

Target-AID による多重ノックアウト個体作製デザインを支援する KOnezumi-AID の開発

滝 大斗 (筑波大学生物学類)

指導教員: 水野 聖哉 (筑波大学医学医療系)

【背景・目的】

CRISPR-Cas9 がゲノム編集ツールとして確立されて以来、遺伝子改変マウスの作製速度は飛躍的に向上している。International Mouse Phenotyping Consortium の報告によれば、2021 年時点でタンパク質コード遺伝子のおよそ半数にあたる 11,241 の遺伝子において、ノックアウト (KO) マウスが作製されており [1]、その数は現在も増加を続けている。近い将来、マウスの単一遺伝子の KO 解析が完了すると予測されており、その後は複数遺伝子の同時 KO が重要な課題となると考えられる。

しかし、Cas9 による変異導入は、DNA の二本鎖切断が引き金となり、数千塩基対に及ぶ大規模な欠損が発生するリスクがある。複数遺伝子を標的とした場合、そのリスクはさらに増大する。この問題に対処するため、DNA の二本鎖を切断することなく塩基編集を行う塩基編集エフェクター、特に Target-AID に着目した。シトシン (C) をチミン (T) に置換することができる塩基編集エフェクターの一種である Target-AID は、プロトSpacer隣接配列 (Protospacer Adjacent Motif; PAM) 上流の 17-19 塩基対 (ターゲットウィンドウ) に特異的な C to T の点変異を導入できる [2]。また、他の塩基編集エフェクターには RNA を編集するオフターゲット効果が確認されているのに対し、Target-AID はそのリスクが低い。そのため、複数遺伝子の同時編集においてより安全性が高い。

しかし、CRISPR-Cas9 のように guide RNA (gRNA) 設計を支援するツールが充実していないため、Target-AID を用いた実験デザインには障壁があった。そこで本研究では、実験デザインの複雑さを軽減し、時間を短縮するために、KO したい遺伝子シンボルの入力で gRNA 設計が可能となるシステムである、KOnezumi-AID の開発を目的とした [3]。

【材料・方法】

1. データセット

本研究で使用したすべてのゲノムデータは UCSC Genome Browser からダウンロードした [4]。マウスおよびヒトのリファレンスゲノム配列と refFlat アノテーションデータは、GRCm39/mm39 (GCA_000001635.9) および GRCh38/hg38 (GCA_000001405.29) である。本研究では、RefSeq ID が 'NR' で始まる転写産物を非タンパク質コード転写産物、1 つの遺伝子シンボルに対して同じ RefSeq ID を持つ転写産物を重複転写産物、染色体情報列に '_alt'、'_random'、'_fix'、'_Un' の接尾辞を含む転写産物代替アセンブリと定義し、gRNA の設計対象から除いた。

2. KOnezumi-AID の KO 戦略

単一エクソン遺伝子に対してはコーディング領域 (coding sequence; CDS) 50% 以上の破壊を KO と定義し [5]、前半 50% 以内に未成熟終止コドン (premature termination codon; PTC) を誘導する gRNA を候補とした。複数エクソンを持つ遺伝子については、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (nonsense-mediated mRNA decay; NMD) を引き起こすことが可能な位置に PTC を誘導するような gRNA を候補とした。

3. KOnezumi-AID の gRNA 設計

KOnezumi-AID は 2 つの gRNA 設計戦略を持つ。1 つ目は CAG, CGA, CAA コドンの 'C'、または TGG コドンの 'G' の逆鎖の 'C' を編集することで PTC を誘導する。2 つ目はスプライシング部位に存在する高度に保存された GT-AG ルールに従う 2 塩基を破壊することによってスプライシング異常を引き起こし、フレームシフト変異を引き起こすことを目的とした gRNA の設計を行った。

【結果】

KOnezumi-AID の開発によって編集対象とする遺伝子シンボルを入力するだけで、KOnezumi-AID の KO 戦略に基づいた gRNA を設計することが可能となった。また、KOnezumi-AID の KO 戦略において、Target-AID が 83.2% のマウス遺伝子を標的とできることが示された。標的となった遺伝子と標的とならなかった遺伝子について比較したところ、CDS の長さやエクソンの個数が有意に少ないことがわかり、その特徴を持つ遺伝子が標的とできない遺伝子である可能性が高いことを示唆した。加えて、1 遺伝子あたりの実行時間は、KOnezumi-AID で検索対象となった遺伝子全体の 89.4% である 18,536 遺伝子に対して 2 秒未満で処理が完了した。一方、10 秒以上を要したのはわずか 113 遺伝子で、最も長い処理時間は 144 秒であった。また、実行時間とその遺伝子がつターゲットウィンドウに 'C' を含む配列の総数との間にはピアソン相関係数が 0.87 と高い相関が認められた。

さらに、KOnezumi-AID の gRNA 設計戦略はマウスに限らずヒトや植物など他の生物種への応用が可能である。これを踏まえ、ヒトゲノムを用いて KOnezumi-AID の KO 戦略に従った gRNA が設計可能な遺伝子数を検証した。その結果、マウスと同様の傾向が観測され、検索対象となった 19,073 遺伝子の内 81.6% が gRNA を設計できることが示された。これにより KOnezumi-AID のヒトゲノムデータへ適用できることが示された。

Target-AID の高い PTC 誘導性は Target-AID が多遺伝子同時 KO の有力な選択肢となることを示唆し、KOnezumi-AID の使用の容易さはその編集デザインを効率的に行えることが示された。

【展望】

KOnezumi-AID が対象とする塩基編集エフェクターは Target-AID のみであり、現状では 17% の遺伝子に対する gRNA の設計ができない。これに対して、他の塩基編集エフェクターを用いることや PAM 配列を NGG から NG を認識できるようにした Target-AID-NG を用いることで編集ができる可能性がある [6]。KOnezumi-AID はこれらの塩基編集エフェクターに対応するための更新が望まれる。

【参考文献】

- [1] Birling M.-C.; et al. *Nat. Genet.* **2021**, 53, 416–419
- [2] Nishida K.; et al. *Science* **2016**, 353, aaf8729
- [3] Taki T.; et al. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25, 13500
- [4] Raney B.J.; et al. *Nucleic Acids Res.* **2024**, 52, D1082–D1088
- [5] Skarnes W.C.; et al. *Nature* **2011**, 474, 337–342
- [6] Nishimasu H.; et al. *Science* **2018**, 361, 1259–1262