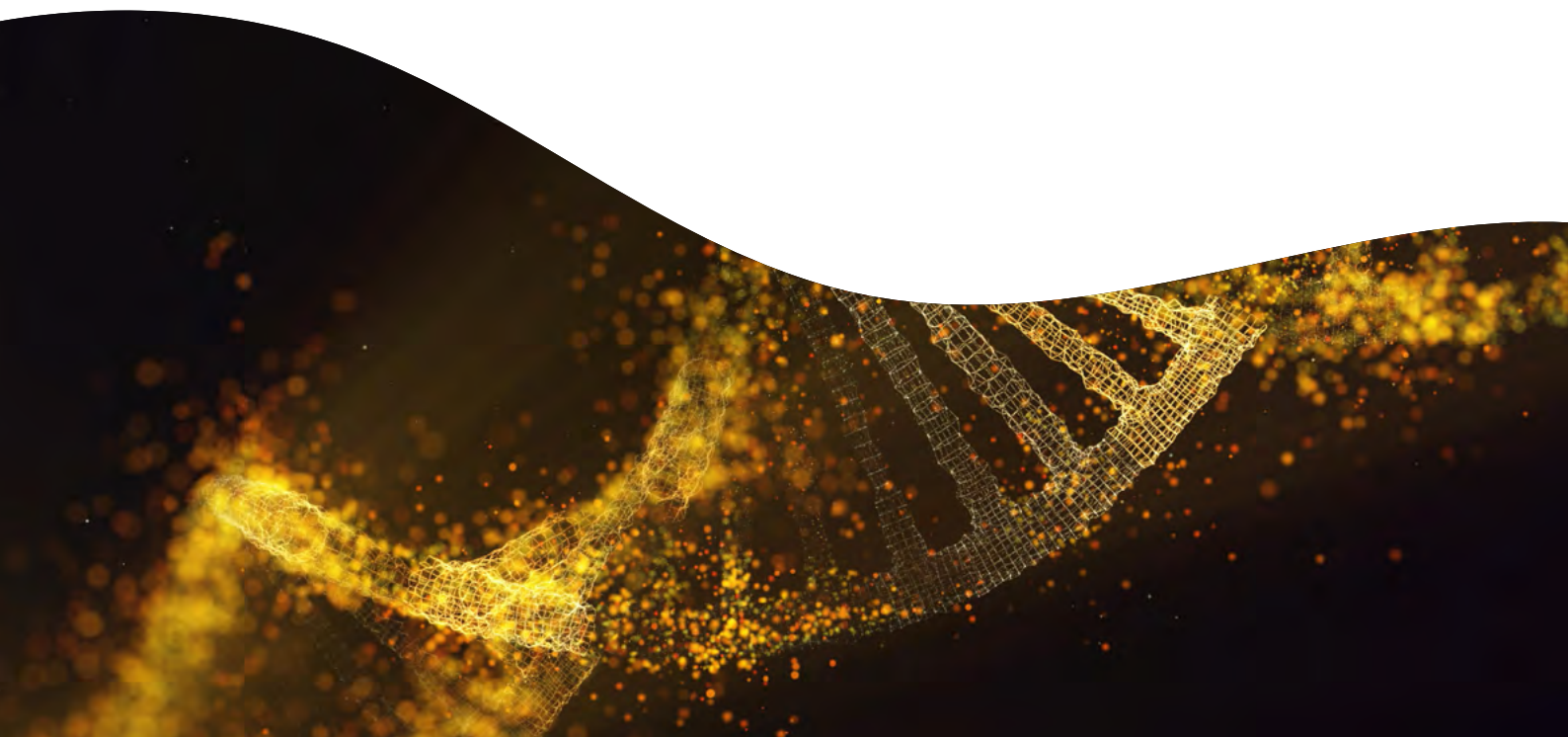


コンパクトなV型エフェクタータンパク質 dCasMINIを搭載したPin-point™塩基編集システム

はじめに

塩基編集は、二本鎖切断を起こすことなくDNA配列を正確かつ効率的に改変できる画期的なゲノム編集技術です。この技術は、2016年にハーバード大学のDavid Liuらによって開発されました¹。彼らの発表した方法は、CRISPR-Cas9システムの正確なターゲティングを利用し、ヌクレアーゼ欠損Cas9と融合したデアミナーゼを目的の部位に運び、その結果、C-G塩基対をT-A塩基対に変換する方法です。それ以来、アデニンデアミナーゼやグリコシラーゼを含む様々なDNA修飾酵素を用いて、特定のヌクレオチドの正確かつ効率的な編集を可能にする塩基編集システムが開発されてきました。さらに、ニックーゼCas9^{10A}を用いると、非標的鎖にニックを導入することで本来の塩基エディターの効率が2~6倍に向上し、編集された鎖を鋳型としてDNAを修復することが促進されます¹。

RevvityのPin-point™塩基編集プラットフォームは、以下の3つの構造要素からなるモジュール式システムです (Fig 1)。i) バクテリオファージMS2 (MS2) のオペレーターステムループ由来のRNAアプタマーを持つガイドRNA (gRNA)、ii) MS2コートタンパク質 (MS2 coat protein: MCP) に融合したシチジンデアミナーゼからなるエフェクター分子、iii) 2分子のウラシルDNAグリコシラーゼ (Uracil DNA Glycosylase: UNG) 阻害剤 UGI²に融合したニックーゼCas9。これらのコンポーネントはそれぞれ個別にデリバリーされ、細胞内で結合して完全な塩基編集システムを形成します。このモジュール性により、標的部位のニーズを最適化するために各成分を個別にカスタマイズすることができます。



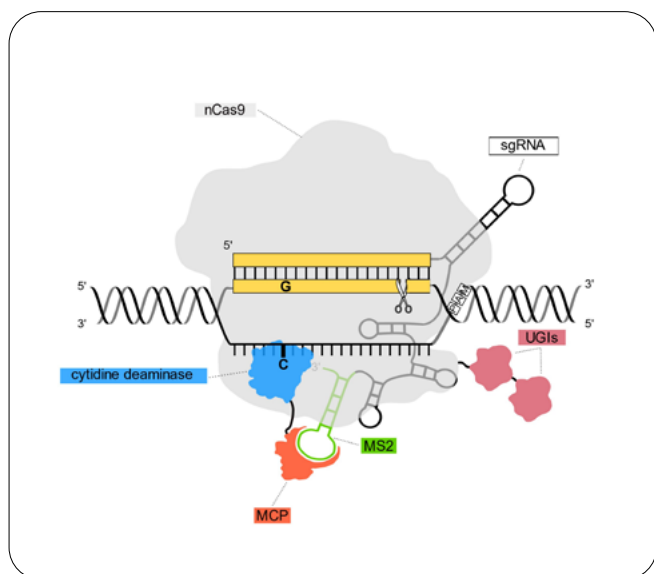


Figure 1. Pin-pointベース編集プラットフォームの1つの構成

Pin-point塩基編集技術のある構成例の概略図。SpCas9ニッカーゼ (nCas9) がgRNAに結合し、gRNAに融合したリクルーターRNAアプタマー (MS2) がエフェクターモジュールをリクルートします。エフェクター分子は、アプタマー結合タンパク質 (MCP) と融合したデアミナーゼによって構成されます。デアミナーゼが標的部位に導入されると、CRISPRのRループ内のないDNA鎖上の標的シトシン残基を編集できる活性複合体が形成されます。

編集のための標的シトシンへのアクセス性を決定する重要な要因は、Cas酵素が標的部位を認識するために必要な短いDNA配列であるプロトSpacer隣接モチーフ (protospacer adjacent motif: PAM) 配列です。PAM配列はCas酵素によって異なり、Cas9はNGG (Nは任意のヌクレオチド) のPAM配列を必要とします。オリジナルのPin-pointシステムはnCas9を用いて開発されたため、標的とできる変異の範囲がNGG PAMに近いシトシンに制限されています。これに対処するため、我々は、Cas9と同様に標的認識と切断に単一のエフェクターを必要とする、代替のクラス2のV型ファミリーのCasエフェクタータンパク質の使用を検討しました。V型タンパク質は独特のPAM配列を持ち、多くの場合T-richであるため、これまでアクセスできなかったゲノム領域のシトシンを標的とすることができます。しかし、V型タンパク質はDNAの両鎖を順次切断するヌクレアーゼドメインを1つしか持ちません。従って、塩基編集を行うためには、ニッカーゼの代わりにV型Casのデッドバージョンを使用しなければなりません。

我々は、nCas9の代わりに、不活性化されたV型タンパク質dCasMINIを用いて、Pin-pointプラットフォームの柔軟性を実証しました。dCasMINIは、活性が最大になるように最適化され、オフターゲットプロファイルが低いUn1Cas12f1の改変バージョンです^{3,4}。編集効率とプロファイルへの影響を調べるため、sgRNA分子の様々な構造を設計し、様々な

標的部位に対応できるピンポイントシステムの汎用性を強調しました。さらに、編集効率の異なる2種類のデアミナーゼ、ヒトApobec3a⁵の強化バージョンとAnolis carolinensis Apobec (AnoApobec) を用いたデータを作成し、Pin-pointプラットフォームの柔軟性をさらに実証しました。

結果と考察

Pin-pointプラットフォームのモジュール性と柔軟性をテストするために、nCas9エフェクターの代わりに、高レベルの活性と特異性を達成するために最適化された有望なV型タンパク質であるdCasMINIを用いました^{3,4}。また、ratApobecの代わりにhApobec3AとAnoApobecを用いました。また、5つの異なるバージョンのgRNAコンポーネントも作製しました。HEK293T細胞にdCasMINIベースのPin-pointプラットフォームの3つのコンポーネントを発現するプラスミドをトランスフェクトし、VEGFA-1とVEGFA-2の2つの異なる部位を分析しました。Figure 2に描かれているように、ターゲティングウィンドウ内のシトシンの位置、遺伝子座、デアミナーゼ、および使用したgRNAデザインによって、0~32.5%の編集レベルが観察されました。このことは、システムの柔軟性と最適化の可能性を明確に示しています。

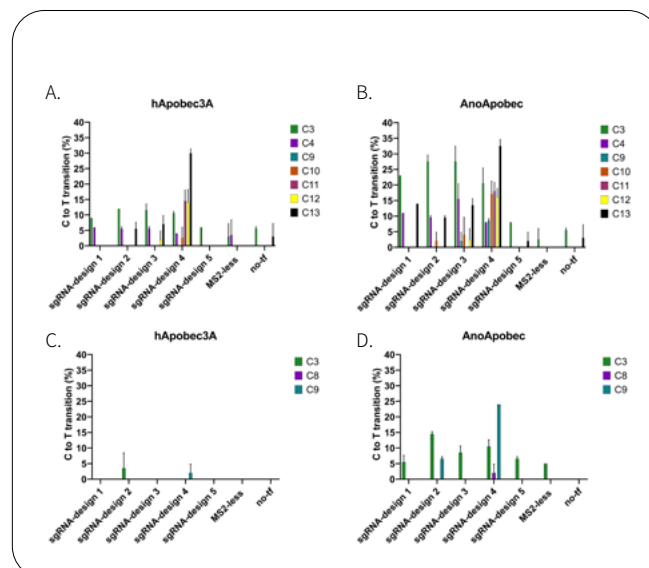


Figure 2. dCasMINIベースのPin-pointプラットフォームは、2つの異なるデアミナーゼと5つのsgRNAデザインを用いてHEK293T細胞で機能する

サンガーシーケンス解析により、dCasMINIベースのPin-pointプラットフォームがHEK293T細胞株において異なる部位にC→T転移を導入することが示されました。VEGFA-1 (A, B) とVEGFA-2 (C, D) の2つの異なるgRNAが標的とする2つの異なる領域を示しています。2つの異なるデアミナーゼ、hApobec3AまたはAnoApobecを使用しました。X軸はgRNAの異なるデザインを示しています。コンポーネントはDNAプラスミドトランスフェクションによって導入されました。No-tf: No transfection control

編集効率に影響すると思われる因子は何層にも重なっています。第1に、塩基編集効率には遺伝子座に依存した明らかな変化があります。すなわちVEGFA-1 (Figure 2Aと2B) はVEGFA-2 (Figure 2Cと2D) よりも高い効率で編集されます。第2に、AnoApobecはhApobec3Aよりも、テストした全てのgRNAデザインにおいてより効率的なエディターです。最後に、gRNAデザインによる編集効率と特異性の明らかな変化があります。これは、特定のシトシンに非常に特異的な編集を達成することに大きな関心があったり、アクセス可能なすべてのシトシンを網羅する、より広い編集ウィンドウを使用することを好んだりする場合など、適応症によっては、関連性があります。例えば、dCasMINI、AnoApobec、およびgRNAデザイン2の組み合わせは、VEGFA-1のターゲティングウィンドウにおける3位のシトシンのより特異的な編集を提供しますが、dCasMINI、AnoApobec、およびgRNAデザイン4を用いれば、同じ部位に存在するすべてのシトシンを標的とすることができます。この違いは、no-tf (non-transfected) 条件で観察されるバックグラウンドノイズによって観察されるように、この位置がサンガーシーケンスで配列決定するのが困難であっても再現可能です。デアミナーゼとしてhApobec3Aを用いた場合、gRNAデザイン2と4の間のターゲティングウィンドウで同じ効果が観察されますが、特にVEGFA-2部位では編集効率が低いことが観察されます (図2Aおよび2B)。この効果を確認し、プロジェクトの目的に応じて適切な組み合わせを選択するためには、ハイスループットでのさらなる実験が必要です。

Pin-pointプラットフォームの3つのモジュールを変更することで、原理的には、Casタンパク質、デアミナーゼ、およびgRNAデザインを自由に組み合わせ、それぞれのアプリケーションのニーズに迅速に適応できるため、非常に柔軟な機能と、目的のあらゆるシトシンを標的とする可能性を示すことができます。

材料と方法

細胞培養とトランスフェクション

HEK293T細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS) と100U ml⁻¹ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle Medium: DMEM) で培養した。トランスフェクションの24時間前に、96ウェルプレートの1ウェルに10,000個の細胞を播種し、トランスフェクションのために70%程度のコンフルエントにした。24時間後、DharmaFECT Duo (Dharmacon™) を用いて、200 ngのプラスミドDNA (75 ng Casベクター、75 ng デアミナーゼベクター、50 ng sgRNA発現ベクター) で細胞を脂質トランスフェクトした。

細胞溶解

トランスフェクションから72時間後、培地を除去し、細胞をPBSで1回洗浄した後、50 μLのTrypLE express enzyme (Thermo Fisher Scientific) を各ウェルに添加した。細胞が解離した後、100 μLの新鮮なDMEMを加え、再懸濁した細胞20 μLを96ウェルプレートに移し、60 μLのDirectPCR溶解試薬 (Viagen Biotech) と共に、55°Cで45分間、次いで95°Cで15分間の条件でインキュベートした。細胞溶解液は、PCR増幅まで-20°Cで保存した。

標的領域のPCR増幅

各サンプルから1 μLの細胞溶解液を鋳型としてPCR反応を行った。GoTaq Hot Start polymerase (Promega)を用いて目的の領域をPCR増幅した。反応ミックスは以下のように設定した：

Reagent	Volume
5x GoTaq buffer	5 μl
MgCl ₂ (25 mM)	2 μl
dNTPs (100 mM)	0.1 μl
Forward primer (10 uM)	1.25 μl
Reverse primer (10 uM)	1.25 μl
Nuclease-free water	15.4 μl
Total	25 μl

PCR反応は以下のサーモサイクリング条件で行った：

Step	Temperature	Time
Initial denaturation	95°C	30 seconds
30 cycles	95°C	10 seconds
	64°C	30 seconds
	72°C	30 seconds
Final extension	72°C	2 minutes

塩基編集解析

アンプリコンの塩基配列はSanger sequencingで決定し、オープンソースツールBEATを応用したChimera解析ツールで塩基編集効率を計算した。Chimeraはまず、中央値を上限とする外れ値の幾何平均を用いて、サンプルの予想される変動を定義するためにバックグラウンドノイズを決定する。続いて、Chimeraはバックグラウンドノイズを差し引き、31 bpの入力ガイド配列にわたるベースエディターの編集効率を決定する。

References

1. Komor, A. C., et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **533**, 420–424 (2016)
2. Collantes, J. C. et al. Development and Characterization of a Modular CRISPR and RNA Aptamer Mediated Base Editing System. *The CRISPR Journal* **4**, 58–68 (2021)
3. Xu, X. et al. Engineered miniature CRISPR-Cas system for mammalian genome regulation and editing. *Molecular Cell* **81**, 4333-4345 (2021)
4. Xin, C. et al. Comprehensive assessment of miniature CRISPR-Cas12f nucleases for gene disruption. *Nature Communications* **13**: 5623 (2022)
5. Wang, X et al. Cas12a Base Editors Induce Efficient and Specific Editing with Low DNA Damage Response. *Cell Reports* **31**, 9 (2020)

For more information:

ホライゾン・ディスカバリー株式会社

horizondiscovery.com/contact-us

Horizonの製品、サービス、ライセンス事業は、Revvityブランドのポートフォリオの一部となりました。

The Revvity logo is displayed in a bold, lowercase, sans-serif font. It is positioned in the lower right quadrant of the page, above a large yellow wavy graphic that spans the bottom of the document.