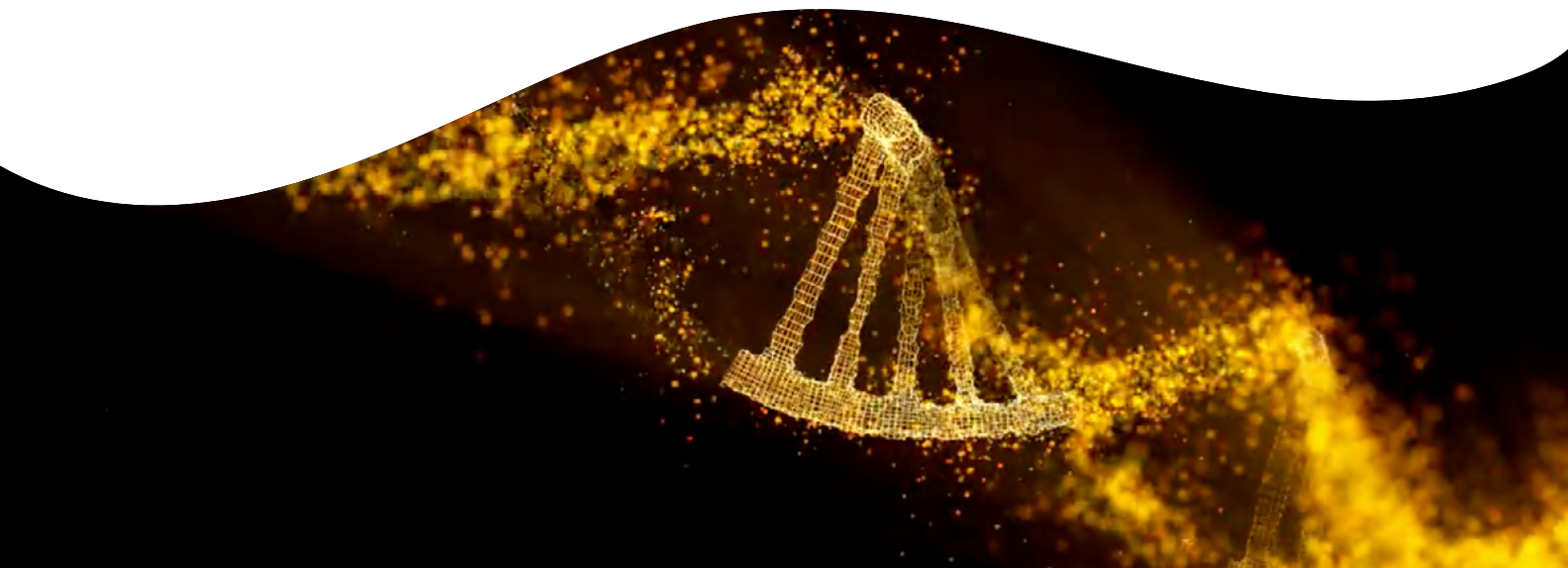


Revvity Pin-point™塩基編集システム： 次世代遺伝子編集技術の標的範囲と精度を向上させる、新規のヌクレアーゼ非依存性のモジュラー式プラットフォーム

Introduction

塩基編集は、ゲノムに正確な変化を導入できる次世代の遺伝子編集技術です。もともとは2016年にハーバード大学のDavid Liuら¹⁾によって開発された塩基編集は、臨床応用に向けて急速に進歩しています。塩基編集システムは、未成熟停止コドン²⁾やスプライス部位の破壊³⁾を導入することで目的の遺伝子をノックアウトすることができ、遺伝子修正のために特定の点変異を導入することもできますが⁴⁾、潜在的な治療標的すべてにアクセスできる技術としてはまだ限界があります^{5,6)}。

CRISPR-Casに基づく遺伝子編集システムの限界の一つは、標的認識に必要なプロトSpacer隣接モチーフ (protospacer adjacent motif: PAM) に依存していることです。PAM配列は、Cas酵素が標的DNA配列に結合する場所を決定し、したがって塩基エディターが効果を発揮できるDNAの領域 (塩基編集ウィンドウと呼ばれる) を決定します。野生型Cas9はNGG PAM(Nは任意の塩基) に依存します。GリッチPAMがCas9変異体によってしばしば使用される一方で、他のCas変異体は、TリッチPAMを利用するクラス2V型酵素を含む様々な代替PAM配列要件を抱えています。PAM less、あるいはPAM lessに近い酵素も開発されており、それらはPAM結合要件が緩和されているため、ゲノム中の塩基編集の機会をさらに拡大する可能性があります⁷⁾。2020年、CRISPR-Cas塩基編集システムのバイオインフォマティクス研究により、シトシン塩基編集システムで修正可能な単発性疾患に関連するヒトSNVのうち、利用可能なシステムの編集ウィンドウで対応可能なものは約25%に過ぎないことが明らかになりました⁸⁾。



塩基編集ウィンドウは、デアミナーゼの使用法と塩基エディターの設定の組み合わせによって変更することもできます。塩基編集には、シトシンデアミナーゼ (C:GからT:Aへの塩基変化を誘導) またはアデニンデアミナーゼ (A:TからG:Cへの変化を誘導) を用いることができます。シトシンデアミナーゼを例にとると、クラス、型、生物種によって編集ウィンドウや効率に差があります^{8,9)}。さらに、異なるリンカーの使用や塩基編集モジュール全体の構成も、オンターゲットの編集効率や精度に影響を与えます^{10,11)}。

ここでわれわれは、Collantesら¹²⁾により最初に報告されたPin-point™塩基編集プラットフォームのユニークなモジュール性と、アクセスすることが困難なゲノムターゲットに対処するためのその利点を実証しました。ここで述べられている新しいスクリーニングアプローチにより、RNAガイドヌクレアーゼ、デアミナーゼ、様々なガイドRNAデザイン、アプタマーの組み合わせを簡単かつ迅速に評価することができ、様々な治療的塩基編集アプリケーションを可能にし、最適化することができます。

結果

Pin-pointプラットフォームは、3つの異なるコンポーネントで構成されています (Figure 1)。RNAガイドヌクレアーゼは、アプタマーを含むgRNAによって目的のゲノム遺伝子座に誘導され、アプタマー結合タンパク質を介してデアミナーゼがリクルートされます。複合体のRNAガイドヌクレアーゼ部分はDNAのRループをほどこき、塩基変換のために一本鎖をデアミナーゼにアクセスさせます。特定のニックアーゼII型ヌクレアーゼが使われると、標的鎖にニック (切れ目) が作られ、目的の塩基変化を促進するDNA修復メカニズムが開始されます。不活性化されたII型またはV型ヌクレアーゼが使われると、変換された塩基は次のDNA複製によって

DNAに組み込まれます。この塩基編集システムの3つの構成要素はすべて、特定の用途や標的に合わせて構成し、最適化することができます。

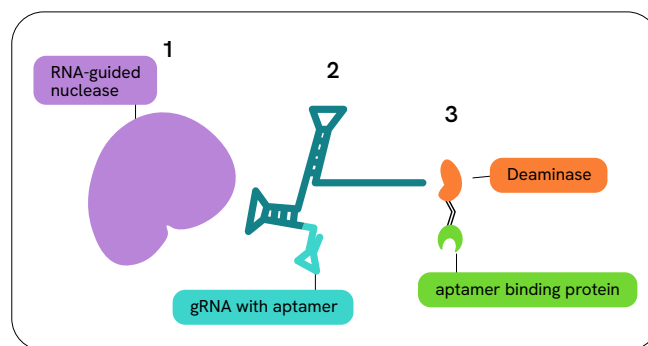


Figure 1. Pin-point塩基編集システムのモジュール構成要素 1) RNAガイドヌクレアーゼ、ニックアーゼまたは不活性化型 2) RNAガイドヌクレアーゼと協働するように特別に設計された、アプタマーを伴うシングルガイドRNA、crRNA、またはcrRNA:tracrRNA 3) アプタマー結合タンパク質によってリクルートされたデアミナーゼ

ヌクレアーゼの型やバリエーションの違いは、標的特異性、結合効率、酵素のサイズ、PAMの要件など多岐にわたり、ゲノムへのより高いアクセスを可能にします。Pin-pointシステムは汎用性が高く、crRNA:tracrRNA、sgRNA、またはcrRNAのみを利用するRNAガイドヌクレアーゼに適應できます。概念実証として、いくつかのV型およびII型酵素のバリエーションを用いてPin-pointシステムを評価しました (Table 1)。ここでは、これらの予備的評価のサブセットから得られた結果について述べます。

Table 1. Pin-point塩基編集システムは、さまざまなII型およびV型のヌクレアーゼを用いて予備的に評価されている。(この評価内容は2023年7月時点のものです。)

	Type II			Type V						
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Enzyme activity	nickase	nickase	nickase	deactivated	deactivated	deactivated	deactivated	deactivated	deactivated	deactivated
Demonstrated nuclease activity in mammalian cells	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Demonstrated with the Pin-point system	✓	✓	In progress	✓	In progress	✓	In progress	✓	✓	In progress
sgRNA optimized	✓	In progress		In progress		✓		✓	✓	
Enzyme optimized	✓					✓				
Confirmed at multiple targets (2+)	✓	In progress				✓		✓	✓	
Demonstrated in multiple cell types (2+)	✓	In progress				✓		✓		
Demonstrated with multiple deaminases (2+)	✓							✓	✓	

このパイロット評価の1つでは、V型酵素をアプタマーガイドRNAとシトシンデアミナーゼと組み合わせ、ゲノムにC:GからT:Aの塩基編集を導入しました。まず、哺乳動物細胞で効率よく発現させるために酵素配列そのものを最適化し、その結果、活性が2倍上昇することが確認されました (Figure 2A)。次に、gRNAスキャフォールド内の異なる位置にアプタマーを配置した様々なガイドRNA設計をスクリーニングし、標的遺伝子に対して活性をさらに50%増加させる設計を同定しました (Figure 2B)。次に、この更新された構成が、より治療に関連した第二の標的に対応できるかどうかを検討したところ、実際に、さらなる最適化を行わなくても、第二の標的での編集が観察されました (Figure 2C)。次に、同じ更新された構成を臨床的に関連性のあるT細胞で使えるかどうかを検討したところ、このシステムは開発されたがん細胞株でも、初代T細胞でも有効でした (Figure 2D)。

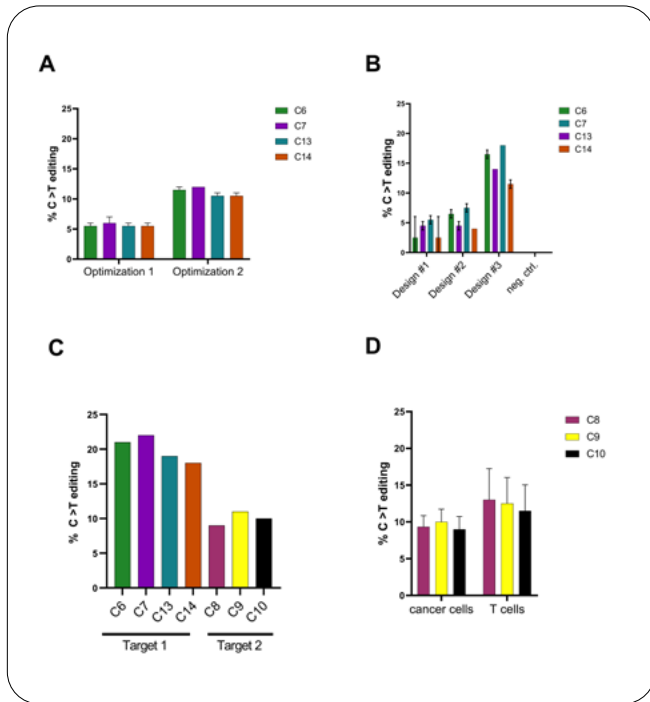


Figure 2. Pin-point塩基編集システムを用いた不活性化V型酵素の予備評価。A) V型ヌクレアーゼを最適化した結果、最初の標的部位におけるCからTへの編集率が2倍増加した。B) 最初の標的部位のガイドRNA設計を最適化した結果、設計 #3で編集ウィンドウ全体の編集効率の増加が観察された。C) このPin-pointシステム構成を2つの異なる標的部位で検証した。D) 2番目の標的部位も、臨床的に関連性のある初代T細胞で検証された。

別の例では、別の不活性化V型ヌクレアーゼと組み合わせることで、ガイドRNAデザインを最適化できることを示しました (Figure 3A)。次に、ガイドRNAデザイン3を使用し、それを2つの異なるデアミナーゼと組み合わせると、塩基編集ウィンドウ内での編集をさらに調整できることを観察しました (Figure 3B)。

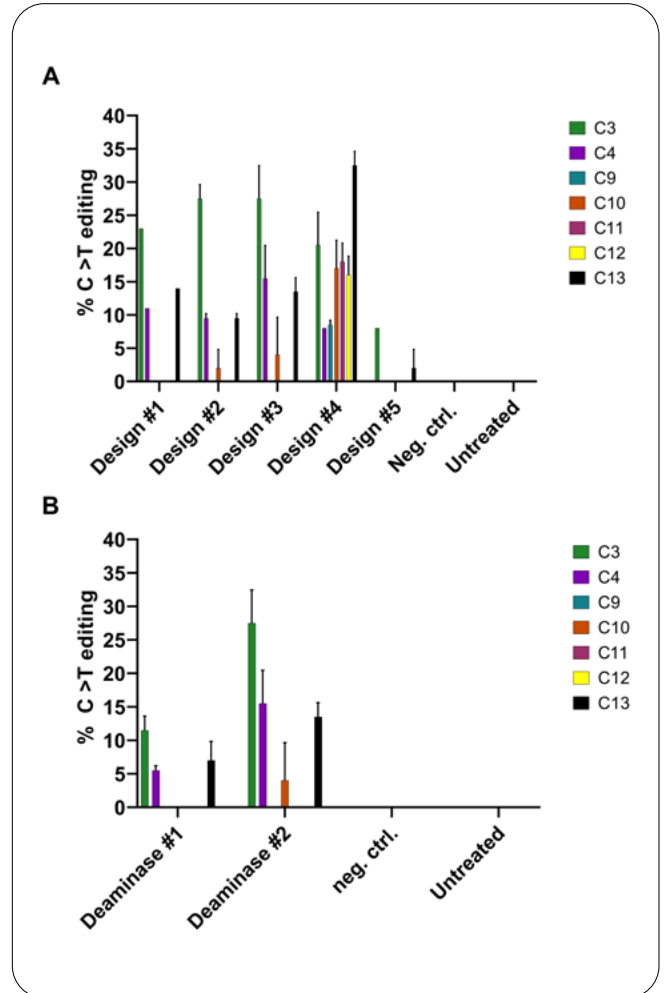


Figure 3. ピンポイント塩基編集システムを用いた第二の不活性化V型酵素の予備評価。A) ガイドRNA設計を最適化した結果、塩基編集ウィンドウ内で異なる活性と編集結果が得られた。B) ヌクレアーゼと最適化されたガイドRNAデザイン3を異なるデアミナーゼとペアリングすると、塩基編集ウィンドウ内で異なる編集結果が得られた。

Pin-point塩基編集プラットフォームでニックラーゼII型酵素を利用するために、私たちはまず、ヌクレアーゼに特異的なアプタマー含有ガイドRNA設計のスクリーニングから始め、複数の標的部位でうまく機能する設計を同定しました (Figure 4A, manuscript submitted)。次に、様々なシトシンデアミナーゼを用いて特定の標的配列をスクリーニングし、治療に関連する標的を正確に編集するためのPin-pointプラットフォームの最適な構成を特定しました (manuscript in progress)。このスクリーニングアプロ

チで得られたデータの一部として、最初の標的では、デアミナーゼ 1が標的のウィンドウ内でCからTへの明確な単一塩基置換をもたらしたのに対し (Figure 4B)、2番目の標的では、デアミナーゼ 2が目的のCで特異的な編集イベントをもたらしたことが確認されました (Figure 4C)。

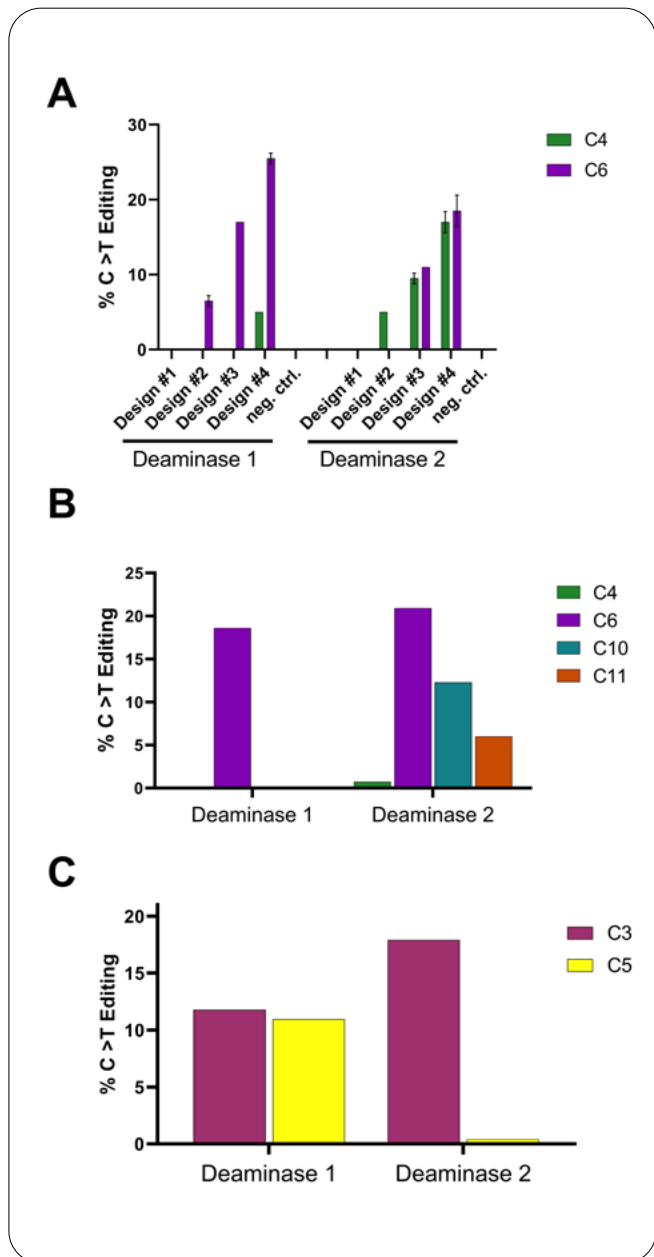


Figure 4. Pin-point塩基編集システムを用いたニックカーゼII型酵素の予備評価と、その後の塩基編集ウィンドウへの影響。A) ガイドRNAの設計を最適化した結果、塩基編集ウィンドウ内で異なる活性と編集結果が得られた。B, C) 異なるデアミナーゼと標的ガイドRNAをペアリングすると、塩基編集ウィンドウ内で異なる編集結果が得られた。

考察

ここでは、モジュール式Pin-point塩基編集プラットフォームの利点と、II型およびV型Cas酵素のサンプルとの使用に適應できる能力を示しました。一旦アプタマーガイドRNAの足場が最適化されれば、このシステムは様々な細胞型に翻訳され、様々な標的に対応することができます。さらに、異なるデアミナーゼを用いることで、標的ウィンドウへの特異的な効果を調べ、目的の特定の塩基変化を正確に標的化することができます。

アプリケーションによって、またバスターゲット効果が許容されるかどうかによって (例えば、遺伝子ノックアウトのために未成熟終始コドンを導入する場合には許容されるかもしれない)、編集効率、予測されるオフターゲット、編集精度のバランスをとるためにシステムをさらに最適化することができます。Pin-pointシステムはモジュール式であるため、異なるアプリケーションのためにエレメントを入れ替えることができ、各組み合わせのクローニングに時間をかけることなく、ハイスループットでスクリーニングすることができます。

材料と方法

細胞培養とトランスフェクション

トランスフェクションの24時間前に、HEK293T細胞とU2OS細胞を96ウェルプレートに1ウェル当たり10,000~20,000個を播種した。DharmaFECT™ Duo Transfection Reagent (Revvity, #T-2010) を用いて、Pin-point成分を導入するためのプラスミドまたは化学合成gRNAと、mRNA試薬のさまざまな組み合わせを細胞にコトランスフェクトした。ニックカーゼII型酵素試験では、Cas9ニックカーゼを安定発現するHEK293T細胞を作製し、化学合成gRNAをデアミナーゼmRNAと共導入した。初代T細胞における不活性化V型酵素試験のために、SepMapカラム (STEMCELL Technologies) を用いてLymphoprep上に重層することにより、血液 (例えば、CPD血液バッグ、アフレーシスコーン、leukopakなど) からPBMCを単離した。その後、EasySep Human T Cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies) を用いてネガティブセレクションを行い、全CD3+ T細胞を分離した。T細胞をフローサイトメトリーでチェックし、1x ペニシリン/ストレプトマイシン (ThermoFisher) を加えたImmunocult XT培地 (STEMCELL Technologies) で37°C、5% CO2で培養した。活性化後48-72時間後に、Neon Electroporator (ThermoFisher) を用いて、10 μLチップで250k細胞中、1600v/10ms/3パルスで、デアミナーゼmRNA、不活性化V型酵素mRNA、化学合成gRNAをエレクトロポレーションした。

細胞溶解とPCR

トランスフェクションから72時間後、proteinase K (Thermo Scientific, #FERE00492)、RNase A (Thermo Scientific, #FEREN053 I)、Phusion HFバッファー (Thermo Scientific, #F-518L)を含む100 µLのバッファー中で、56°Cで30分間、続いて95°Cで5分間熱失活させた。あるいは、細胞をPBSで1回洗浄し、50 µLのTrypLE express酵素 (Thermo Fisher Scientific)を各ウェルに添加した。細胞が解離した後、新鮮なDMEMを100 µL加え、再懸濁した細胞20 µLを96ウェルプレートに移し、DirectPCR溶解試薬 (Viagen Biotech) 60 µLとともに以下の条件でインキュベートした (55°Cで45分間、次いで95°Cで15分間)。その後、細胞溶解液を用いて、塩基編集部位を含む領域にまたがるPCRアンプリコンを作成した。長さ400-1000 bpのPCRアンプリコンを製し、Sanger sequencingで塩基配列を決定した。

塩基編集解析

オープンソースツールBEATを改良したChimera™解析ツールを用いて、サンガーシーケンスリードから塩基編集効率を計算し、% C to T編集として表示した。Chimeraはまずバックグラウンドノイズを決定し、中央値を上限とする外れ値の幾何平均を用いて、サンプルに期待される変動を定義する。続いて、Chimeraはバックグラウンドノイズを差し引き、入力ガイド配列の範囲におけるベースエディターの編集効率を決定する。

References

1. Komor A, Kim Y, Packer M, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **533**:420-424 (2016). doi.org/10.1038/nature17946.
2. Billon P, Bryant EE, Joseph SA, et al. CRISPR-Mediated Base Editing Enables Efficient Disruption of Eukaryotic Genes through Induction of STOP Codons. *Mol Cell* **67**(6):1068-1079.e4 (2017). doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.008.
3. Kluesner MG, Lahr WS, Lonetree C, et al. CRISPR-Cas9 cytidine and adenosine base editing of splice-sites mediates highly-efficient disruption of proteins in primary and immortalized cells. *Nat Commun* **12**:2437 (2021). doi.org/10.1038/s41467-021-22009-2.
4. Richter MF, Zhao KT, Eton E, et al. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. *Nat Biotechnol* **38**:883-91 (2020). doi.org/10.1038/s41587-020-0453-z.
5. Liu Hi, Zhu Y, Li M, et al. Precise genome editing with base editors. *Medical Review* **3**(1):75-84 (2023). doi.org/10.1515/mr-2022-0044.
6. Lavrov AV, Varenikov GG, Skoblov MY. Genome scale analysis of pathogenic variants targetable for single base editing. *BMC Med Genomics* **13**(8): 80 (2020). doi.org/10.1186/s12920-020-00735-8.
7. Yu SY, Birkenshaw A, Thomson T, et al. Increasing the Targeting Scope of CRISPR Base Editing System Beyond NGG. *CRISPR J.* **5**(2):187-202 (2022). doi: 10.1089/crispr.2021.0109.
8. Wang X, Ding C, Yu W, et al. Cas12a Base Editors Induce Efficient and specific editing with low DNA damage response. *Cell Reports.* **31**(9):107723 (2020). doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107723
9. Kim YB, Komor AC, Levy JM, et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat Biotechnol.* **35**(4):371-376 (2017). doi: 10.1038/nbt.3803.
10. Tan J, Zhang F, Karcher D, et al. Engineering of high-precision base editors for site-specific single nucleotide replacement. *Nat Commun.* **10**:439 (2019) doi: 10.1038/s41467-018-08034-8
11. Arbab M, Matuszek Z, Kray KM, et al. Base editing rescue of spinal muscular atrophy in cells and in mice. *Science* **380**(6642):eadg6518 (2023). doi: 10.1126/science.adg6518
12. Collantes JC, Tan VM, Xu H, et al. Development and Characterization of a Modular CRISPR and RNA Aptamer Mediated Base Editing System. *CRISPR J.* **4**(1):58-68 (2020). doi: 10.1089/crispr.2020.0035.

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。

revvity