

CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いた紫外線防御剤となる多機能光回復酵素の開発

大阪大学大学院基礎工学研究科

山元 淳平

Ultraviolet (UV) exposure of DNA causes formation of harmful DNA damage, such as cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts (6-4PPs), which block DNA replication and induce mutagenesis, leading to carcinogenesis. Repair of these lesions is a vital pathway to maintain genetic integrity, and thus loss of the genes responsible for DNA repair causes cell death or cancer. Among the DNA repair systems, photoreactivation is the simplest pathway, in which a sole photo-responsive enzyme, photolyase (PL), can repair UV-induced DNA lesion in a light-dependent manner. Therefore, PLs are molecules applicable to the UV protectant under sunlight.

PLs are classified into two major classes, CPD photolyase and (6-4) photolyase, depending on their target substrates (CPD and 6-4PP, respectively). If a hybrid type of PL that can recognize and repair both CPDs and 6-4PPs is developed, such a molecule excellently inhibits formation of UV-induced DNA damage and functions as a UV protectant. In this study, I intended to develop the hybrid photolyase by combination of CRISPR-Cas9 genome editing technology and directed evolution of photolyase. Plasmids were designed to knock the modified PL genes in human cells via homology-independent targeted integrity, with a promoter and antibiotic-resistant gene. After transfection of the plasmid with Cas9 and gRNA-producing plasmids, however, antibiotics-resistant strains were not obtained, although the target genes were integrated into the AAVS1 site. Thus, the plasmid was used for functional screening of the hybrid PL in bacteria, the results of which are shown in this report.

1. 緒言

生体中の遺伝情報を含むDNAは紫外線の曝露により化学構造の変化が誘起され、隣接するピリミジン塩基間において光架橋反応が起こり、シクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD) や (6-4) 光産物といった紫外線損傷DNAが形成される。これら紫外線損傷DNAの修復はヌクレオチド除去修復機構 (NER) が担っており、その修復経路の遺伝的欠損は色素性乾皮症などの紫外線高感受性症状を伴う重篤な疾病の原因であることが知られている。一方、大腸菌からヒトを除く高等生物に広範に保存されている光回復と呼ばれるDNA修復経路は、フラビントンパク質のひとつである光回復酵素が紫外線損傷の直接認識・修復を担っており、紫外線損傷DNAを単一の酵素で、かつ太陽光中の青色光を用いて修復することができるユニークな酵素である¹⁾。

ヒトは光回復酵素を有していないため、光回復酵素を外来からヒト細胞中へと導入、もしくは適切な条件で表皮塗布することで、上記疾患の遺伝子治療や紫外線防御効果が期待される。一方で、光回復酵素は高い基質選択性を有しており、CPDおよび(6-4)光産物のそれぞれの修復を担う

酵素が存在する (図1)。ヒト培養細胞に対して光回復酵素を導入する試みは2000年代前半からなされ始め、CPD光回復酵素をHeLa細胞へ導入することで、紫外線によって誘起されるアポトーシスの減少²⁾や、UVB曝露に起因する炎症作用の軽減³⁾といった効果が報告されている。さらに、CPD光回復酵素を有するトランスジェニックマウスが作成され、高い紫外線耐性を持つことが報告されている⁴⁾。また、より効率よくかつ簡便にCPD光回復酵素の遺伝子を導入するため、mRNAとして初代ケラチノサイトへの導入がなされ、医療応用への方向性が示された⁵⁾。いずれの報告例も、CPD光回復酵素のみを用いており、(6-4)光回復酵素を導入した報告例は見当たらない。単一の酵素で両方の損傷を修復することのできるハイブリッド型光回復

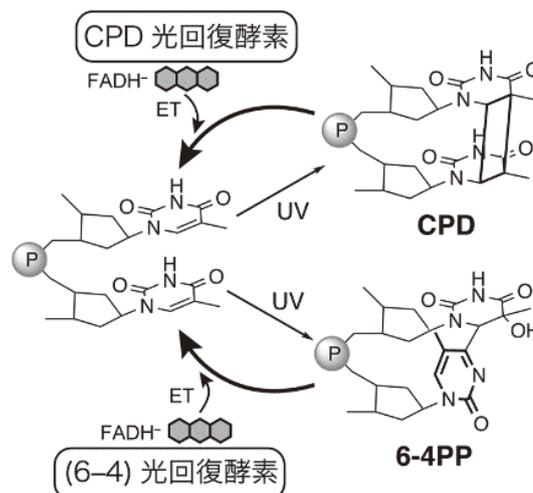


図1 光回復酵素について



Development of multi-functional photolyase as an ultraviolet protectant using CRISPR-Cas9 genome editing

Junpei Yamamoto

Graduate School of Engineering Science, Osaka University

酵素を調製できれば、前述の治療応用が可能になることが期待される。過去に、(6-4)光回復酵素の一部のアミノ酸をCPD光回復酵素の相同アミノ酸へと置換することで、(6-4)光回復酵素でありながら、CPDの修復が可能となることを報告している⁶⁾。しかし、この酵素は(6-4)光回復酵素としての機能が喪失しており、ハイブリッド型としての遺伝子治療やコスメトロジーへの応用には十分ではない。

本研究では、(6-4)光回復酵素を基本骨格とし、(6-4)光産物修復能を保持したままCPD光回復能を持たせたハイブリッド型光回復酵素を、Error-prone PCRおよびヒト線維芽細胞に対するCRISPR-Cas9ゲノム編集技術を組み合わせることで開発することを計画した。

2. 方法

2.1. プラスミド構築

基本骨格となるプラスミドにはpBluescript II SK (-)を用い、XhoI/SacIサイトに諸々のPCR産物を導入した。PCRはPrimeSTAR MAX DNA polymeraseもしくはPrimeSTAR GXL DNA polymerase (タカラバイオ)を用いた。PCR増幅産物はアガロースゲル電気泳動によって分離・精製した。PCR増幅産物を用いたプラスミドの構築には、In-fusion HDキット (タカラバイオ)を用いた。構築したプラスミドを用いて大腸菌Stellar competent cells (Clontech)を形質転換し、得られたプラスミドのDNA配列はコロニーPCR産物のシーケンス解析により確認した。本研究で構築した基本プラスミドを、pGE-XbaI-IPAと名付けた。目的配列を有する大腸菌コロニーを培養し、プラスミドをNucleoBond Xtra Midiキットで精製した。

pGE-XbaI-IPAのクローニングサイトXbaI部位に、*Methanosarcina mazei*由来CPD光回復酵素(MmCPDII)もしくは*Xenopus laevis*由来(6-4)光回復酵素(XI64)を導入したプラスミドpGE-MmCPD-IPAおよびpGE-XI64-IPAは同様に作成した。

2.2. Error-prone PCR

XI64に対するランダム変異導入は既報⁷⁾に従いError-prone PCRにより行った。100 μLの反応混合液(0.3 μMプライマー、10 ng pGE-XI64-IPA、rTaq DNA polymerase、10 mM Tris-HCl、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、1 mM MnCl₂、1.5 mM dATP、1.5 mM dGTP、1 mM dCTP、1 mM TTP)を調製し、変性(95 °C 30 s)・アニーリング(55 °C 30 s)・伸長(68 °C 2 min)のサイクルを35回行った。PCR産物はアガロースゲル電気泳動により分析・精製した。

2.3. スクリーニング

DNA修復活性の有無のスクリーニングには、DNA修復能を失った大腸菌SY2株を利用したUVサバイバルアッ

セイを用いた。制限酵素XbaIによって線状化したpGE-XbaI-IPAと2.2.で調製したPCR産物をIn-fusion HDキットによって環状プラスミドとし、反応処理後の溶液を用いてSY2を形質転換し、薬剤を含む寒天培地プレート上に撒いた。そのプレートに対し、0.2 J/m²の紫外光を照射後、白色光を30分照射した。その後、暗所37 °Cにて静置し、得られたコロニーについてコロニーPCRを行った。PCR産物のDNA配列を解析し、変異導入された位置を調べた。

3. 結果

3.1. 実験系のデザイン

CRISPR-Cas9による遺伝子導入には従来相同組換え(HR)が用いられるが、非分裂細胞ではHRの頻度が低いため、非相同末端結合(NHEJ)を介したHomology-Independent Targeting Integration (HITI)法⁸⁾による導入を計画した。そのために、図2に示すプラスミドDNAを設計・作成した。CRISPR-Cas9による遺伝子導入部位はヒトゲノム上のセーフハーバーであるAAVS1とし、2つのAAVS1認識配列でヒトPGKプロモーター・大腸菌EM7プロモーター・サブクローニング用制限酵素サイト(XbaI)・内部リボソーム進入部位(IRES)・ピューロマイシン耐性遺伝子(PuroR)・ポリAを挟んでいる。このプラスミドをpGE-XbaI-IPAと名付けた。プラスミドをAAVS1認識ガイドRNAおよびCas9発現プラスミドとともにヒト細胞に導入すれば、クローニングサイトにサブクローニングした任意の遺伝子をAAVS1へ導入することができる。また、本系は大腸菌の合成プロモーターであるEM7を保有しているため、XbaIサイトに導入した遺伝子を大腸菌中でも発現することができる。

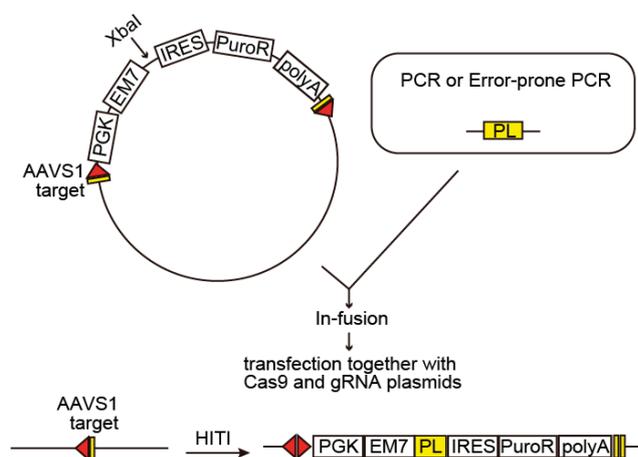


図2 設計したプラスミドとHITIによるゲノム導入

3. 2. ヒト細胞を用いたプラスミドの機能確認

本システムの確認のため、制限酵素サイトにCPD光回復酵素および(6-4)光回復酵素の遺伝子をpGE-XbaI-IPAにサブクローニングしたプラスミドpGE-MmCPDII-IPAおよびpGE-XI64-IPAを調製し、NERが欠失したXP2OS細胞にこれらのプラスミド、AAVS1のgRNA用プラスミド、およびCas9プラスミドとともに導入した。トランスフェクション7日後からピューロマイシンによる薬剤セレクションを行ったが、薬剤耐性を獲得した細胞は得られなかった。

トランスフェクション後の細胞からゲノムDNAを抽出し、PCRをしたところゲノム中への遺伝子挿入は確認された。コントロールで用いた別の遺伝子導入プラスミドでは、ピューロマイシン耐性遺伝子はEF1 α プロモーター下流に存在し、こちらは薬剤耐性が獲得された。このことから、XP2OS細胞ではPGKプロモーターの働きが弱く、薬剤耐性が十分に獲得されなかったものと考えられる。したがって、ヒト細胞を用いたスクリーニングはできないと判断した。

3. 3. 大腸菌SY2によるサバイバルアッセイ

構築したプラスミドは大腸菌のプロモーターも含むため、今回目的としたスクリーニングは大腸菌でも実施可能である。そこで、各種DNA修復関連遺伝子を薬剤耐性遺伝子で置換した大腸菌株SY2および今回構築したプラスミドを用いてスクリーニングが実施可能かどうかを検証した。

このSY2株は内在性の組換え修復、光回復、およびヌクレオチド除去修復ができないため、紫外線照射によって極めて容易に死滅する。ここに光回復酵素遺伝子を保有するプラスミドを導入することで、紫外線照射につづく白色光照射により、紫外線損傷DNAを修復することが可能となり、生存率の向上が見られることが期待される。

まず、今回構築したプラスミドpGE-XbaI-IPA、pGE-MmCPDII-IPA、およびpGE-XI64-IPAを用いてSY2株を形質転換し、その紫外線損傷DNAの修復に伴う生存率の向上が見られるかどうか調べた。その結果、CPD修復

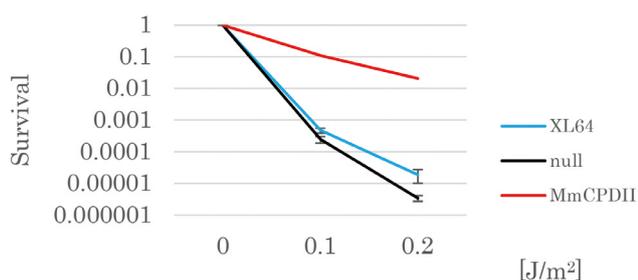


図3 UV サバイバルアッセイの結果

能を有するMmCPDIIを導入したプラスミドで形質転換を行った場合、生存率の大幅な向上が観測された。XI64を含むプラスミドでは、光回復酵素を含まないものと比較すると小程度の生存率の向上が見られた(図3)。これらのことから、今回構築したプラスミドがSY2株の中で機能していることがわかった。MmCPDIIとXI64の生存率の差は、生成する紫外線損傷の種類に対応していると考えられる。一般的に、紫外線照射によって生成する損傷としては、6-4PPよりもCPDの方が多くなることが報告されており、6-4PP修復能しか持たないXI64の導入ではCPDの修復はできないため、限定的な生存率の向上となったと考えられる。

3. 4. Error-prone PCRによる変異導入および機能スクリーニング

これらの結果から、XI64に対して変異導入を行いCPD修復能が獲得された場合、生存率の大幅な向上が期待できる。そこで、XI64をテンプレートとし既報に従いError-prone PCRを行って変異導入を行った。XbaIサイトで線状化したpGE-XbaI-IPAに対してPCR産物をIn-fusion法にて連結し、SY2大腸菌株を形質転換した。プレート上に塗布した後、0.2J/m²の紫外線を照射し、白色光30分照射ののち、37℃でインキュベートしたところ、コロニーの形成が確認された。このうち、10個のコロニーをピックアップし、DNA配列を解析した。結果をTable 1に示す。

Table 1 Error-prone PCRによるXI64の変異導入パターン

Entry	変異導入塩基	変異のタイプ	アミノ酸の変異
1	T 483 A	Transversion	なし (Gly 161 Gly)
	A 1436 T	Transversion	Asn 479 Ile
	A 1510 G	Transition	Asn 504 Asp
2	C 246 T	Transition	なし (Phe 88 Phe)
	A 356 C	Transversion	Glu 119 Ala
	T 1556 C	Transition	Val 519 Ala
3	C 734 T	Transition	Thr 245 Ile
4	A 428 G	Transition	Asn 143 Ser
	G 574 A	Transition	Val 192 Ile
	A 900 G	Transition	なし (Ala 300 Ala)
	T 1055 C	Transition	Ile 352 Thr
5	A 1093 G	Transition	Thr 365 Ala
6	A 1041 G	Transition	なし (Arg 347 Arg)
	T 1227 C	Transition	なし (Phe 409 Phe)
7	T 940 C	Transition	Cys 314 Arg
	A 1128 T	Transversion	なし (Gly 376 Gly)
	A 1519 G	Transition	Lys 507 Glu
8	リード失敗		
9	C 1089 T	Transition	なし (Phe 363 Phe)
	T 1278 C	Transition	なし (Asp 426 Asp)
10	T 694 C	Transition	Cys 232 Arg
	A 1128 G	Transition	なし (Gly 376 Gly)

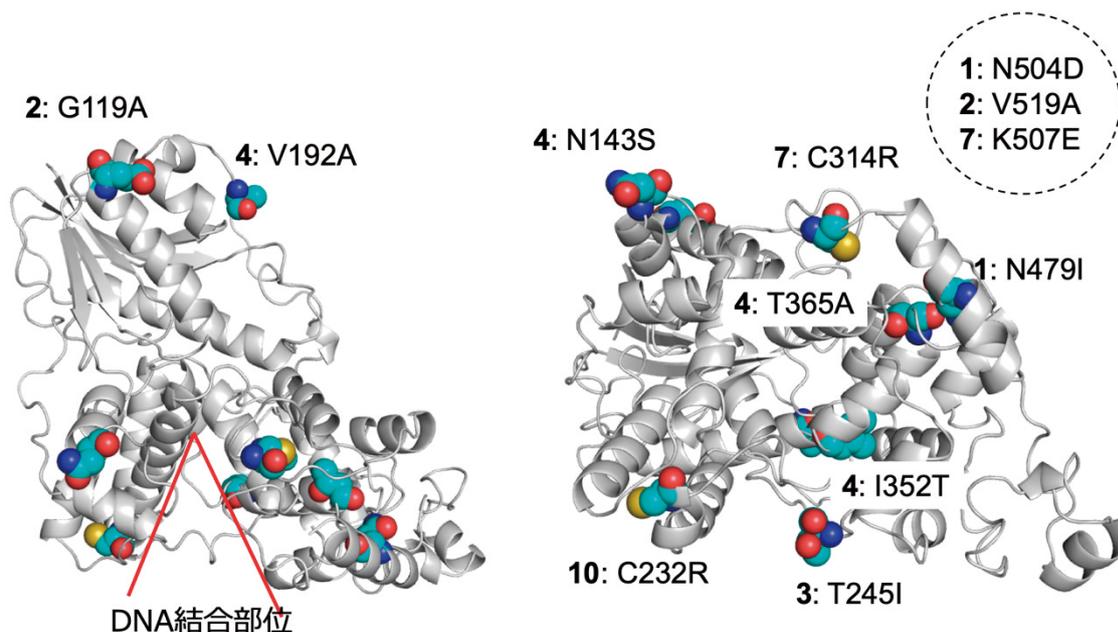


図4 Error-prone PCRにより変異導入されたXI64のアミノ酸

エントリー4においては、XI64遺伝子配列1545塩基のうち、4箇所の変異が確認された一方で、他のエントリーにおいてはそれよりも少ない変異導入数であった。また、変異導入によってアミノ酸変異が導入されない場合も多く見られ、エントリー6や9では、アミノ酸配列としてはXI64野生型と同一であった。図4に、導入された変異の場所を示す。

4. 考察

今回の変異導入では、主としてトランジション変異が起っており、アミノ酸の大幅な変化につながっていないことがわかった。より高度に変異導入することで、広範なライブラリ形成につながるため、別の手法による変異導入を試みる必要がある。また、今回のスクリーニングで得られた変異体のうち、エントリー4についてはDNA結合部位の近傍に2箇所の変異が導入されていることから、この配列を有するタンパク質を遺伝子組換え体として得、タンパク質の機能解析に供する価値がある可能性がある。一方で、本スクリーニングでは、XI64と機能的に変化がない場合においても生存コロニーとして得られたことから、スクリーニング法として改善の余地があると考えられる。今回はIn-fusion反応産物を直接SY2へと導入してスクリーニングに供する方法を採用したが、一度、別の大腸菌に導入後にプラスミドを回収してから、SY2株にてスクリーニングする方法も検討する必要がある。

以前の研究では、(6-4)光回復酵素のDNA結合部位の内部で損傷部位と直接相互作用するアミノ酸を置換することでCPD修復能を獲得できることを報告している⁶⁾。今

回導入されたアミノ酸の変異はDNA結合部位の周辺であり、損傷と直接相互作用するアミノ酸側鎖ではなかった。そのため、今後は変異導入を行う範囲を限定することで、より現実的な多機能酵素の開発につながると思う。

(引用文献)

- 1) Yamamoto, J., Plaza, P., Brettel, K., *Photochem. Photobiol.* **93**, 51-66 (2017).
- 2) Chigancas, V., Miyaji E. N., Muotri, A. R., Jacysyn, J. F., Amarante-Mendes, G. P., Yasui, A., Menck, C. F. M., *Cancer Res.* **60**, 2458-2463 (2000).
- 3) Stege, H., Roza, L., Vink, A. A., Grewe, M., Ruzicka, T., Grether-Beck, S., Krutmann, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1790-1795 (2000).
- 4) Schul, W., Jans, J., Rijksen, Y. M. A., Klemann, K. H. M., Eker, A. P. M., de Wit, J., Nikaido, O., Nakajima, S., Yasui, A., Hoeijmakers, J. H. J., van der Horst, G. T. J., *EMBO J.* **21**, 4719-4729 (2002).
- 5) Boros, G., Miko, E., Muramatsu, H., Weissman, D., Emri, E., Rozsa, D., Nagy, G., Juhasz, A., Juhasz, I., van der Horst, G., Horkay, I., Remenyik, E., Kariko, K., Emri, G., *J. Photochem. Photobiol. B* **129**, 93-99 (2013).
- 6) Yamada, D., Dokainish, H. M., Iwata, T., Yamamoto, J., Ishikawa, T., Todo, T., Iwai, S., Getzoff, E. D., Kitao, A., Kandori, H., *Biochemistry* **55**, 4173-4183 (2016).
- 7) Cadwell, R. C., Joyce, G. F., *Genome Res.* **2**, 28-33 (1992).
- 8) Suzuki, K. et al., *Nature* **540**, 144-149 (2016).