

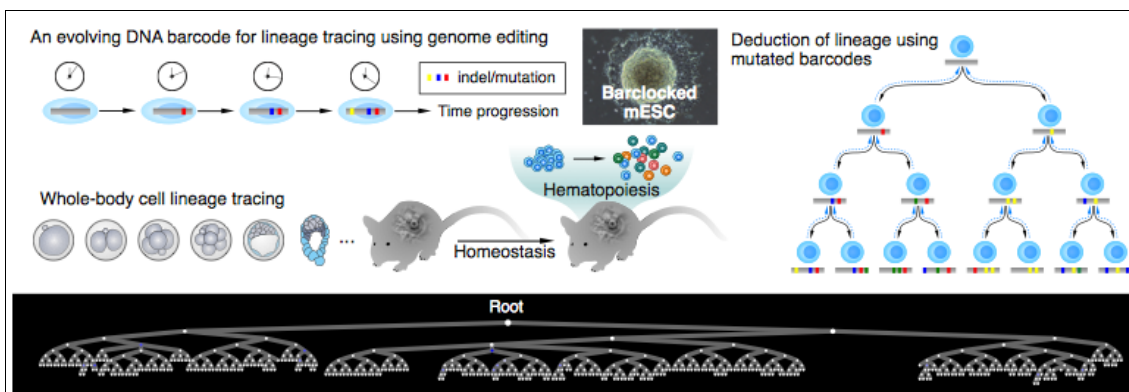
研究報告書

「1 細胞レベルで細胞系譜を一斉同定する DNA Barclock テクノロジー」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 谷内江 望



1. 研究のねらい

細胞集団の進化動態や細胞が個体を作り上げる様子を大規模かつ高解像度に追跡することは、細胞の作り上げる環境と細胞間の相互作用による①進化、②細胞分化や③個体発生を理解するために非常に重要であるが、現在までにそのようなことを可能にするテクノロジーはない。

特に哺乳動物の発生は、受精卵から胚盤胞程度までの段階について顕微鏡下で細胞分裂を観察することができるが、比較的長い時間スケールで全身を形成する細胞分裂についてその全てを十分な解像度で追跡する技術はこれまでに実現されていない。また個体全身の成長から老化まで、その全てを通じて細胞群の新生が全体機能の恒常性を支えているが、その全容は未知の部分が多い。現代生命科学において、個体や組織を形成する不均質な細胞集団の分化過程

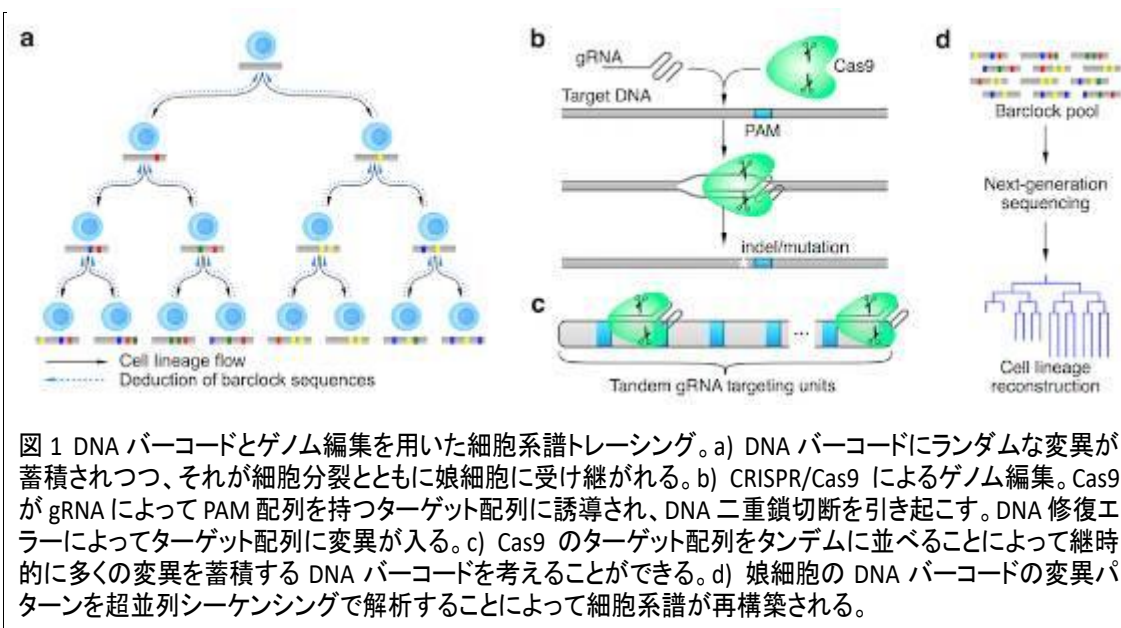


図 1 DNA バーコードとゲノム編集を用いた細胞系譜トレーシング。a) DNA バーコードにランダムな変異が蓄積されつつ、それが細胞分裂とともに娘細胞に受け継がれる。b) CRISPR/Cas9 によるゲノム編集。Cas9 が gRNA によって PAM 配列を持つターゲット配列に誘導され、DNA 二重鎖切断を引き起こす。DNA 修復エラーによってターゲット配列に変異が入る。c) Cas9 のターゲット配列をタンデムに並べることによって継時的に多くの変異を蓄積する DNA バーコードを考えることができる。d) 娘細胞の DNA バーコードの変異パターンを超並列シーケンシングで解析することによって細胞系譜が再構築される。

とその系譜の全容は依然として不明瞭である。

本研究では、哺乳動物の細胞分化や全身発生過程をはじめとした様々な生命現象における細胞系譜を近 1 細胞レベルで捕捉するためにゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 法および DNA バーコードを応用した DNA バーコード時計 (DNA Barclock) 法の実現を目指した。

DNA Barclock は細胞内において時間変化(あるいは細胞分裂)に従って配列を高頻度で変化させる合成 DNA バーコードである(図 1a)。任意のシステムにおいて、母細胞の染色体に導入された DNA バーコード配列が娘細胞に受け継がれ、それぞれの娘細胞において DNA バーコードは細胞分裂とともに継続的にゲノム編集によってその配列の一部を変化させる(図 1a-c)。このようなシステムが作動していた細胞集団の DNA バーコード配列を超並列 DNA シークエンシングによって解読すると、様々な変異パターンを観察することができる。得られた変異 DNA バーコード配列群と初期の母細胞に導入した DNA バーコード配列を「根」として細胞分裂の過程で存在したバーコード配列を遡って演繹することができるため、細胞系譜を再構築することができる(図 1d)。

本研究では、ゲノム編集による細胞毒性が低く、近 1 細胞解像度で任意のシステム(特に哺乳動物)における細胞(発生)系譜を再構築できる DNA Barclock 法の開発を進めた。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、DNA Barclock 法の実現に向けて、はじめに①出芽酵母細胞を用いた新規ゲノム編集技術の開発を行った。次に、②この新しいゲノム編集技術を用いた Barclock 法によって近 1 細胞解像度で細胞系譜追跡が実現できるか検討するためにモンテカルロ・シミュレーションによる理論証明実験を行った。さらに、哺乳動物の発生系譜を追跡するために③ゲノムリソースを利用した Barclock 遺伝子サーキットのデザインとタンデム gRNA のクローニングを行った。

(2) 詳細

(2.1) 成果1 出芽酵母細胞を用いた新規ゲノム編集技術の開発(達成度 100%)

研究開発期間中 2016 年に、ワシントン大学の Shendure らのチームが、野生型の CRISPR/ Cas9 を用いて本研究計画とほぼ同様の細胞系譜追跡を実現する GESTALT 法 (Genome Editing of Synthetic Target Array for Lineage Tracing) を発表した (McKenna et al 2016 *Science*)。二つのヌクレアーゼドメインを持つ野生型 Cas9 は、PAM (Protospacer Adjacent Motif) と呼ばれる認識配列を 3' 側にもつ 20 塩基程度の DNA ターゲット配列と相補鎖を形成できる guide RNA (gRNA) によって自在にターゲット DNA に誘導することができ、二重鎖切断を引き起こすことができる(図 1b)。切断されたターゲット DNA 配列には頻繁に修復エラーによって変異が蓄積する。GESTALT 法のデモンストレーションでは Cas9 にターゲットにされる人工的な 20 塩基対と PAM 配列を 1 ユニットとしたものがタンデムに並べられた DNA バーコード(図 1c)を染色体に保持するトランスジェニックゼブラフィッシュが作製された。一細胞期胚のトランスジェニックゼブラフィッシュに Cas9 タンパク質およびガイド RNA をインジェクションし、咽頭胚期など様々な段階まで発生させた後、DNA バーコ

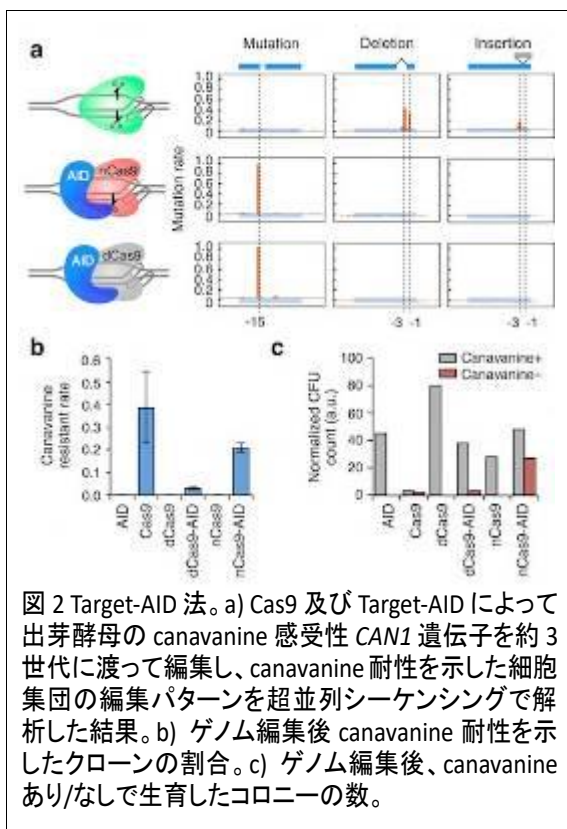


図 2 Target-AID 法。a) Cas9 及び Target-AID によって出芽酵母の canavanine 感受性 *CAN1* 遺伝子を約 3 世代に渡って編集し、canavanine 耐性を示した細胞集団の編集パターンを超並列シーケンシングで解析した結果。b) ゲノム編集後 canavanine 耐性を示したクローンの割合。c) ゲノム編集後、canavanine あり/なしで生育したコロニーの数。

一の編集パターンからゼブラフィッシュの胚発生における網羅的な細胞系譜を予測した。

しかしながら、GESTALT 法によって再構成された細胞系譜が妥当なものであるか現時点で検証する術はない。また、Cas9 による染色体切断は 10 塩基程度以上の欠失を引き起こすことが知られている上に、GELSTALT 法では DNA バーコードが Cas9 によって複数箇所を同時に切断されるために、大規模な DNA バーコードの欠損(蓄積された系譜情報の脱落)が頻繁に観察された。さらに、Cas9 による染色体切断は細胞毒性が高いことが知られている。また、一過性の Cas9 タンパク質とガイド RNA のインジェクションでは分化過程でシステムの脱落が起こることが考えられ、どの程度細胞系譜を正確に捉えられているか疑問である。

同年研究課題実施者は神戸大学のリードで、ヌクレアーゼ活性を欠損させた Cas9 にシチジンからウリジンへの C to U 変異を引き起こすシチジンデアミナーゼである AID (Activation-induced cytidine deaminase) を融合させた新しいゲノム編集ツール Target-AID を共同開発した (Nishida, Arazoe, Yachie et al 2016 *Science*)。研究課題実施者は出芽酵母を用いた実験によって Target-AID が gRNA ターゲット配列内のシトシンを高効率に別の塩基に置換すること、野生型 Cas9 による二重鎖切断の修復時に観察される塩基欠損や挿入が観察されないこと(図 2a)、編集活性が野生型 Cas9 と変わらず(図 2b)、細胞毒性が極めて低いことを示した(図 2c)。また本研究開始時から Target-AID が様々なシステムにおいて DNA バーコードを動的かつ安定に変化され

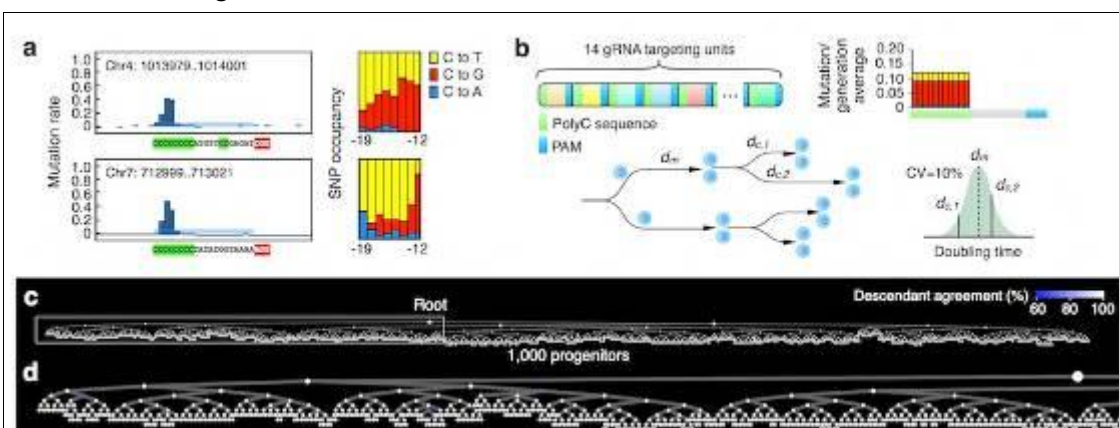


図 3 Target-AID を用いた Poly(C)配列の編集と Barclock 法のモンテカルロシミュレーション。a) 出芽酵母第 4 及び第 7 染色体上の PolyC 領域を Target-AID で編集したもの。b) Barclock 法のモンテカルロシミュレーションのモデル図。c) 娘細胞の Barclock 配列のみから再構成された系譜。分岐ノードの色は再構成した系譜におけるそれ以降の娘細胞群とシミュレーションのそれの一致率。d) (c) の白枝部分の拡大図。

るシステムの実現に有効であると考え、これを用いた DNA Barclock 法の開発を進めた。

(2. 2) 成果2 モンテカルロ・シミュレーションによる理論証明(達成度 100%)

Target-AID の Barclock 法としての利用を検討するために、出芽酵母染色体上の Poly(C)領域を Target-AID 法によって編集し、Poly(C)を含む gRNA ターゲット配列が複雑性の高いランダム変異を蓄積できる DNA Barclock 配列として有効であることを示した(図 3a)。さらに、Target-AID は PAM から-18 または-17 塩基を中心として-20 から-15 塩基までの領域にあるCを高い効率で様々な塩基に編集できることが分かった。また哺乳動物細胞(CHO 細胞)を用いた実験によって、ヌクレアーゼ欠損型 Cas9 に AID の他に一塩基除去修復を担うグリコシラーゼの阻害剤であるウラシルグリコシラーゼ阻害剤(UGI)をさらに融合させるとターゲットした C の殆どが T に編集されることも観察された(Nishida, Arazoe, Yachie et al 2016 *Science*)。

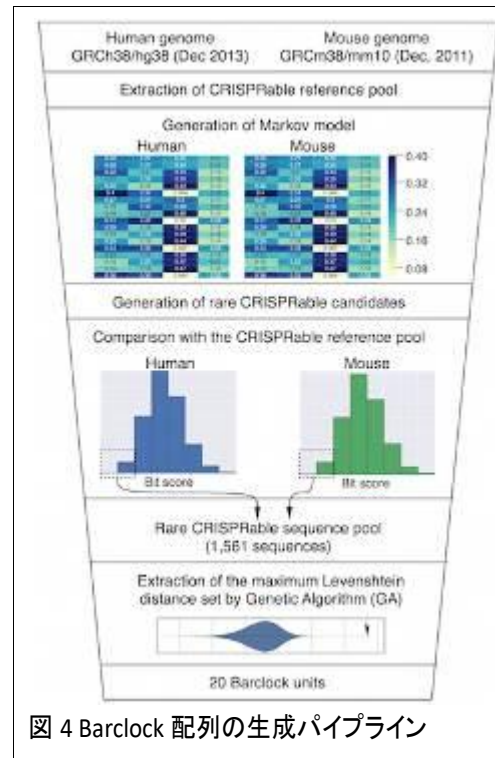


図 4 Barclock 配列の生成パイプライン

さらに、Poly(C)を持つ gRNA ターゲットユニットをタンデムに並べ、Target-AID で編集するものが

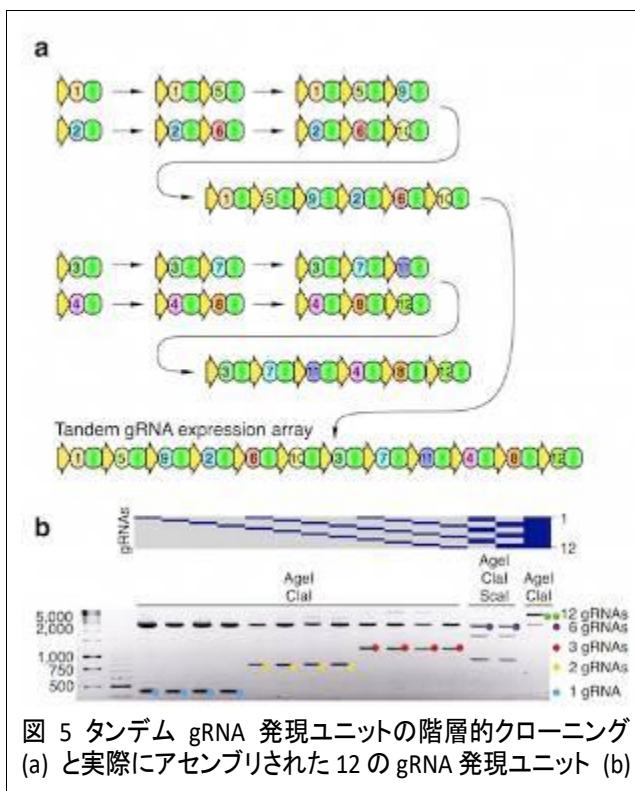


図 5 タンデム gRNA 発現ユニットの階層的クローニング (a) と実際にアセンブリされた 12 の gRNA 発現ユニット (b)

Barclock システムとして正確に動作するか、シミュレーションモデルを構築した検討した。モンテカルロ法によって細胞が分裂、増殖するシミュレーションモデルを構築し、シミュレーション内で生まれた娘細胞集団の系譜が娘細胞の持つ Barclock 配列の変異パターンのみから再構築可能か検証した(図 3b)。モデル内の各細胞の世代時間はその母細胞の世代時間に依存して変化するようにし、各細胞の DNA バーコードの変異数の期待値は世代時間に比例するように設計された(図 3b)。モデルが 1,000 娘細胞産生した時点でシミュレーションを停止し、娘細胞の DNA バーコード配列群から最大節約法によって再構築した細胞系譜を実際にシミュレーションが生成した細胞系譜と比較したところ、高い一致が見

られた(図 3c,d)。以上より、理論上は Barclock が近 1 細胞解像度で細胞系譜を追跡可能であることが示された。

(2. 3) 成果3 Barclock 配列のデザインとタンDEM gRNA のクローニング(達成度 100%)

Target-AID を含めて現存するゲノム編集技術はいずれも off-target 効果が懸念される。このため、申請者らはこれまでに、マルコフモデルによるゲノム配列の学習、Levenshtein 距離による配列評価と遺伝的アルゴリズムを組み合わせて、対象となる生物種のゲノム配列とはかけはなれた gRNA ターゲットユニット群を生成するプログラムを作成した(図 4)。これを用いて、マウスおよびヒトのゲノム配列とはかけはなれた 5 塩基の Poly(C)を持つ gRNA ターゲットユニットを数十種生成し、この内互いに配列の大きくことなる 12 種類がタンDEMに並んだものを Barclock 1.0 配列として合成した。また gRNA 発現ユニットをタンDEMに集積するための階層的クローニング法(図 5a)を開発し、12 種の U6 プロモーター-gRNA コード領域が集積されたベクターを作成した(図 5b)。この Barclock 配列から得られる C to T 変異の理論的多様性は約 10^{18} パターンある。

3. 今後の展開

2016 年、GESTALT 法とほぼ同時期に、細胞内の複数座位から GFP を発現させ、それを編集する Scartrace 法(直接的な細胞系譜追跡ではない)、self-targeting gRNA (stgRNA) によって gRNA 自体を編集し、編集された gRNA がまたそれ自身を編集する工程を繰り返すことを想定した mSCRIBE 法(3 世代程度で PAM 配列が損傷し停止してしまう)などが登場した。いずれも任意の DNA 配列を DNA バーコードとして扱い、それに対するランダム変異の導入によって細胞系譜を追跡しようという試みであるが、2. 1 で指摘したような問題点があり、概念実証実験で満足したようなデモンストレーションであるため、哺乳動物の発生やライフコースにおける細胞系譜のトレーシングに資する技術ではない。

研究課題実施者の研究チームでは、引き続き開発してきた要素技術群を総動員し、今後 2 年間を目処に高解像度の哺乳動物の細胞系譜トレーシングを可能にする Barclock を開発し、Barclock システムが安定に任意のタイミングで作動するマウスラインを樹立する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

- ・ 概ね順調に研究を進めることができたが、2014 年に設定した課題とほぼ同じ成果が米国のグループから発表され(McKenna et al 2016 *Science*)、研究の方向性をより大きなものに変更する必要性が出るなど、ゲノム編集技術の黎明期において世界動向の見通しや課題設定に甘いところがあった。
- ・ 最初の 1 年半ほどは出芽酵母細胞を用いたプロトタイピングに時間をかけていたが、より早く培養細胞の系を立上げておく必要があった。
- ・ 2014 年 7 月にトロント大学での博士研究員期間を終えて東京大学先端科学技術研究セ

ンターに着任した直後の2014年10月よりさきがけ研究者に採用して頂いた。本研究の加速が契機となって順調に新しい研究環境のセットアップが始まり、現在では素晴らしい研究チームを構築することができた。

- ・ さきがけ研究者、アドバイザー間で素晴らしい議論をすることができて、設定した研究課題の将来性について確認できたとともに将来に渡って力強いネットワークを構築することができた。(文科省やJSTなどとの意見交換にも1細胞さきがけ研究者らで働きかけて実現することができた。)

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバック、1期生成果評価会での総括・領域AD間の議論を踏まえ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本課題では、DNA Barcode に時間のパラメーターを組み込んで、細胞集団の進化動態や細胞が個体を作り上げる系譜を追うことのできる「DNA Barclock 法」の確立に取り組みました。これは、非常に魅力的でタイムリーで尖った研究提案であったこともあり、海外から類似の技術が先に論文発表されることになってしまいました。しかし、それに屈することなく、競争相手の技術より、高精度で優れたツール・システムの開発を着実に進めており、着実に成果があがっています。その真摯な研究態度に好感が持てるだけでなく、開発中の技術が、大規模なDNAバーコードの欠損を伴わない優れた新規DNA Barclockとなることを実証することに成功しており、高く評価できます。これを用いた細胞系譜解析システムが汎用性の高い基盤技術として機能することが明らかになれば、(哺乳類)個体発生における本質的な多くの疑問に答えられると期待されます。

また、領域会議において、異分野の研究者同士が自由な雰囲気の中で積極的に建設的な議論を行う雰囲気作りをリードしてくれました。非常に高い視点から各課題に内包された問題点や利点を指摘し、議論を盛り上げる役割を担ってくれました。本研究領域の若手研究者が自由に切磋琢磨する、さきがけらしい風土醸成に対する多大な貢献に対し、本領域から“特別賞”を贈ります。また、1細胞解析に留まらずに多彩な分野で活躍を始めており、今後の日本を代表する生命科学界のオピニオンリーダーとして大いに活躍してくれると期待しています。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Jo M (共同筆頭著者), Chung AY (共同筆頭著者), Yachie N (共同筆頭著者), Seo M, Jeon H, Nam Y, Seo Y, Kim E, Zhong Q, Vidal M, Park HC, Roth FP & Suk K. Yeast genetic interaction screen of human genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: identification of MAP2K5 kinase as a potential drug target. *Genome Research* (2017) 27, 1487-1500
2. Ghanegolmohammadia F, Yoshida M, Ohnuki S, Sukegawa Y, Okada H, Obara K, Kihara A, Suzuki K, Kojima T, Yachie N, Hirata D & Ohya Y. Systematic analysis of Ca²⁺ homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* based on chemical-genetic interaction profiles. *Molecular Biology*

of the Cell (2017) 28, 3415-3427

3. Yachie N, Takahashi K, Katayama T, Sakurada T, Kanda GN, Takagi E, Hirose T, Katsura T, Moriya T, Kitano H, Tsujii J, Shiraki T, Kariyazaki H, Kamei M, Abe N, Fukuda T, Sawada Y, Hashiguchi Y, Matsukuma K, Murai S, Sasaki N, Ipposhi T, Urabe H, Kudo T, Umeno M, Ono S, Miyauchi K, Nakamura M, Kizaki T, Suyama T, Hatta T, Natsume T, Ohta T, Ozawa Y, Ihara S, Tamaki S, Antezana E, Garcia-Castro A, Perret JL, Ishiguro S, Mori H, Evans-Yamamoto D, Masuyama N, Tomita M, Katayama T, Matsumoto M, Nakayama H, Shirasawa A, Shimbo K, Yamada N, Nakayama KI, Shimizu T, Saya H, Yamashita S, Matsushima T, Asahara H, Eguchi H, Mikamori M, Mori M & Natsume T. Robotic crowd biology with Maholo LabDroids. *Nature Biotechnology* (2017) 35, 310
4. Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z & Kondo A. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* (2016) 353, aaf8729
5. Yachie N (共同筆頭著者、共同責任著者), Petsalaki E (共同筆頭著者), Mellor JC, Weile J, Jacob Y, Verby M, Ozturk SB, Li S, Cote AG, Mosca R, Knapp JJ, Ko M, Yu A, Gebbia M, Sahni N, Yi S, Tyagi T, Sheykhkarimli D, Roth JF, Wong C, Musa L, Snider J, Liu Y-C, Yu H, Braun P, Stagljar I, Hao T, Calderwood MA, Pelletier L, Aloy P, Hill DE, Vidal M & Roth FP (共同責任著者). Pooled-matrix protein interaction screens using Barcode Fusion Genetics. *Molecular Systems Biology* (2016) 12, 863

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

6. 石黒 宗, 増山 七海 & 谷内江 望. オミクス科学における実験数の組合せ爆発に挑む DNAバーコード技術. *生化学* (2017) 89, No 4, 538-545
7. 石黒 宗, 森 秀人 & 谷内江 望. DNAバーコードおよびゲノム編集をもちいた細胞系譜の一斉追跡技術. *生体の科学* (2017) 68, No3, 273-281
8. 石黒 宗, 森 秀人 & 谷内江 望. DNAバーコードによる生命科学実験の限界突破. 実験医学 (2017) 35, 5 (増刊), 119-127
9. 増山 七海, 山本-エヴァンス 楠 & 谷内江 望. タンパク質間相互作用ネットワークの超高速マッピング. バイオサイエンスとインダストリー (2017) 75, No 1, 27-32
10. 山本-エヴァンス 楠, 増山 七海 & 谷内江 望. バーコードフュージョン遺伝学. 医学のあゆみ (2016) 259, No 8, 832-838