

植物スマートセルインダストリーを実現する 新規ゲノム編集ツールの開発



徳島大学 大学院
社会産業理工学研究部
刑部敬史



植物スマートセルインダストリーを実現する 新規ゲノム編集ツールの開発

Introduction

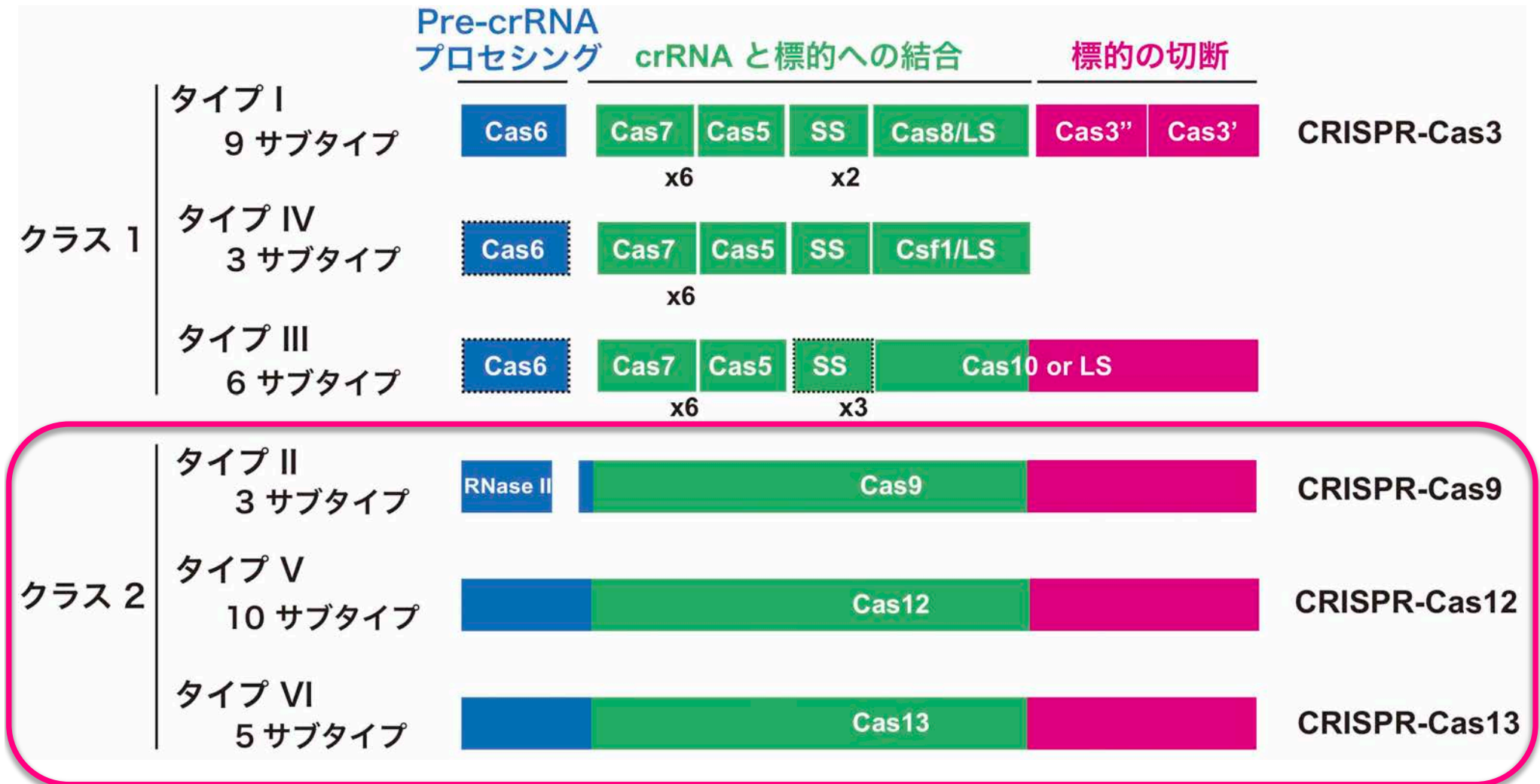
- ゲノム編集とは. これまでに開発されたツール. 活用方法 etc.

新規ゲノム編集ツール TiD の開発

- NEDOスマートセルプロジェクトで取り組んだ
新規ゲノム編集ツール開発の紹介.

主要なゲノム編集技術はクラス2 CRISPR

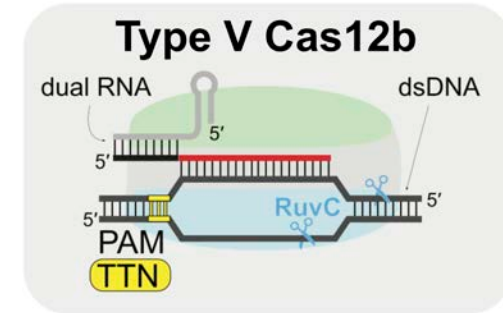
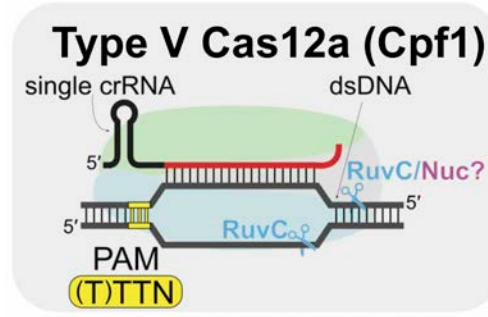
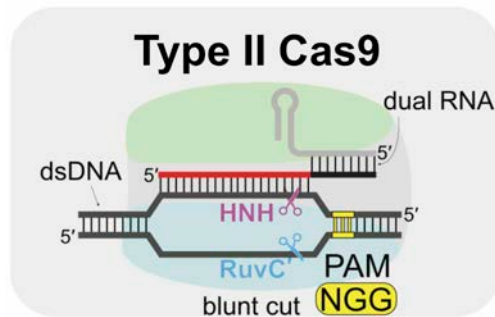
CRISPRシステムは、獲得免疫の応答に働くCasタンパク質の多様性から、6つのタイプに分類される。



クラス2のみゲノム編集技術として利用されてきた

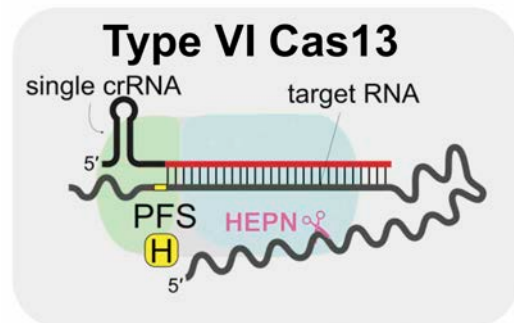
CRISPRクラス2によるゲノム編集ツールの開発は欧米主導

二本鎖DNAに作用するCRISPR

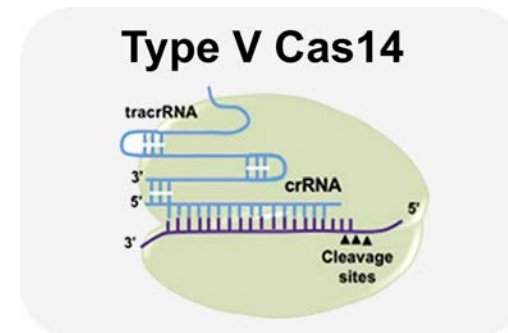


.. and Cas12c, 12d, and 12e

RNAに作用するCRISPR



一本鎖DNAに作用するCRISPR



Murugan et al., 2017

問題点：

これまで、CRISPR技術の基本特許はすべて欧米の技術であり、日本国内での産業利用ではライセンス契約等の課題がある。

NEDO: 新規ゲノム編集ツール開発および実用化プロジェクト

「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発/
植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」

徳島大
国産の新規ゲノム
編集技術の開発



H.28-R.2

新規ゲノム編集ツール TiD の
最適化と高活性化を進め、
植物における独自のゲノム改
変技術を確立する

明治大
(in silico解析/支援)

理研 / 近畿大
(分子モデル・構造解析・
分子機能改変)

スマートセル



「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発/スマートセル関連
技術の社会実装推進に向けて解決すべき新規課題の検討」
「ゲノム編集技術基盤開発」

H30.10-R1

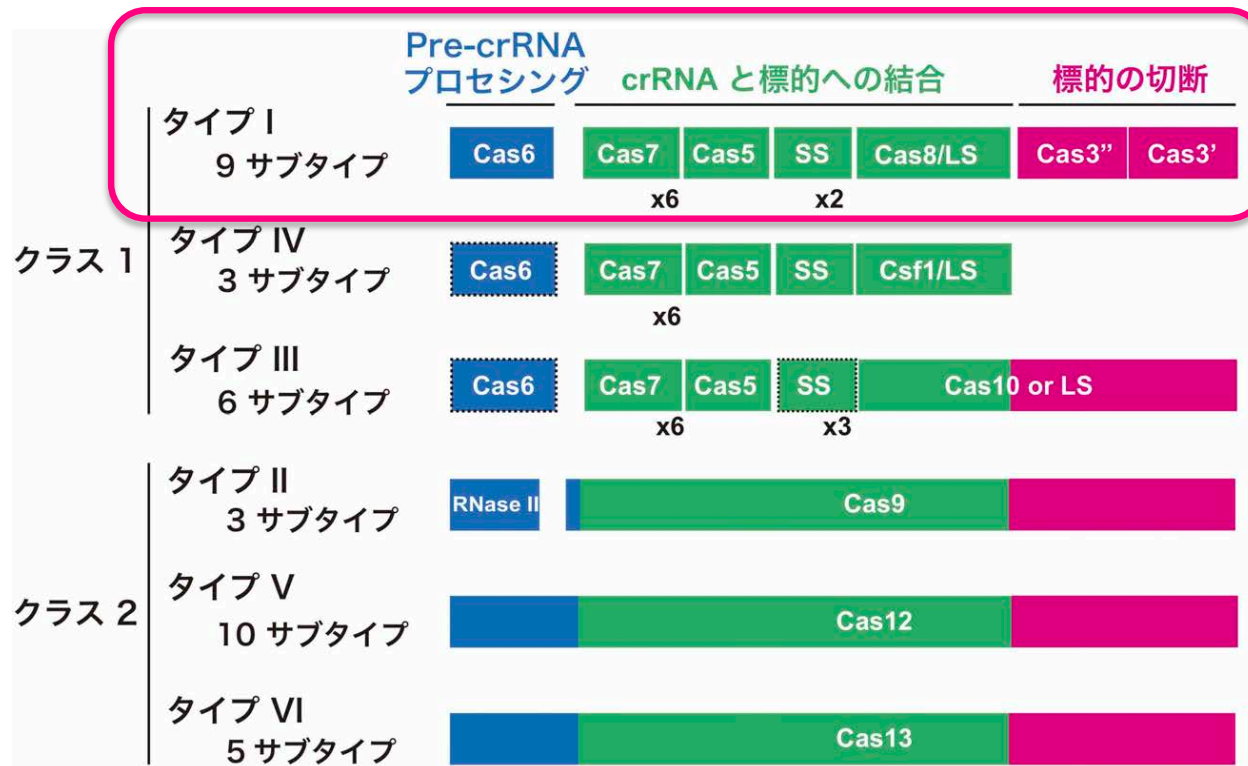
明治大学
webツール開発

徳島大 (植物実証)

– 新規ゲノム編集ツールTiDシステム –



微生物メタゲノムから新しいゲノム編集ツールを同定した

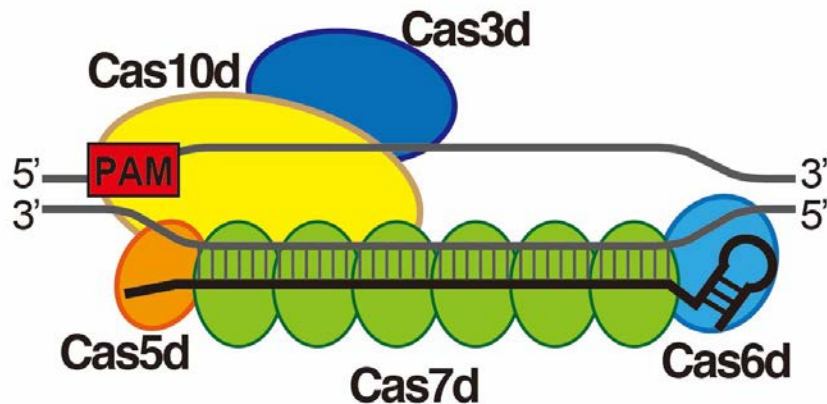


- CRISPR-Cas type Iのうち、
1. Cas9, Cas12, Cas3が利用するgRNA長よりも長いgRNAを持つシステムはあるか？
 2. 他 type には無い、ユニークなCasを含むシステムはあるか？
- に注目した。

機能未同定のCRISPR type I からCas9, Cas12, Cas3とは異なるヌクレアーゼシステムを持つ新規ゲノム編集ツールを同定し、その機能を明らかにした。TiDと命名した。



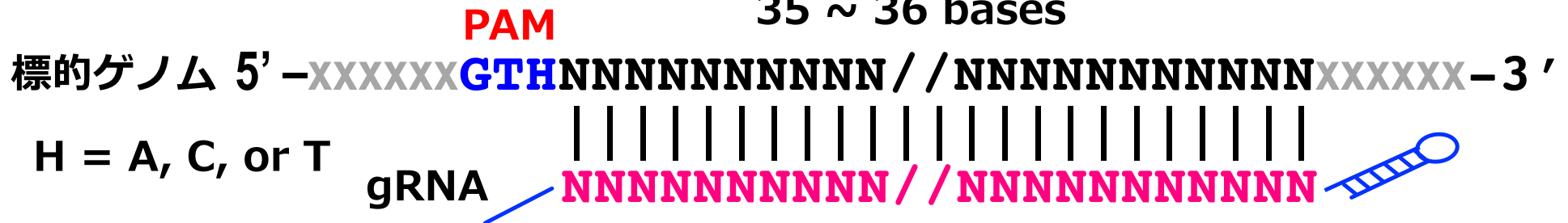
– 新規ゲノム編集ツールTiDシステムの特徴 –



CRISPR-Cas type I-D (TiD) の特徴

- 他type Iと異なり、Cas3のDNA切断因子を欠いている。
- 他type にはないCas10dが存在する。
- ゲノム編集に利用されているCRISPRと比較し、ガイドRNA長が長い。

35 ~ 36 bases



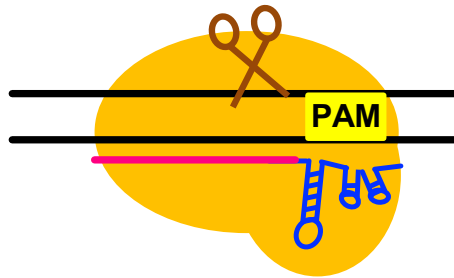
既存のツール, Cas9, Cas12a, Cas3と比べ異なる標的デザインが可能であり、長いgRNAを利用することで、標的特異性が高いことが期待できる。

Osakabe, K., et al. (2020) Comm Biol, 3, 648.

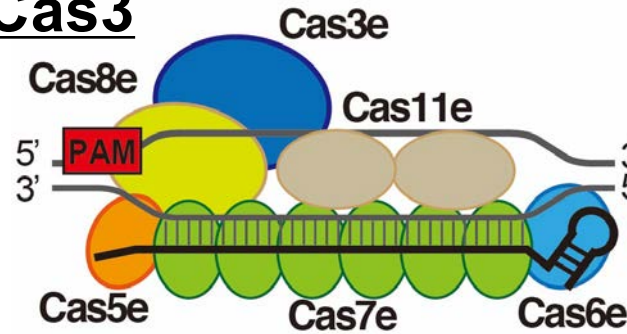
Osakabe, K. and Wada, N., et al. (2021) NAR, gkab348.

TiDは従来ツールと異なるDNA切断メカニズムを有する

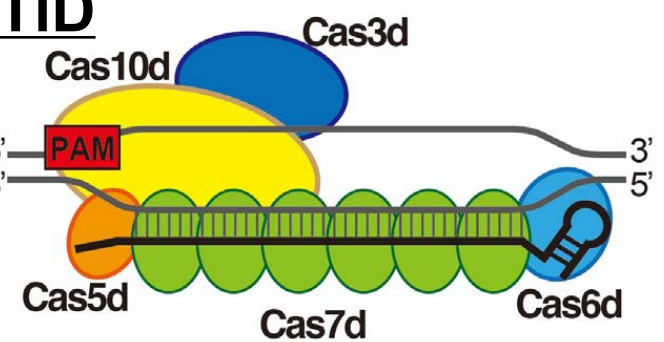
Cas9



Cas3

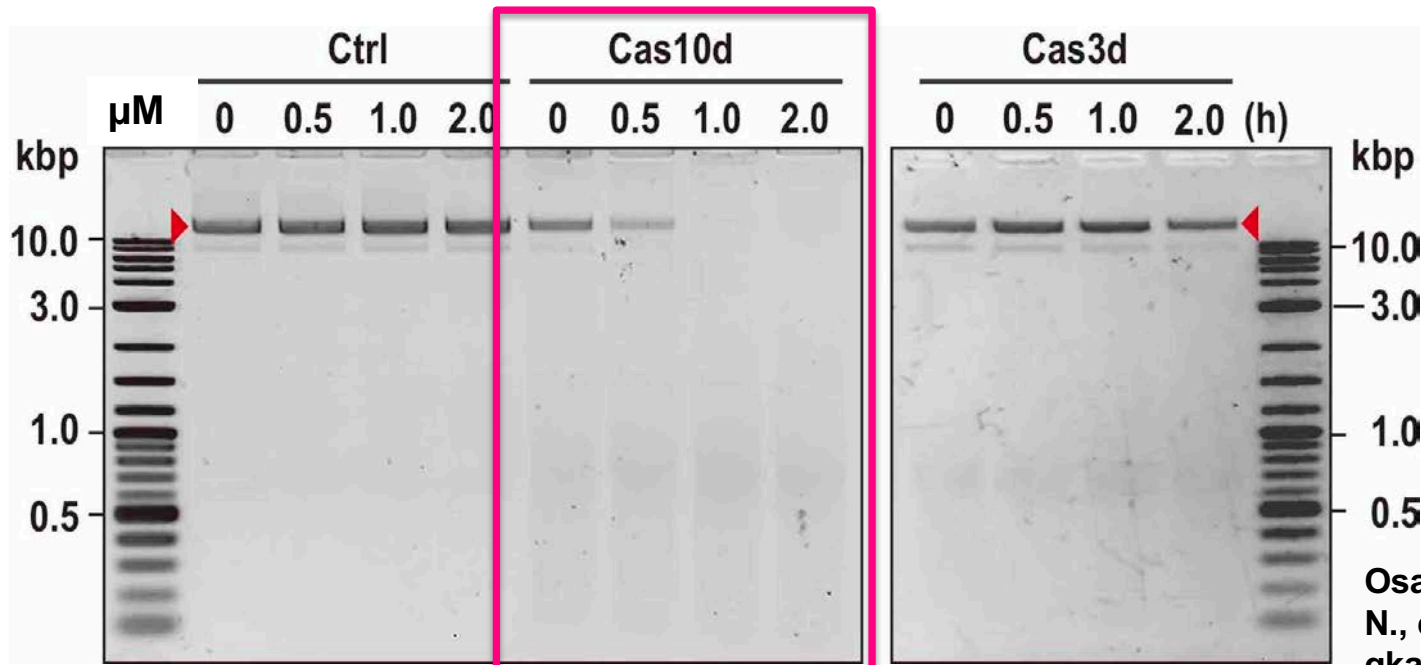


TiD



Cas10dは、他CRISPRシステムにない、TiDにユニークなCas因子である。

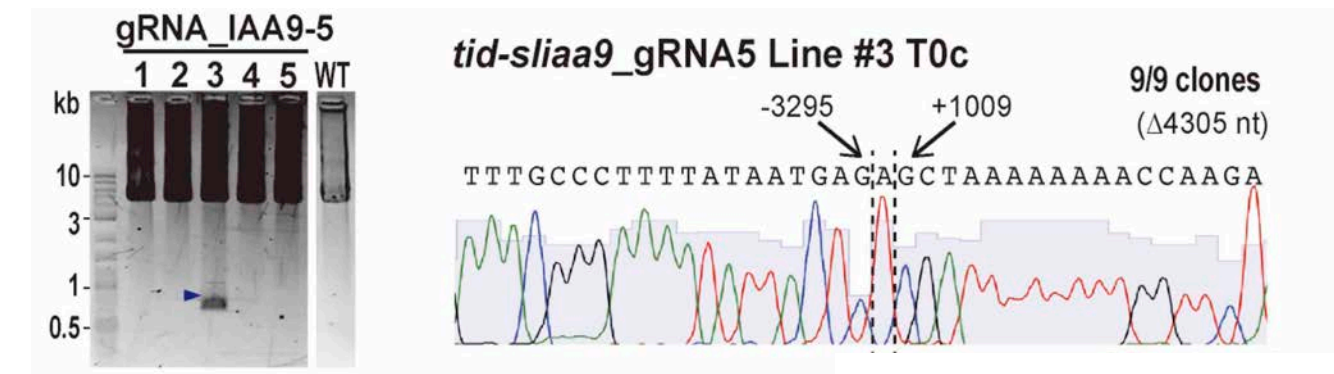
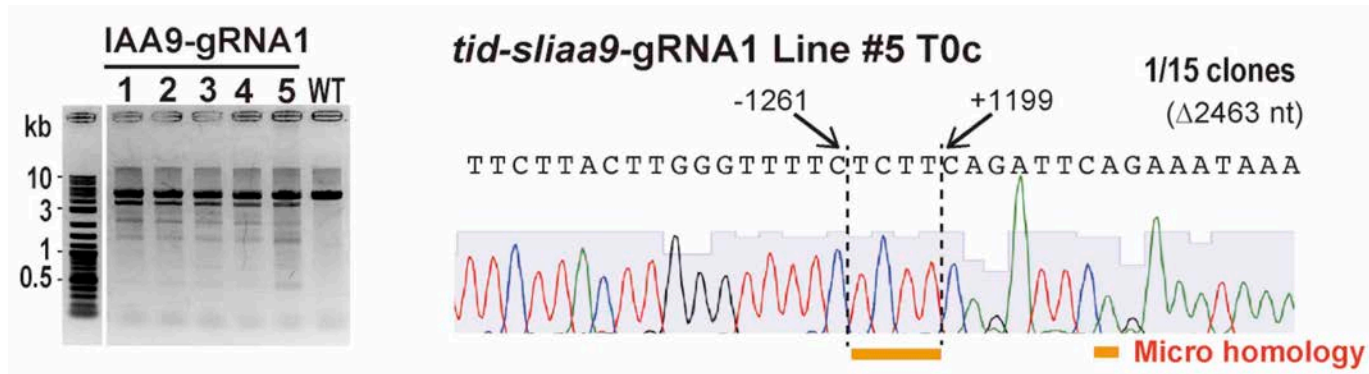
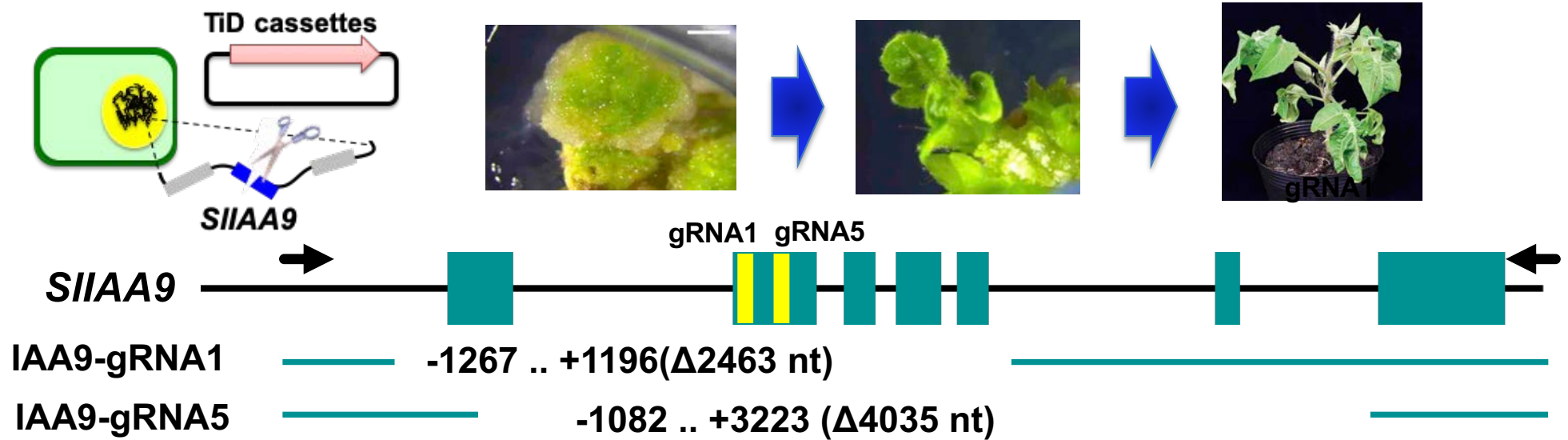
★ Cas10dのDNA切断活性の解析



Osakabe, K. and Wada, N., et al. (2021) NAR, gkab348.

Cas10dは、一本鎖DNA切断・分解活性を示した。

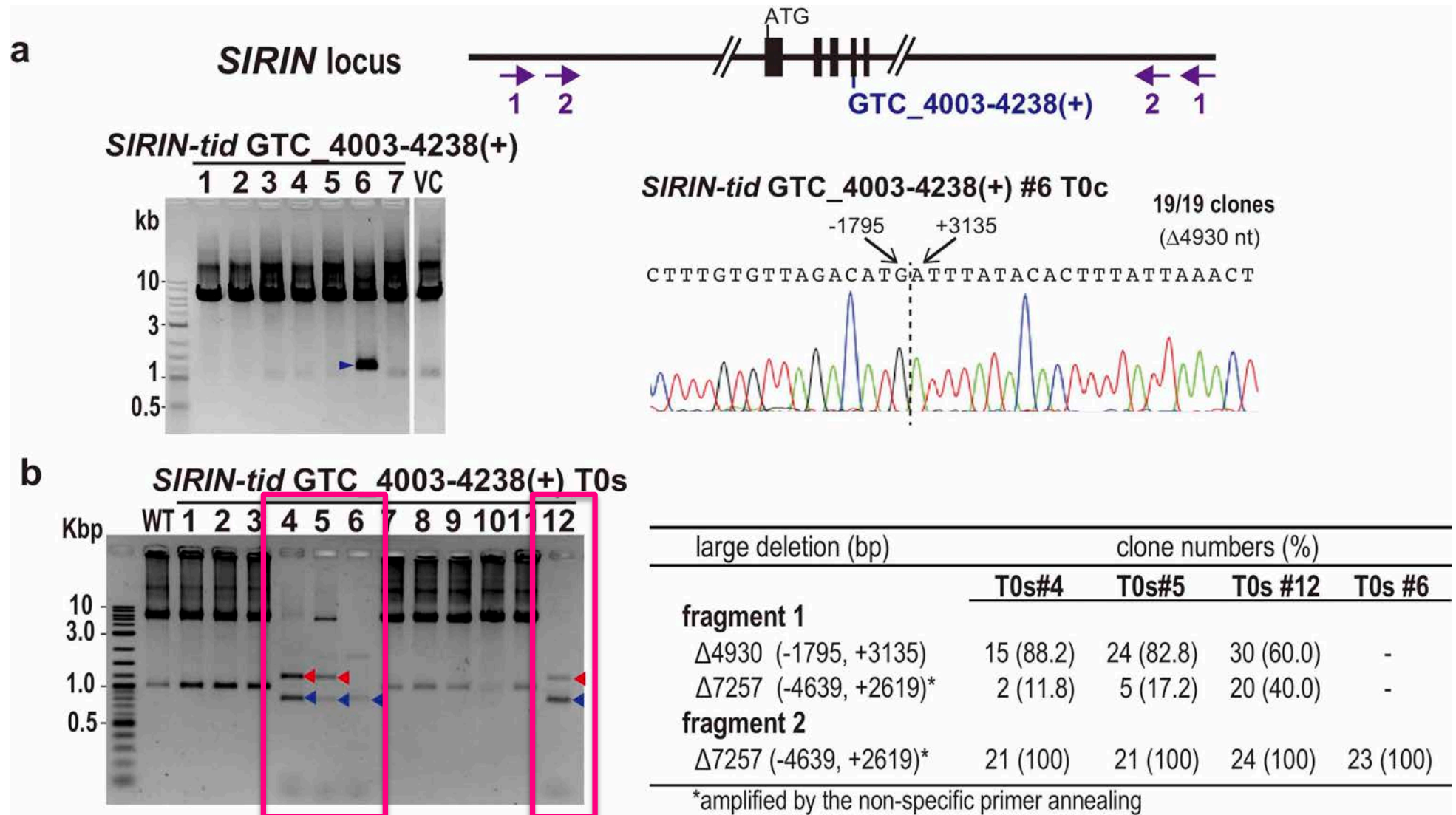
TiDによるトマト内在性ゲノム遺伝子を標的としたゲノム編集



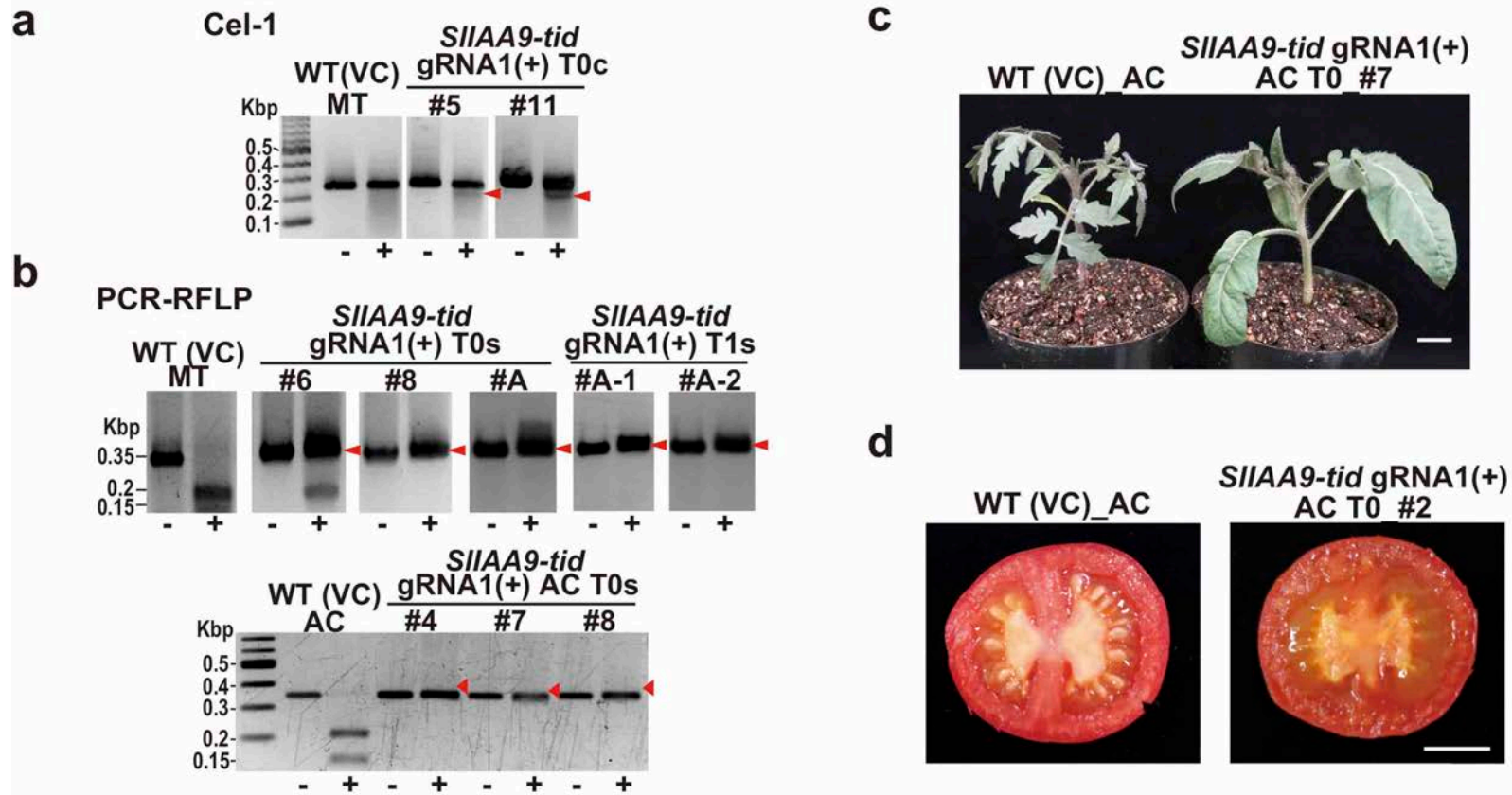
TiDは、Cas9と異なり、標的箇所に長鎖ゲノム欠失を引き起こす。

Osakabe et al (2020)
Comm Biol, 3, 648

TiDは標的配列に数kb以上の長鎖ゲノム欠失を引き起こす



TiDは標的部位にshort indelも誘導可能である



SIIAA9-1-tid MT T0s_#A

	WT	sequence clones
WT	...GGCAACGGAGCTCAGGCTCGGTCT-ACCTGGATCTCAGTCTCCCGAAAGAGGTGAGGAGAC...	
-2bp	...GGCAACGGAGCTCAGGCTCGGT---	1/16
+1bp	...GGCAACGGAGCTCAGGCTCGGTCTTACCTGGATCTCAGTCTCCCGAAAGAGGTGAGGAGAC...	15/16

SIIAA9-1-tid MT T1_#A-1

+1bp	...GGCAACGGAGCTCAGGCTCGGTCTTACCTGGATCTCAGTCTCCCGAAAGAGGTGAGGAGAC...	28/28
------	---	-------

SIIAA9-1-tid MT T1_#A-2

+1bp	...GGCAACGGAGCTCAGGCTCGGTCTTACCTGGATCTCAGTCTCCCGAAAGAGGTGAGGAGAC...	24/24
------	---	-------

Osakabe et al (2020) Comm Biol, 3, 648

bi-allelic変異(100%体細胞変異) を示す変異植物体の作出に成功.

TiD-IAA9ノックアウト植物個体のoff-target変異解析

SIIAA9-tid gRNA1(+)

off-target1 ch09_42659576

off-target2 ch02_35115698

5'-**GTC**TACCTGGATCTCAGTCTCCCGAAAGAGGTGAGGAG-3'

5'-**GTC**TACtTGatTaTtAGaCTCctGAAAGgGGTGAtGAG-3'

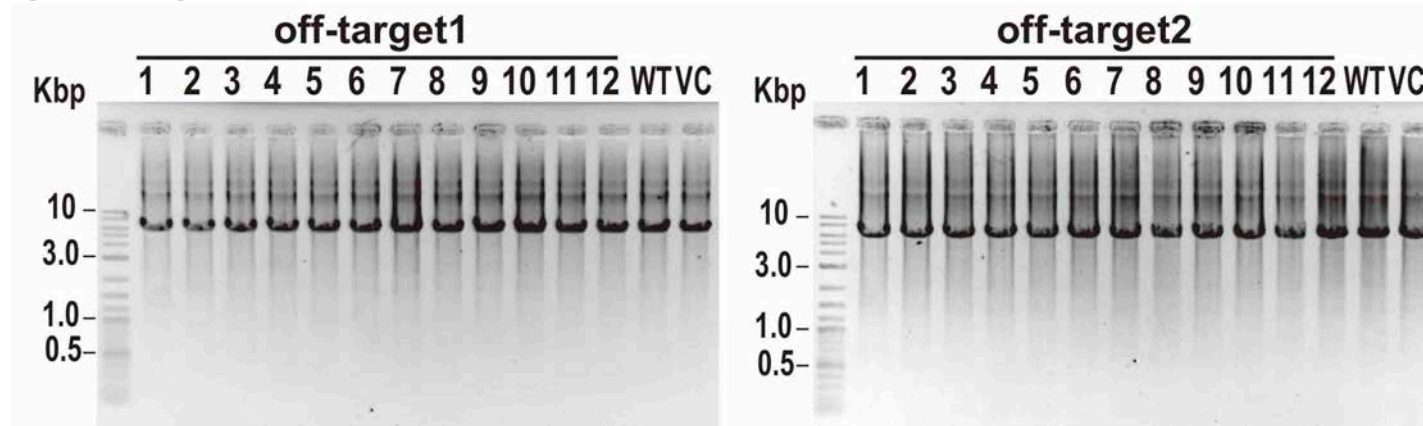
5'-**GTC**TA**a**TGGATCT**a**AGTC**g**CCGAG**g**CGAT**t**GT**c**AGG**g**G-3'

1) Short-range indelのNGS解析

Line No.	mutation efficiencies*	
	off-target1	off-target2
WT (AC)	543/43871 (1.24%)	783/67128 (1.17%)
<i>SIIAA9-tid</i> gRNA1(+) AC T0s_#1	579/55654 (1.04%)	756/72217 (1.05%)
<i>SIIAA9-tid</i> gRNA1(+) AC T0s_#2	465/47037 (0.99%)	633/63146 (1.00%)
<i>SIIAA9-tid</i> gRNA1(+) AC T0s_#4	280/34897 (0.80%)	80/7510 (1.07%)

*mutation efficiencies were calculated as mutation reads counts/total read counts.

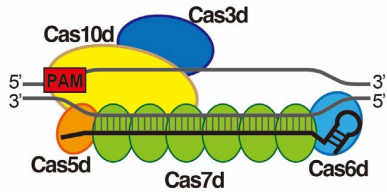
2) Long-range deletion解析



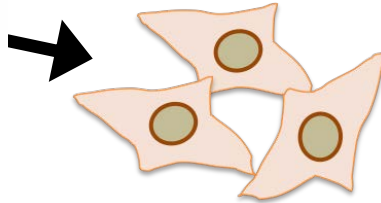
Osakabe et al (2020)
Comm Biol, 3, 648

*SIIAA9*の標的gRNAに対し、9-10塩基ミスマッチを示す類似配列ではほとんどoff-target変異が生じない。

TiDによるヒト培養細胞ゲノム編集

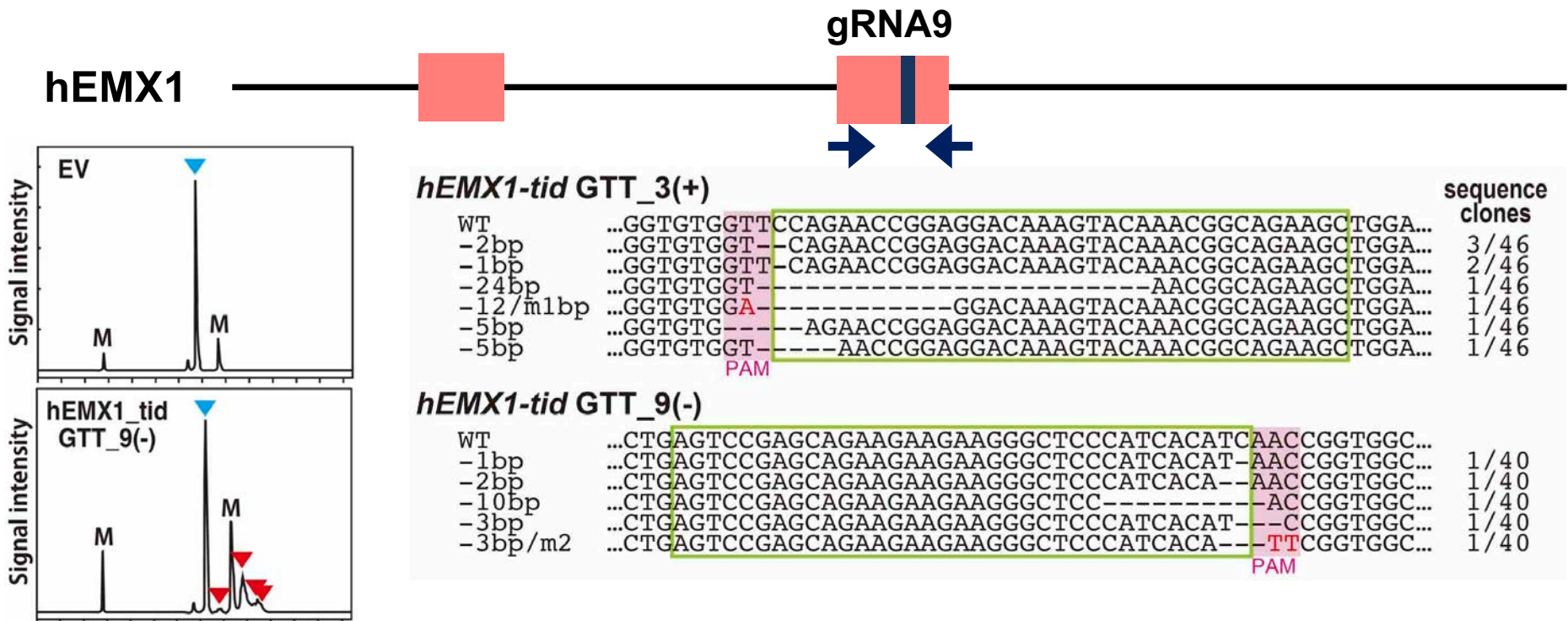


HEK293



Long-range mutation:
long-range PCR & sequencing

Short-range mutation:
Heteroduplex mobility assay & sequencing

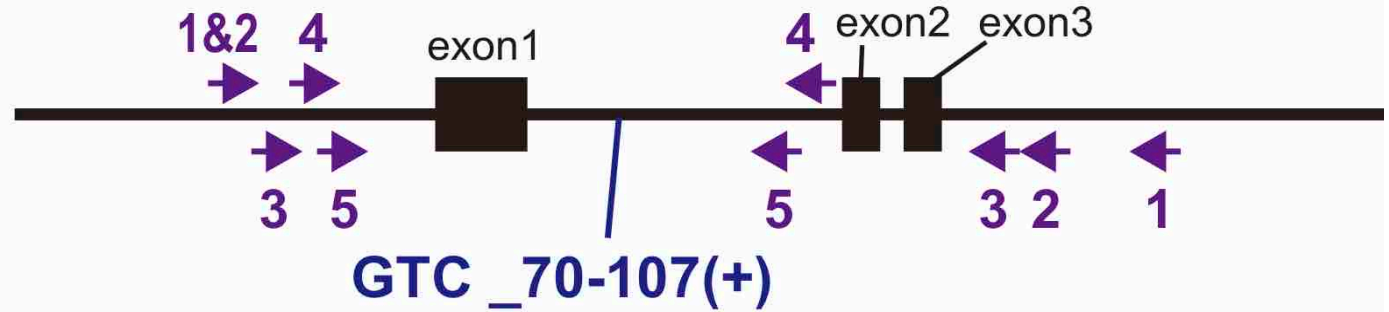


Osakabe, K. and Wada, N., et al. (2021) NAR, gkab348.

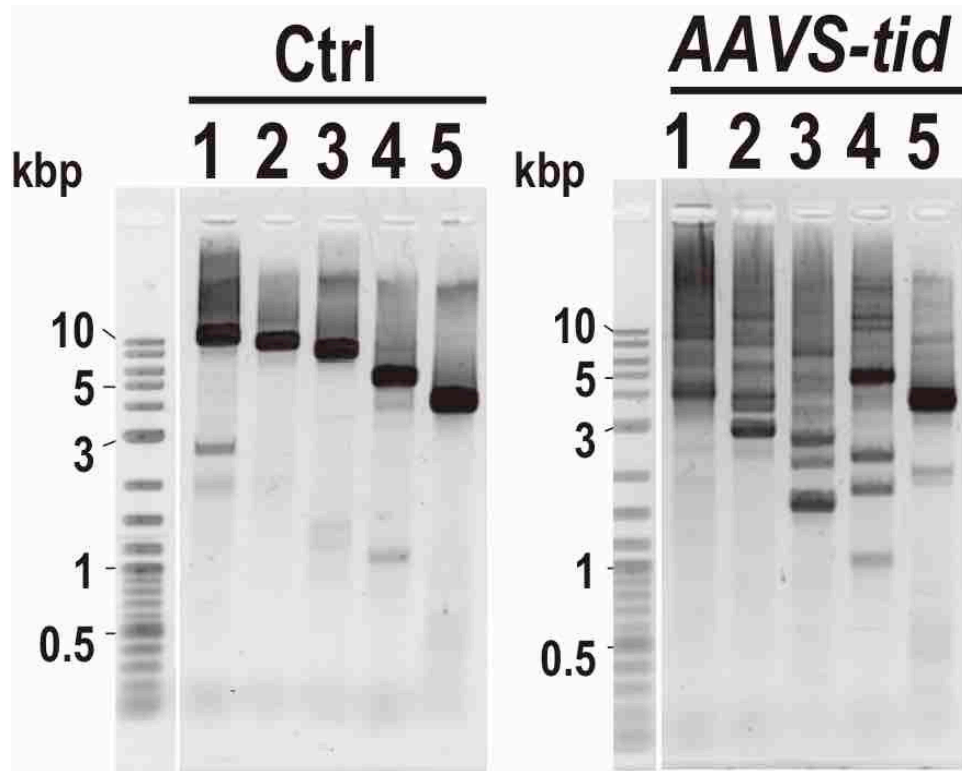
標的配列に短いin/del変異も起こす

TIDはヒトゲノムに長鎖ゲノム欠失変異を誘導する

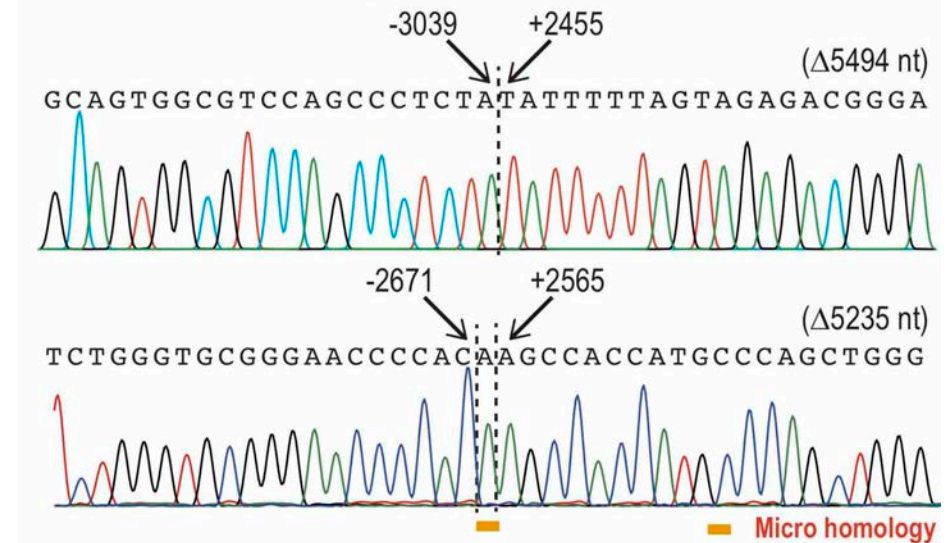
AAVS locus



ヒトAAVS遺伝子を標的として
長鎖塩基欠失を解析

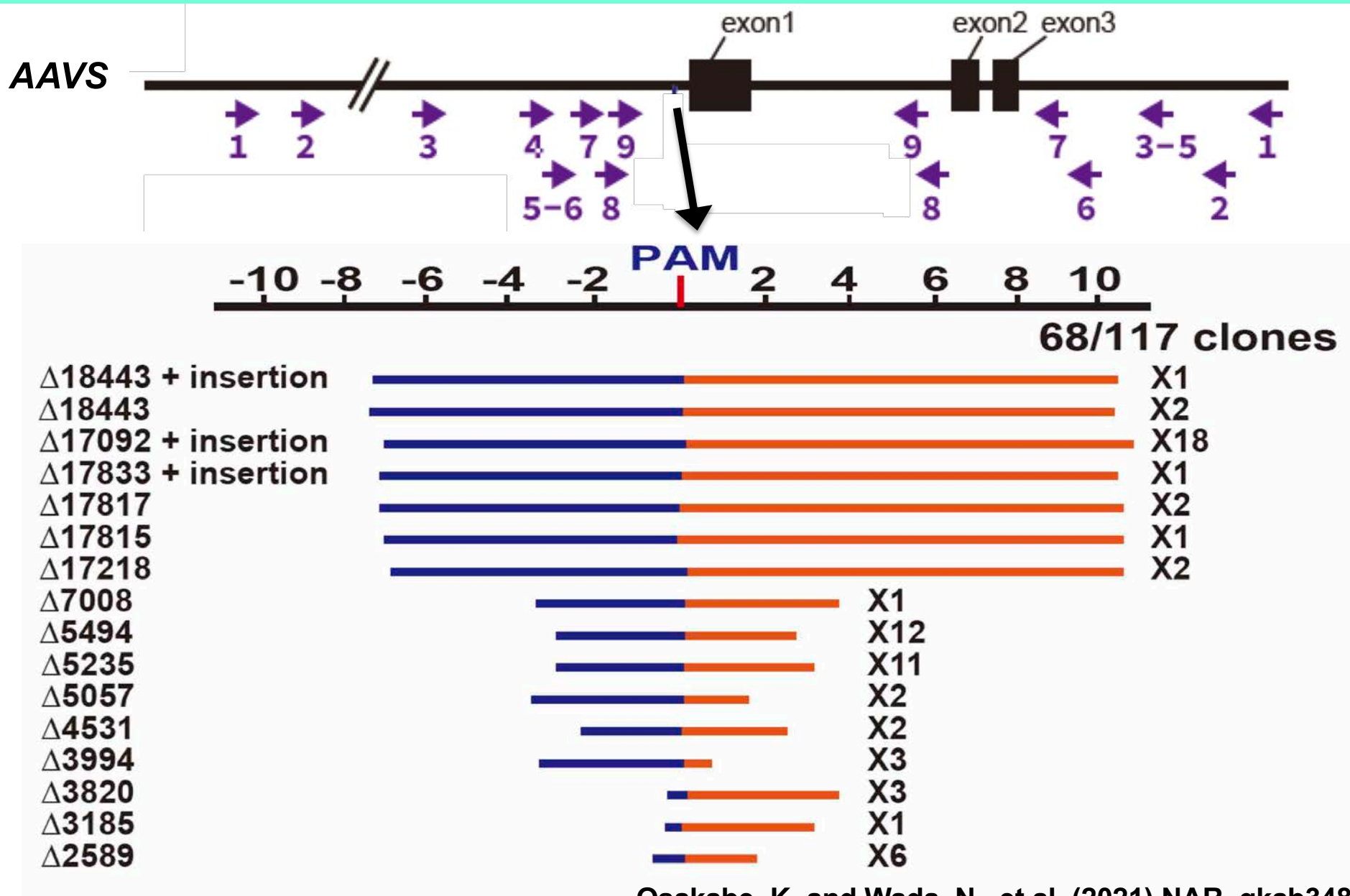


AAVS-*tid* GTC_70-107(+)



Osakabe, K. and Wada, N., et al. (2021) NAR, gkab348.

TIDはヒトゲノムに長鎖ゲノム欠失変異を誘導する

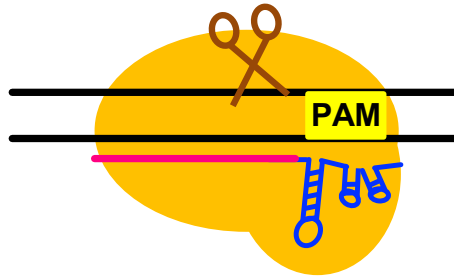


Osakabe, K. and Wada, N., et al. (2021) NAR, gkab348.

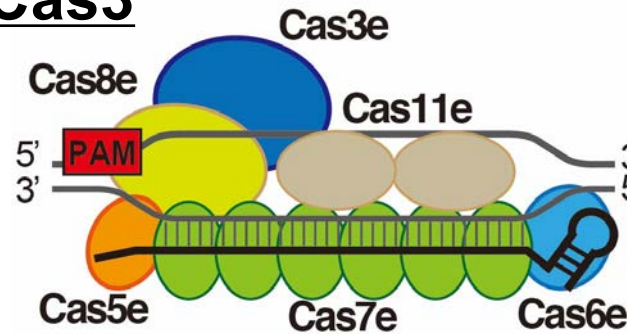
長鎖欠失は標的部位の上下流に両方向に生じる。

CRISPRシステムの比較: Cas9, Cas3 & TiD

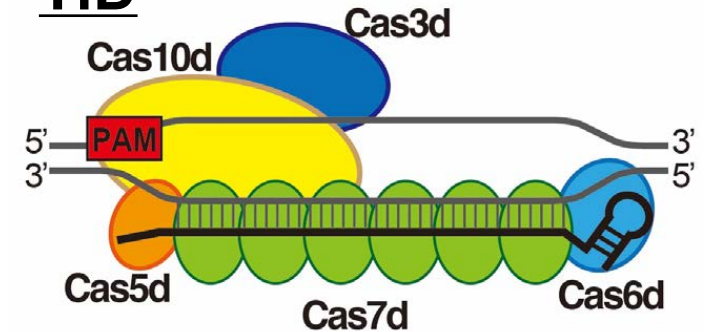
Cas9



Cas3



TiD



	Cas9 (class 2, type II)	Cas3 (class 1, type I-E)	TiD (class 1, type I-D)
ヌクレアーゼ	Cas9 (endonuclease)	Cas3e (helicase and nuclease)	Cas10d (helicase, nuclease)
gRNA	20-b	32-b	35- to 36-b
PAM	NGG	AAG, AGG	GTA, GTC, GTT
変異様式	短い塩基欠失／挿入	長鎖欠失(標的の5'側)	短い塩基欠失／挿入＋長鎖欠失(双方向)
特異性 (Off-target リスク*)	非常に多い	Cas9に比べ少ない	最も少ない

***Off-target リスク:** ゲノム上に見出される on-target に対するすべての off-target 部位を in-silico 抽出すると、**0塩基-5塩基のミスマッチを示す各 on-target それぞれの類似配列総数は、**

Cas9 >> Cas3 > TiD

まとめ

新規ゲノム編集ツールの開発

1. 微生物メタゲノムより機能未同定のCRISPR **TiDシステム**を見出し、ゲノム編集ツールに成功した。
2. TiDは従来ツールと異なる標的認識、切断メカニズムを有し、多様な変異導入が可能である。

展望:

TiDの変異効率と汎用性を向上させ、実用化技術として生物機能改変や医療技術として発展させる。

TiDの応用範囲を広げるため、各種機能性ツール化を進めたい。

