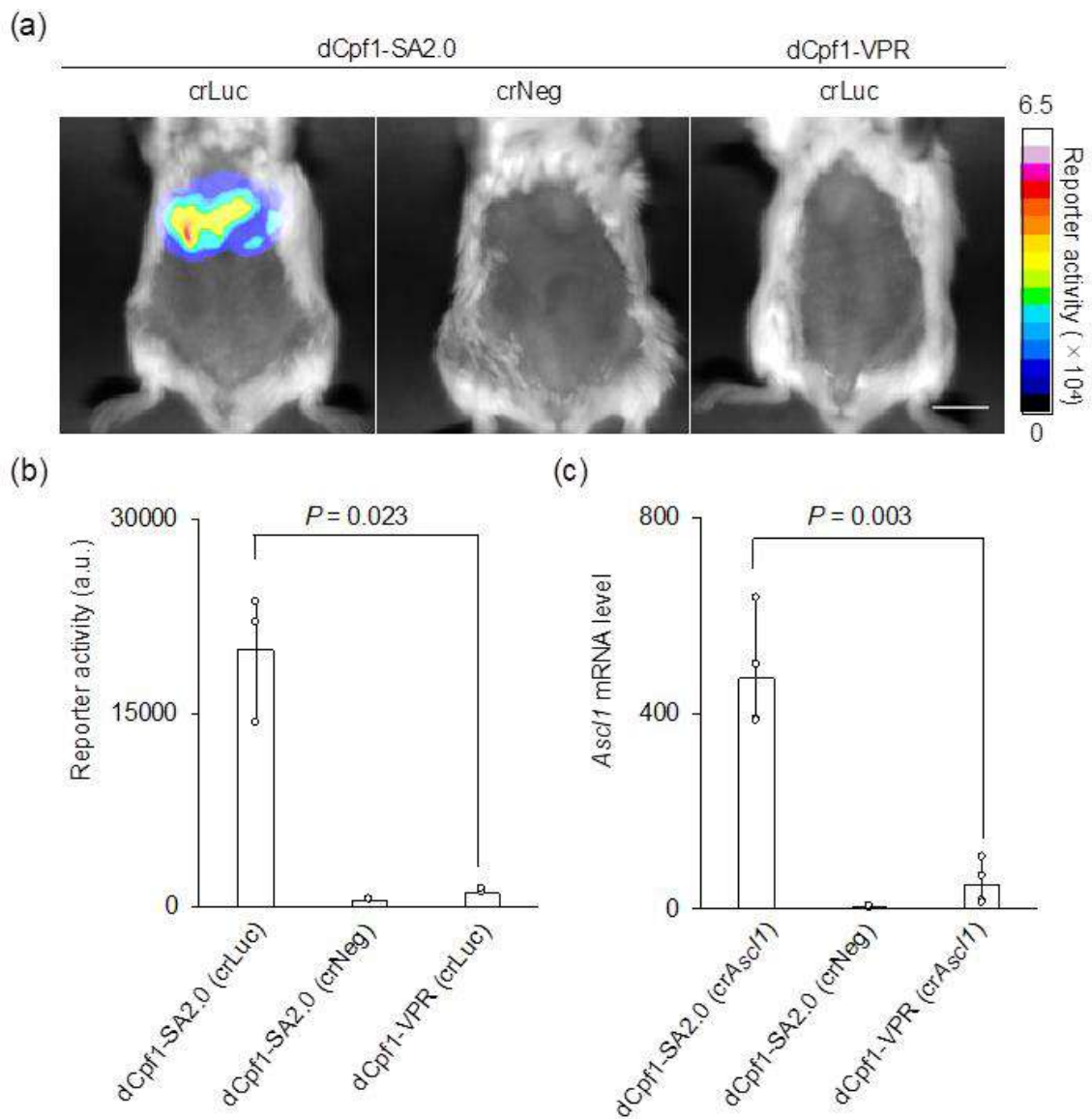


図3 マウスの肝臓におけるルシフェラーゼレポーターの応答

日文新聞发布全文 <https://www.jst.go.jp/pr/announce/20190813/index.html>

文：JST 客观日本编辑部翻译整理