

タイプI CRISPRを用いたゲノム編集技術

吉見 一人

1. はじめに

ゲノム編集技術は、さまざまな生物種や細胞種のゲノムを操作するためのツールである。そのコアとなる機能は、細胞ゲノム内の狙ったDNA配列を認識・結合して二本鎖DNA切断を導入することで定義される。切断された部位ではDNA修復が生じるが、その過程で変異が導入されてゲノム配列が改変される。2013年にCRISPR-Cas9システムが真核細胞のゲノム編集に利用できることが発表されると、その効率と利便性の高さから、急速に世界中で利用されるようになった。その功績により、2020年にEmmanuelle Charpentierと、Jennifer A. Doudnaが「CRISPR-Cas9によるゲノム編集」によりノーベル化学賞を受賞したことは記憶に新しい。その後も注目度は高まり続けており、2022年にNature誌が選んだ注目すべき七つのテクノロジーのうち、「正確なゲノム操作」、「標的遺伝子治療」、「CRISPR診断」と、CRISPRを用いた技術が実に三つも選ばれている¹⁾。

ゲノム編集技術は、細胞やモデル動物を用いて生命現象を解明するといった基礎研究だけでなく、さまざまな分野において社会実装に向けた応用が展開されている。工業分野では、高機能性物質を効率的に産生する微生物や動物など新しいバイオリアクターの開発、農林水産分野ではさまざまな生物の品種改良などに利用されている。医療分野では、iPS細胞や免疫T細胞などを用いた*ex vivo*遺伝子治療、体内に直接ゲノム編集ツールを導入する*in vivo*遺伝子治療が進んでおり、すでに治験も行われている。ゲノム編集技術だけでなく、CRISPR-Casの標的配列特異性を生かした核酸検出法であるCRISPR診断技術も進化しており、予防医学における重要な早期診断ツールとして期待されている。本稿では、新しいゲノム編集技術として注目されているクラスI CRISPRに焦点を当て、その概要と応用につい

て紹介する。

2. CRISPR-Casシステムの分類

CRISPR-Casシステムは、細菌・古細菌ゲノムから発見された、外敵となるウイルスやファージなどに対する獲得性免疫システムである(図1)。分類学上、クラスIとクラスIIに大別され、さらにそれぞれ三つのタイプ(タイプI, III, IVおよびタイプII, V, VI)に細分される²⁾。クラスI CRISPRは複数のタンパク質因子で狙った配列を分解するのに対し、クラスII CRISPRは単一のタンパク質で標的配列を認識する点で異なる。

クラスII CRISPRシステムは、単一タンパク質でゲノム編集を誘導できるため、取り扱いが容易であり、サイズも小さく標的細胞への送達もしやすい特徴がある。そのため、CRISPR-Cas9やCRISPR-Cas12aをはじめとして、クラスII CRISPRが主なゲノム編集技術として広く用いられている。他にも、RNA編集に用いられるCRISPR-Cas13(タイプVI)、小型のCRISPR-Cas12fやCRISPR-Cas12J(タイプV)など、さまざまな新規ゲノム編集技術がクラスII CRISPRから同定されている。

しかし微生物の世界では、約90%の細菌とほぼ100%の古細菌がクラスI CRISPRを有しており、クラスI CRISPRがメジャーである。これらのクラスI CRISPRは、標的核酸や機能の違いによって三つのタイプ(タイプI, III, IV)に分類され、DNAを標的とするタイプI CRISPRは最も広く獲得性免疫に利用されている。このタイプI CRISPRは、crRNAと複数タンパク質因子からなるCascade複合体が標的配列を認識して結合し、そこへリクルートされるCas3エンドヌクレアーゼタンパク質が標的DNAを切断する。

クラスI CRISPRシステムは、複数因子を制御する必要があるため、真核細胞での利用が難しく、ゲノム編集技術としての応用はあまり進んでいなかった。2019年、我々はcrRNA前駆体を用いてヒト細胞内でCascade複合体形成反応をさせることにより、真核細胞でのゲノム編集に成功した³⁾。同時に他のグループもクラスI CRISPRによるヒト細胞でのゲノム編集を報告しており⁴⁾、微生物叢や真核細胞におけるゲノム、エピゲノムの編集ツールとしても台頭してきている^{5,6)}。さらに、クラスI CRISPRは二本鎖DNAの標的認識後に非特異的な一本鎖DNA切断も示すこ

東京大学医科学研究所実験動物研究施設先進動物ゲノム研究分野(〒108-8639 港区白金台4-6-1)

A novel genome editing technology with a type I CRISPR system
Kazuto Yoshimi (Division of Animal Genetics, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan)

本論文の図版はモノクロ(冊子版)およびカラー(電子版)で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950818

© 2023 公益社団法人日本生化学会

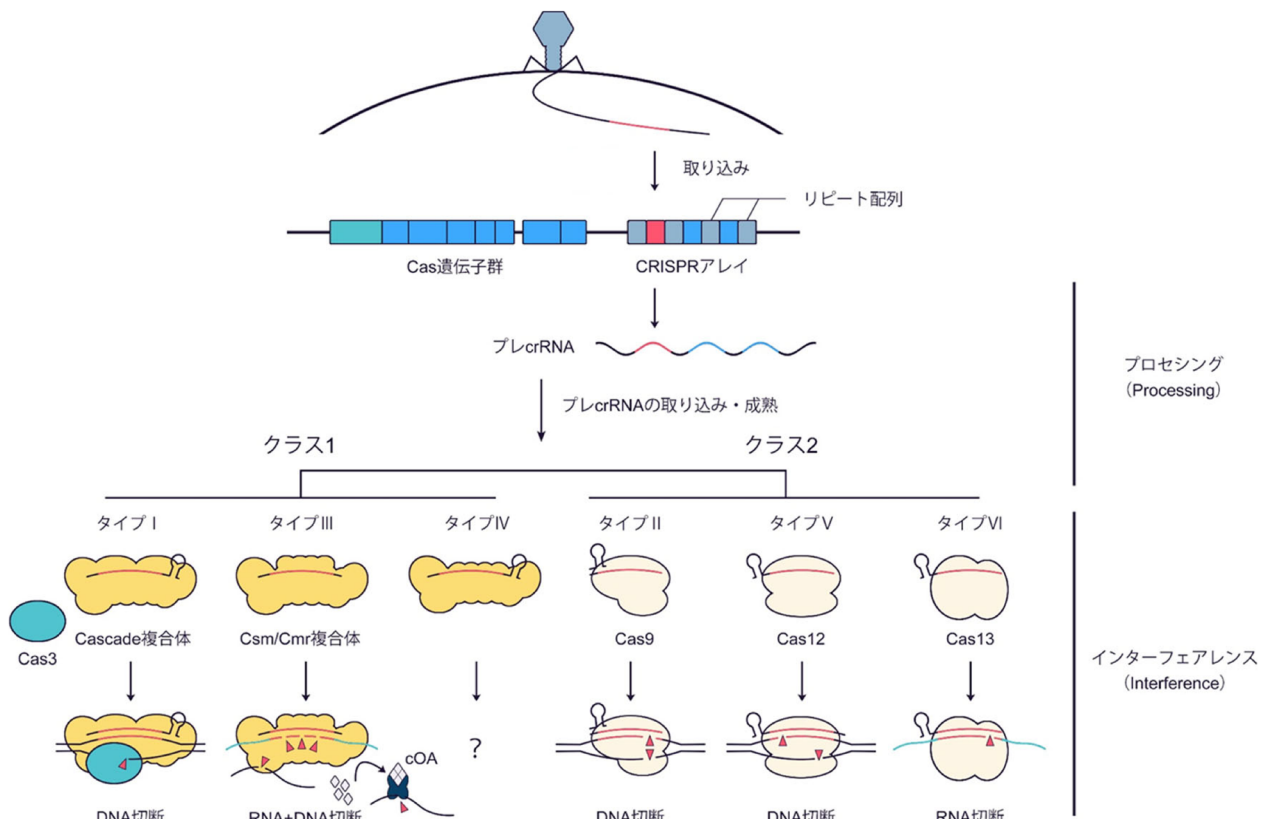


図1 CRISPR-Cas システムの概要と分類

とが明らかになり、Cas12と同様にCRISPR診断にも利用されつつある^{7,8)}。

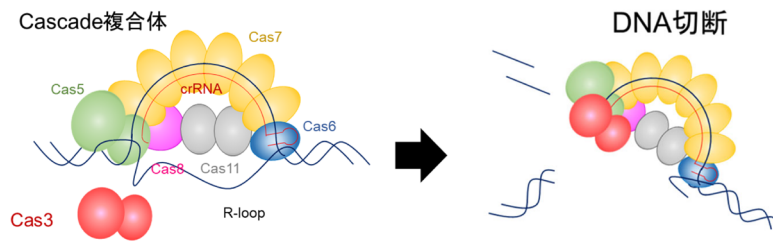
3. タイプ1 CRISPRシステムによるゲノム編集

2019年、我々は大腸菌由来のクラス1に属するタイプI-E CRISPR-Cas3がヒト細胞においてゲノム編集技術として利用できることを明らかにした(図2)³⁾。興味深いことに、CRISPR-Cas3が導入する変異パターンは、標的認識に必要なプロト Spacer 隣接 (PAM) 配列の上流側に数百から数千塩基ほどの大きな欠失変異を導入するというものであった。その分子機構を詳細に検討した結果、Cas3タンパク質が、ヌクレアーゼドメインの他に、DNAをほどくヘリカーゼドメインも持ち、二本鎖DNAをほどきながらDNAを切断することが明らかになった⁹⁾。別の研究グループから、好熱性放線菌由来のタイプI-E CRISPR-Cas3も真核細胞においてゲノム編集技術として利用できることが報告され、こちらもPAMの上流側に変異が分布し、欠失パターンも数百から最大10万塩基の範囲であることが示された⁴⁾。これは、主に標的部位に1から数十塩基程度の小さな変異を導入するCRISPR-Cas9と大きく異なる。

タイプ1 CRISPR特有の大規模欠失は、遺伝子を安全かつ確実に破壊する新しいゲノム編集技術として応用できる

可能性を示している。たとえばCRISPR-Cas9は、標的領域全体で二つのガイドRNA (gRNA) を使用することで大規模欠失を誘導する方法が示されているが、二つのgRNAを用いることで、オフターゲット変異や切断部位間のインバージョン変異などの予期しない変異のリスクが高まる可能性がある。一方で、一つの標的配列だけで大規模欠失を誘導できるタイプ1 CRISPRは、こうしたリスクを低減し、遺伝子破壊に特に有用であると期待されている。

また新規ゲノム編集技術を社会実装するためには、その手法が安全であり、ゲノム中の類似配列であるオフターゲット候補領域に影響を与えないことが重要である。その点、タイプI-E CRISPRのCascade複合体は、PAM配列とその下流27塩基部分を認識して結合する特徴を持つ(実際には32塩基と結合するが、タンパク質の構造上認識できない部位が6塩基ごとにある)。これは、CRISPR-Cas9の標的配列長である20塩基、CRISPR-Cas12の標的配列長である24塩基に比べて長いため、標的配列の認識特異性がより高いことが予想される。一般に、塩基のミスマッチ数が少ない類似配列は誤って認識されやすく、変異が入りやすいことから、オフターゲット候補とされている。実際にヒトゲノムにおいて、Cas9システムは、通常2~3ミスマッチから*in silico*解析で検出され、できるだけこうした領域の少ない標的配列を選択する必要がある。一方、タ



	CRISPR-Cas3	CRISPR-Cas9
分類	クラス1 (タイプ I)	クラス2 (タイプ II)
DNA認識	Cascade複合体 (Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas11)	Cas9
DNA切断	Cas3 (ヌクレアーゼ+ヘリカーゼ)	Cas9 (ヌクレアーゼ)
PAM配列	AAG (+ ATG, TAG, AAC, GAG, AGG)	NGG
認識配列	27塩基	20塩基
変異パターン	大規模欠失 (数百~数千塩基)	挿入・欠失変異 (数~数十塩基)

図2 CRISPR-Cas3とCas9との比較

タイプI CRISPR システムでは、ヒトゲノムの *in silico* 解析で2~3 ミスマッチのオフターゲット候補が検出される頻度はかなり低く、5~6以上のミスマッチ領域が検出されることが多い。実験的にも、タイプI CRISPRは、3個のミスマッチ領域ではほとんど変異が導入されないことが示されており、安全性は非常に高いことが期待されている。

4. CRISPRによるゲノム編集と医療応用

CRISPR-Cas9という代表的なゲノム編集技術は、登場してからすでに10年が経過しており、医療分野では遺伝子治療薬の一つとして開発が進んでいる。治療戦略としては、体外へ細胞を取り出してゲノム編集し、再び体内に戻す *ex vivo* 遺伝子治療と、体内の細胞を直接ゲノム編集する *in vivo* 遺伝子治療がとられている¹⁰⁾。特に血液系の疾患は *ex vivo* 治療の主な対象とされ、HIV感染症、鎌状赤血球症、 β サラセミアなどではゲノム編集治療の治験が進められている。また、キメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) T細胞を用いたがん免疫療法とゲノム編集との融合が期待されており、具体的にはT細胞へのCARの効率的導入法や、T細胞のユニバーサル化などにゲノム編集が利用されている。

in vivo 治療において、最近では遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス (hATTR) の第1相試験において、治療効果が期待される結果が報告された。6人の患者に対して、TTRを標的としたCRISPR-Cas9を脂質ナノ粒子で単回投与した結果、血中の異常TTRタンパク質の発現が平均87%減少したことが確認された¹¹⁾。このように、ゲノム編集を用いた遺伝子治療はすでにヒトでの安全性検討の段階

まで進んでいる。

一方でタイプI CRISPRについてはまだ発展途上の技術であり、医療応用はこれまでに報告されていない。しかし、CRISPR-Cas9とは異なり、一つのgRNAで広いゲノム領域を効率的に編集できるため、エクソスキッピングによる遺伝子治療、ウイルス配列やトランスポゾンの完全除去、長い非コード領域の制御などへの有用性が期待されている。今後、さらなるゲノム編集効率の向上、欠失サイズの制御、細胞送達技術、安全性評価などの課題をクリアする必要があるが、これらが解決されることで、タイプI CRISPRを用いた遺伝子治療への有用性が高まっていくと想定される。

5. CRISPR診断への応用

CRISPR-Cas システム応用の一つとして注目されているのが、CRISPR診断 (CRISPR-Dx) と呼ばれる核酸検出への応用である。特に新型コロナウイルスの世界的な感染拡大が生じたことで、ウイルス検出の臨床現場即時検査法 (point of care testing: POCT) としてCRISPR診断が注目を集めている¹²⁾。最も代表的なCRISPR診断技術としては、クラス2 CRISPRに属するCRISPR-Cas12aを用いたDETECTR (DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter) 法、CRISPR-Cas13aを用いたSHERLOCK (Specific Highly Sensitive Enzyme Reporter Unlocking) 法が、知られている。CRISPR-Cas12aとCRISPR-Cas13aは、標的核酸を認識・切断した際に、それぞれ一本鎖DNAおよび一本鎖RNAを非特異的に分解する性質を持つ。この反応を利用することで、ウイルス核酸などの標的配列の有無を、検出用核酸プローブの

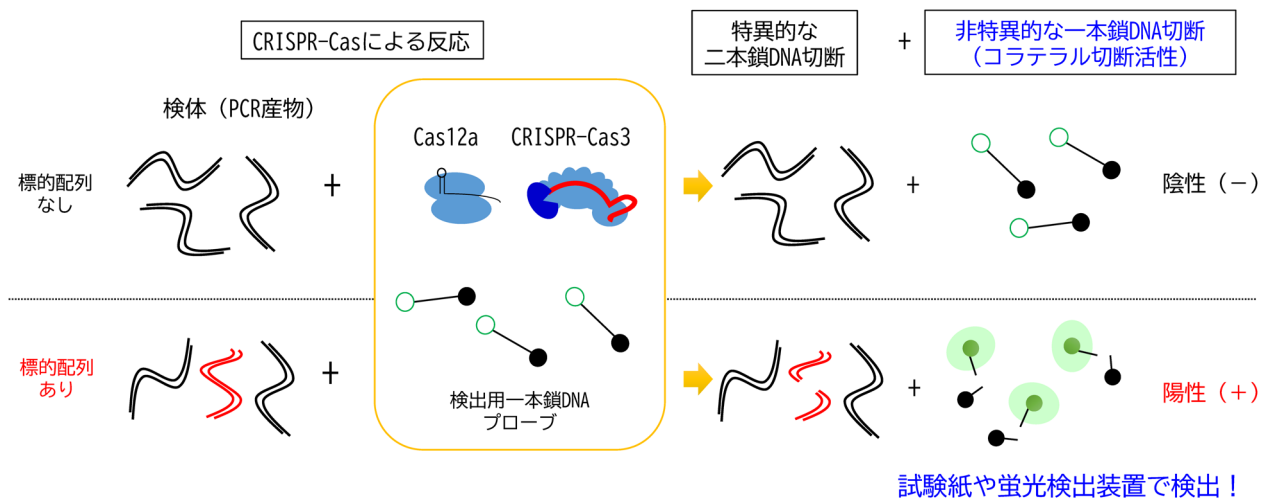


図3 非特異的な一本鎖DNA切断を利用したCRISPR診断の仕組み

切断の有無に置き換え、シグナルとして可視化できる。

最近我々のグループは、クラス1タイプI-E CRISPRもCRISPR-Cas12aと同様に、標的DNAを認識した際に一本鎖DNAを非特異的に分解する特徴を持ち、CRISPR診断に応用できることを見いだした。この核酸検出システムをCONAN法 (Cas3 Operated Nucleic Acid detection) と名づけ、実際にCOVID-19患者サンプルを用いて検証し、試験紙を用いて高精度に診断できることを示した⁷⁾ (図3)。この方法は、特別な診断機器を必要とせず、一般的な試薬と試験紙、保温装置だけで短期間に診断することができる。さらに1塩基の違いも認識できるため、たとえばインフルエンザウイルスが薬剤耐性変異体かどうかも判定できる。まさにCRISPR診断は、シーケンス解析レベルの感度、正確性を、すばやく簡単に試験紙で診断する、という優れた方法として期待される。別の研究グループからは、異なるタイプI CRISPRもCRISPR-Dxへ応用できる可能性が示されており、核酸診断ツールとしてのタイプI CRISPRの開発は今後も拡大していくことが予想される。

6. おわりに

本稿ではクラス1 CRISPRの特にタイプI CRISPRに焦点を当てて紹介したが、現在もゲノム編集技術の開発研究はCRISPR-Cas9を中心に進められている。特に、従来に比べて安全性を高めたさまざまな新規ゲノム編集方法が開発されており、たとえば、1塩基を置換するBase Editor、塩基置換だけでなく目的の配列を挿入するPrime Editingがあげられる¹³⁾。これらの技術は二本鎖DNA切断を行わずにゲノムを改変することができる利点を持つ。また、遺伝子転写制御やDNAメチル化、ヒストン修飾などを操作することで遺伝子発現を制御するエピゲノム編集技術も報告さ

れ、多岐にわたってツール開発が進んでいる。最近ではCasトランスポゾン、真核生物由来のRNA誘導型エンドヌクレアーゼFanzorなどがヒト細胞で利用可能であることも示されており^{14,15)}、ゲノム編集技術の基盤となるツール開発競争は今なお激しさを増している。タイプI CRISPRも国産ゲノム編集技術として研究が進められており、近い将来には基礎研究だけでなく、新しい遺伝子治療や新規薬物候補の同定、迅速診断法などの医療応用やさまざまな生物種への活用など、持続的な社会の形成に大いに貢献できると期待される。

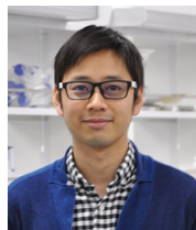
文 献

- 1) Eisenstein, M. (2022) Seven technologies to watch in 2022. *Nature*, **601**, 658–661.
- 2) Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Iranzo, J., Shmakov, S.A., Alkhnbashi, O.S., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D.H., Horvath, P., et al. (2020) Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.*, **18**, 67–83.
- 3) Morisaka, H., Yoshimi, K., Okuzaki, Y., Gee, P., Kunihiro, Y., Sonpho, E., Xu, H., Sasakawa, N., Naito, Y., Nakada, S., et al. (2019) CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells. *Nat. Commun.*, **10**, 5302.
- 4) Dolan, A.E., Hou, Z., Xiao, Y., Gramelspacher, M.J., Heo, J., Howden, S.E., Freddolino, P.L., Ke, A., & Zhang, Y. (2019) Introducing a spectrum of long-range genomic deletions in human embryonic stem cells using type I CRISPR-Cas. *Mol. Cell*, **74**, 936–950.e5.
- 5) Pickar-Oliver, A., Black, J.B., Lewis, M.M., Mutchnick, K.J., Klann, T.S., Gilcrest, K.A., Sitton, M.J., Nelson, C.E., Barrera, A., Bartelt, L.C., et al. (2019) Targeted transcriptional modulation with type I CRISPR-Cas systems in human cells. *Nat. Biotechnol.*, **37**, 1493–1501.
- 6) Cameron, P., Coons, M.M., Klompe, S.E., Lied, A.M., Smith, S.C., Vidal, B., Donohoue, P.D., Rotstein, T., Kohrs, B.W.,

- Nyer, D.B., et al. (2019) Harnessing type I CRISPR-Cas systems for genome engineering in human cells. *Nat. Biotechnol.*, **37**, 1471–1477.
- 7) Yoshimi, K., Takeshita, K., Yamayoshi, S., Shibumura, S., Yamauchi, Y., Yamamoto, M., Yotsuyanagi, H., Kawaoka, Y., & Mashimo, T. (2022) CRISPR-Cas3-based diagnostics for SARS-CoV-2 and influenza virus. *iScience*, **25**, 103830.
 - 8) Lin, P., Shen, G., Guo, K., Qin, S., Pu, Q., Wang, Z., Gao, P., Xia, Z., Khan, N., Jiang, J., et al. (2022) Type III CRISPR-based RNA editing for programmable control of SARS-CoV-2 and human coronaviruses. *Nucleic Acids Res.*, **50**, e47.
 - 9) Yoshimi, K., Takeshita, K., Kodera, N., Shibumura, S., Yamauchi, Y., Omatsu, M., Umeda, K., Kunihiro, Y., Yamamoto, M., & Mashimo, T. (2022) Dynamic mechanisms of CRISPR interference by *Escherichia coli* CRISPR-Cas3. *Nat. Commun.*, **13**, 4917.
 - 10) Doudna, J.A. (2020) The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*, **578**, 229–236.
 - 11) Gillmore, J.D., Gane, E., Taubel, J., Kao, J., Fontana, M., Maitland, M.L., Seitzer, J., O'Connell, D., Walsh, K.R., Wood, K., et al. (2021) CRISPR-Cas9 in vivo gene editing for transthyretin amyloidosis. *N. Engl. J. Med.*, **385**, 493–502.
 - 12) Kaminski, M.M., Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Zhang, F., & Collins, J.J. (2021) CRISPR-based diagnostics. *Nat. Biomed. Eng.*, **5**, 643–656.
 - 13) Anzalone, A.V., Koblan, L.W., & Liu, D.R. (2020) Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat. Biotechnol.*, **38**, 824–844.
 - 14) Saito, M., Xu, P., Faure, G., Maguire, S., Kannan, S., Altae-Tran, H., Vo, S., Desimone, A., Macrae, R.K., & Zhang, F. (2023) Fanzor is a eukaryotic programmable RNA-guided endonuclease. *Nature*, **620**, 660–668.
 - 15) Lampe, G.D., King, R.T., Halpin-Healy, T.S., Klompe, S.E., Hogan, M.I., Vo, P.L.H., Tang, S., Chavez, A., & Sternberg, S.H. (2023) Targeted DNA integration in human cells without double-strand breaks using CRISPR-associated transposases. *Nat. Biotechnol.* doi:10.1038/s41587-023-01748-1.

著者寸描

●吉見 一人 (よしみ かずと)



東京大学医科学研究所先進動物ゲノム研究分野 講師。博士 (医科学)。

■略歴 2013年京都大学大学院医学研究科博士課程を卒業，博士 (医科学) 取得。15年国立遺伝学研究所助教，17年大阪大学医学系研究科助教を経て，19年より現職。

■研究テーマと抱負 Cas3を中心としたゲノム編集技術の開発と社会実装の可能性について現在研究している。また，実験動物のゲノムヒト化による生体機能への影響を研究するべく，ゲノム改変法の開発や表現型解析も行っている。

性について現在研究している。また，実験動物のゲノムヒト化による生体機能への影響を研究するべく，ゲノム改変法の開発や表現型解析も行っている。

■ウェブサイト https://researchmap.jp/443_kazuto

■趣味 釣り，スポーツ観戦。