

令和 4 年 4 月 26 日

報道機関 各位

熊本大学

ゲノム編集分子を高効率に細胞内に導入可能な 変幻自在ポリマーを開発

(ポイント)

- ゲノム編集分子の形や電荷分布を認知して変形し、強く相互作用する変幻自在ポリマーを開発した。
- 度重なる改良の末、細胞内の環境を認知して適宜に変形することでゲノム編集分子を高効率に細胞核まで運ぶ第 5 世代の「変幻自在ポリマー (5G)」を開発した。
- 変幻自在ポリマー (5G) の安全性およびゲノム編集分子導入効率は、最高水準の市販品よりも優れる可能性が示唆された。

(概要説明)

熊本大学大学院先導機構の東 大志准教授、同大学大学院薬学教育部博士後期課程 2 年の田原春 徹大学院生らのグループは、ゲノム編集分子である Cas9 RNP という分子を高効率に細胞内に導入するためのキャリア「変幻自在ポリマー」を開発しました。変幻自在ポリマーは、Cas9 RNP の複雑な形や電荷分布を認知して変幻自在に変形し、非常に強く Cas9 RNP と相互作用しました。さらに改良を重ね、細胞内の環境に応じて適宜に変形可能な第 5 世代の変幻自在ポリマー (5G) を開発しました。変幻自在ポリマー (5G) は、その変形能を駆使して、細胞内で待ち受ける多くの関門 (細胞内取り込み、エンドソーム脱出、細胞内での Cas9 RNP の放出、核移行など) を突破し、最高水準の市販品よりも優れた安全性や Cas9 RNP 導入効率を有することが示唆されました。変幻自在ポリマーは理論上、Cas9 RNP のみならず、他のゲノム編集分子、タンパク質、抗体、核酸 (siRNA、メッセンジャー RNA など) にも応用可能であることから、万能型キャリアとして期待されます。

本研究成果は、国際科学雑誌「Applied Materials Today」において、令和 4 年 4 月 22 日に公開されました。また本化合物は、Cas9 RNP 導入用試薬として、株式会社サイディングからも提供が可能です。本研究は、内藤記念科学振興財団、文部科学省卓越研究事業、科学技術振興機構研究成果最適展開支援プログラム、日本学術振興会特別研究員制度などの支援を受けて実施されたものです。

(説明)

近年、CRISPR-Cas9 (クリスパーキャス 9) と呼ばれるゲノム編集技術が大変注目されています。CRISPR-Cas9 の開発により非常に簡単にゲノム編集できるようになったことから、当技術を開発したシャルパンティエ博士とダウドナ博士は 2020 年のノーベル化学賞を受賞されました。

CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を安全かつ高効率に実施するためには、Cas9 と呼ばれるタンパク質 (DNA を切るはさみ) とガイド RNA と呼ばれる核酸 (切るべき配列を教えてくれる地図) との複合体 (Cas9 リボヌクレオチドタンパク質; Cas9 RNP) を細胞の中に導入する必要があります。しかし、Cas9 RNP は親水性かつ高分子であるため、単独では細胞に取り込まれません。したがって、キャリアと呼ばれる運び屋に Cas9 RNP を搭載させて、細胞内まで運ぶ必要があります。しかし、Cas9 RNP はタンパク質 (正電荷) と核酸 (負電荷) から成るため、非常に複雑な形と電荷分布を有しています。したがって、従来型のキャリアでは Cas9 RNP との相互作用が弱く、Cas9 RNP をうまく搭載できない結果、効率よく細胞内に導入できませんでした。また、なんとか細胞内に Cas9 RNP を導入できたとしても、細胞内のエンドソーム (タンパク質や核酸を分解する酵素が多く含まれる場所) で大部分の Cas9 RNP が分解されてしまうことが知られています。さらにエンドソームからうまく脱出できたとしても、Cas9 RNP がキャリアから外れてくれないと (放出してくれないと)、細胞の核にまでたどり着けません。すなわち、Cas9 RNP を細胞内に導入し、ゲノム編集を誘導するためには、以下のことが必要になります。

- 1) キャリアが Cas9 RNP と細胞外で強く相互作用すること
- 2) 細胞内に多く取り込まれること
- 3) エンドソームから速やかに脱出すること
- 4) キャリアが Cas9 RNP を細胞内で放出すること
- 5) 核に移行すること

東准教授らのグループは、上記課題を克服するため、Cas9 RNP の形や細胞内の環境を認知して変形し、Cas9 RNP を高効率に細胞内に導入可能な「変幻自在ポリマー」を開発しました (図 1)。変幻自在ポリマーの基本骨格には、ポリロタキサンと呼ばれる数珠状の化合物を用いました。ポリロタキサンとは、細長いひも状分子 (ポリエチレングリコール) を複数のビーズ分子 (α -シクロデキストリン) の穴にとおし、ひも状分子の両端を嵩高い分子で塞いだ化合物のことをいいます (図 2)。ポリロタキサン中のビーズ分子は、ひも状分子鎖に沿って動くことができるため、ビーズ分子に、Cas9 RNP と相互作用可能な官能基を導入すると、Cas9 RNP の形や電荷分布に合わせて変幻自在に変形し、オンデマンドに官能基を提示できる結果、強く相互作用可能であると考えました (図 2)。

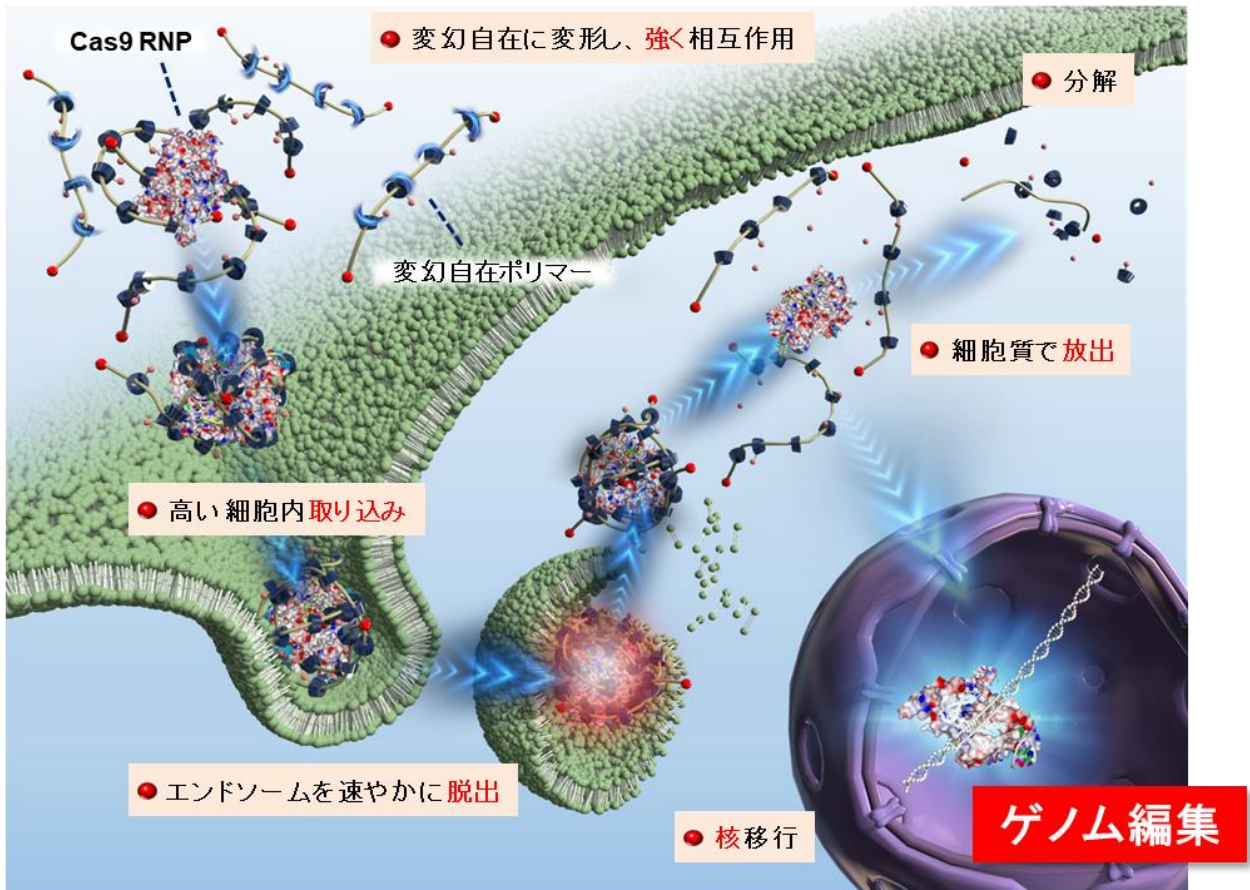


図 1. 変幻自在ポリマーによる関門突破機構

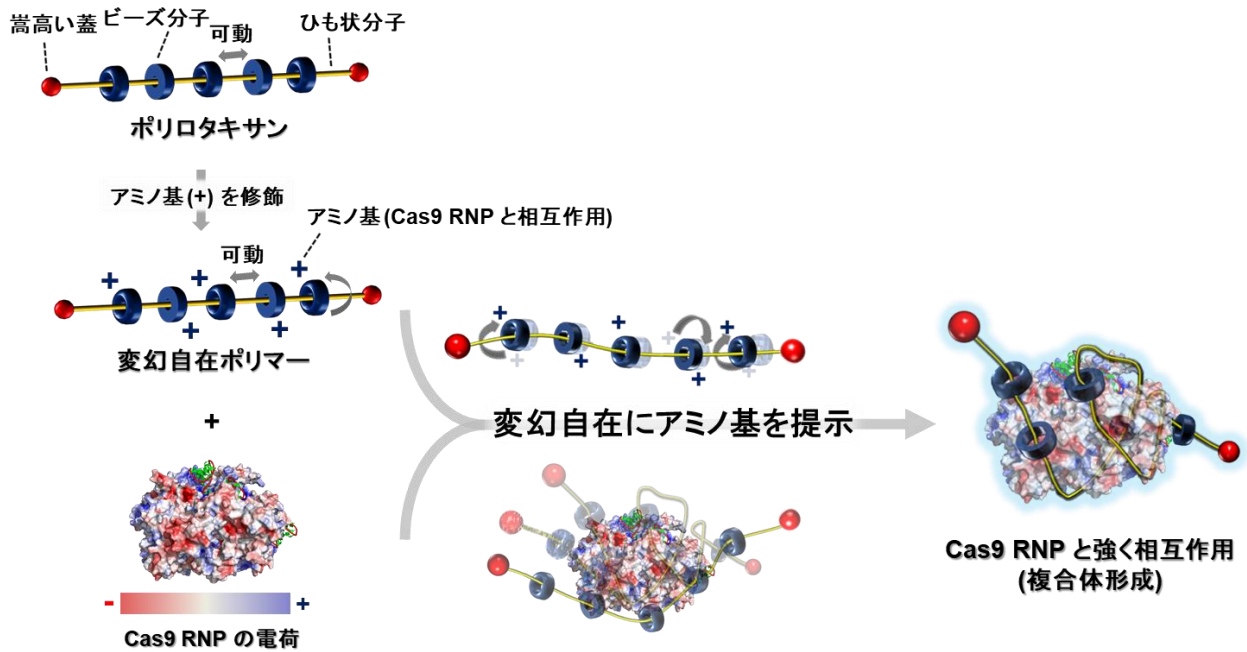


図 2. 変幻自在ポリマーと Cas9 RNP との相互作用様式

まずはじめに、ビスアミノエトキシエタン (BAEE) と呼ばれる官能基を用いて、第 1 世代の変幻自在ポリマー (1G) を構築しました (図 3a)。変幻自在ポリマー (1G) は、Cas9 RNP と強く相互作用する (Cas9 RNP を搭載する) ことが示唆されました。また、従来型のポリマー (ポリエチレンイミンやデンドリマーなど) に比べ、最も多くの Cas9 RNP を細胞内に導入することができました (図 4)。しかし、変幻自在ポリマー (1G) に搭載された Cas9 RNP のゲノム編集効率は低く、エンドソーム脱出能に乏しいことが考えられました。

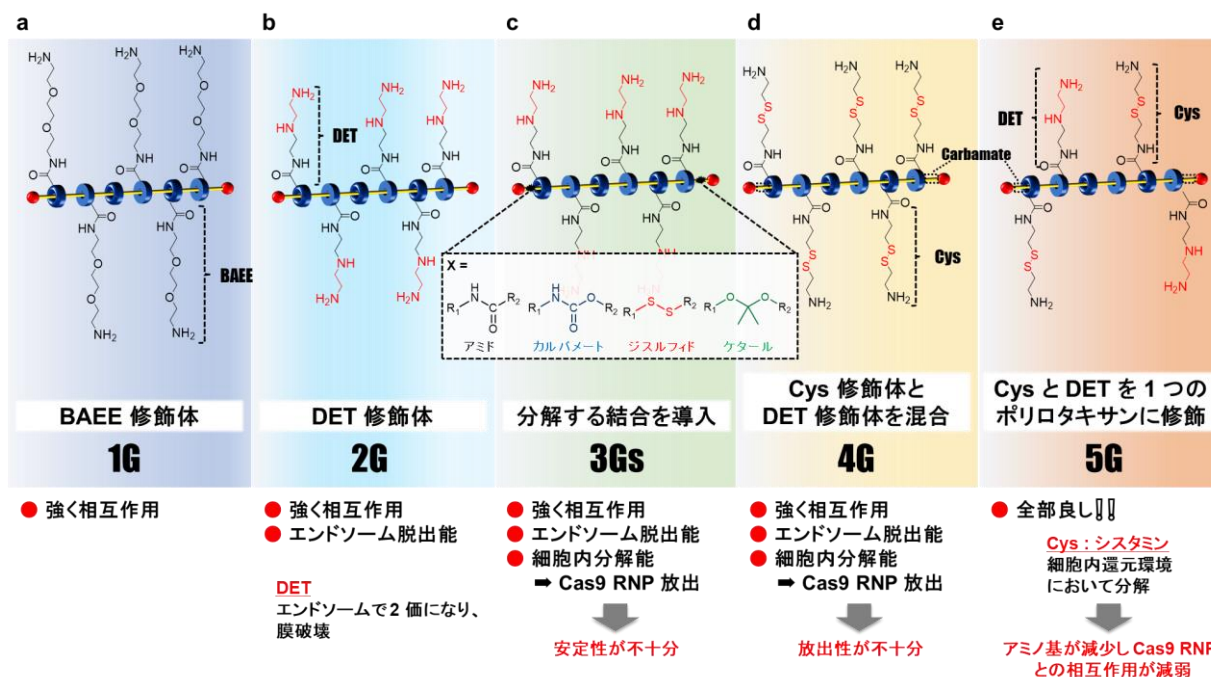


図 3. 変幻自在ポリマー (1G~5G) の構造と特徴

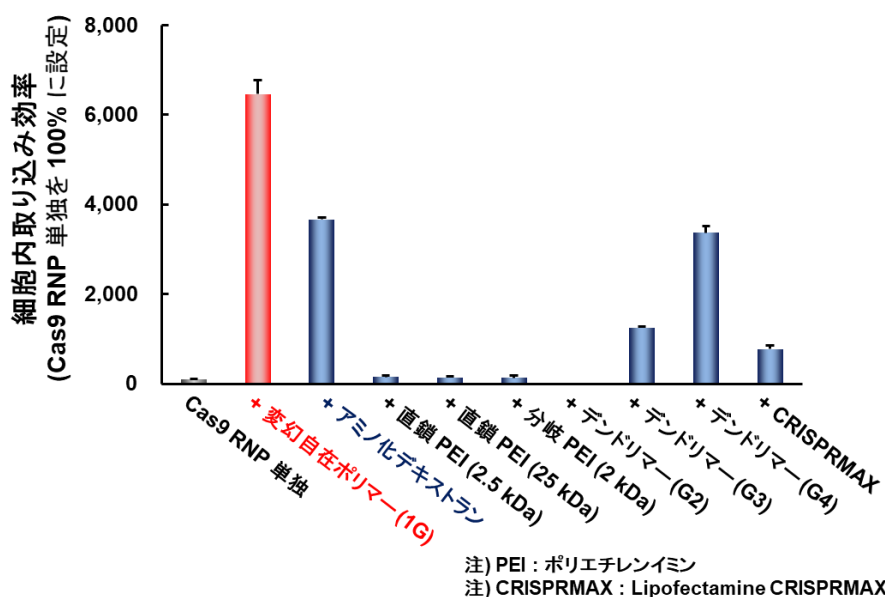


図 4. 各種キャリアに搭載された Cas9 RNP の細胞内取り込み量

そこで次に、BAEE をジエチレントリアミン (DET) と呼ばれる官能基に変更し、エンドソーム脱出能に優れる第 2 世代の変幻自在ポリマー (2G) を構築しました (図 3b)。変幻自在ポリマー (2G) はエンドソーム環境でのみ膜傷害機能を示し、エンドソームを効率よく脱出しました。その結果、搭載された Cas9 RNP は、高いゲノム編集効率を発揮しました。しかし、Cas9 RNP を積極的に細胞内で放出する性質は有しませんでした。

そこで、Cas9 RNP を積極的に細胞内で放出するように、ポリロタキサン中のひも状分子に、細胞内で分解される様々な結合様式を挿入した変幻自在ポリマー (3G) (図 3c) と、ポリロタキサン中のビーズ分子とアミノ基の間に、細胞内で分解される結合様式を挿入した変幻自在ポリマー (4G) を開発しました (図 3d)。しかし、どちらも細胞外での安定性と細胞内での放出性を両立することができませんでした。

最終的に、ひも状分子内にカルバメート結合を有し、ビーズ分子には、DET のみならずシスタミン (Cys) と呼ばれる官能基を結合させた変幻自在ポリマー (5G) を開発しました (図 3e)。これにより、1) 細胞外における Cas9 RNP との強い相互作用、2) 高効率な細胞内取り込み、3) エンドソーム脱出能、4) 細胞質における Cas9 RNP 放出能、5) Cas9 RNP の優れた核移行性の全てを達成し、非常に優れたゲノム編集効率を誘導しました。重要なことに、変幻自在ポリマー (5G) に搭載した Cas9 RNP は、市販の導入用試薬として最も汎用性が高いとされる Lipofectamine CRISPRMAX よりも細胞障害性が低く (図 5a)、同等以上の *in vitro* ゲノム編集効率を誘導しました (図 5b)。さらに局所投与において、Lipofectamine CRISPRMAX よりも有意に優れた *in vivo* ゲノム編集効率を誘導しました (図 5c)。

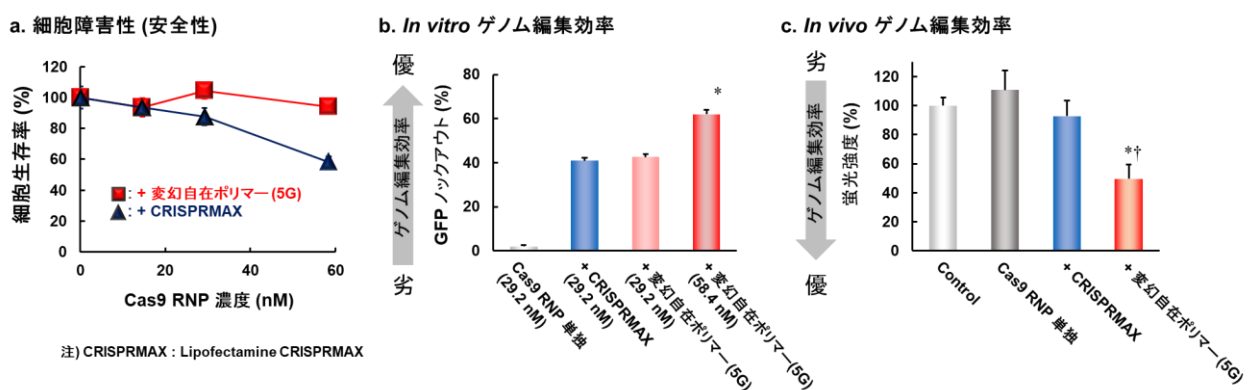


図 5. 変幻自在ポリマー (5G) あるいは Lipofectamine CRISPRMAX に搭載された Cas9 RNP の細胞障害性およびゲノム編集効率 (*in vitro*, *in vivo*)

変幻自在ポリマーは、Cas9 RNP と混合するだけでまるでロボットのように自律的に変形を繰り返し、核まで Cas9 RNP を運びます (図 6)。この原理を使えば、理論上、他のゲノム編集分子はもちろんのこと、酵素、抗体、siRNA、

メッセンジャー RNA、プラスミド DNA など、多種多様な分子と強く相互作用し、細胞内に導入することができる期待されます。このような特徴は、上記化合物を迅速に製剤設計する際に役立つため、パンデミック時の薬剤やワクチン開発の際にも有益であると考えられます。

なお本化合物は、Cas9 RNP 導入用試薬として株式会社サイディンからも提供が可能です。

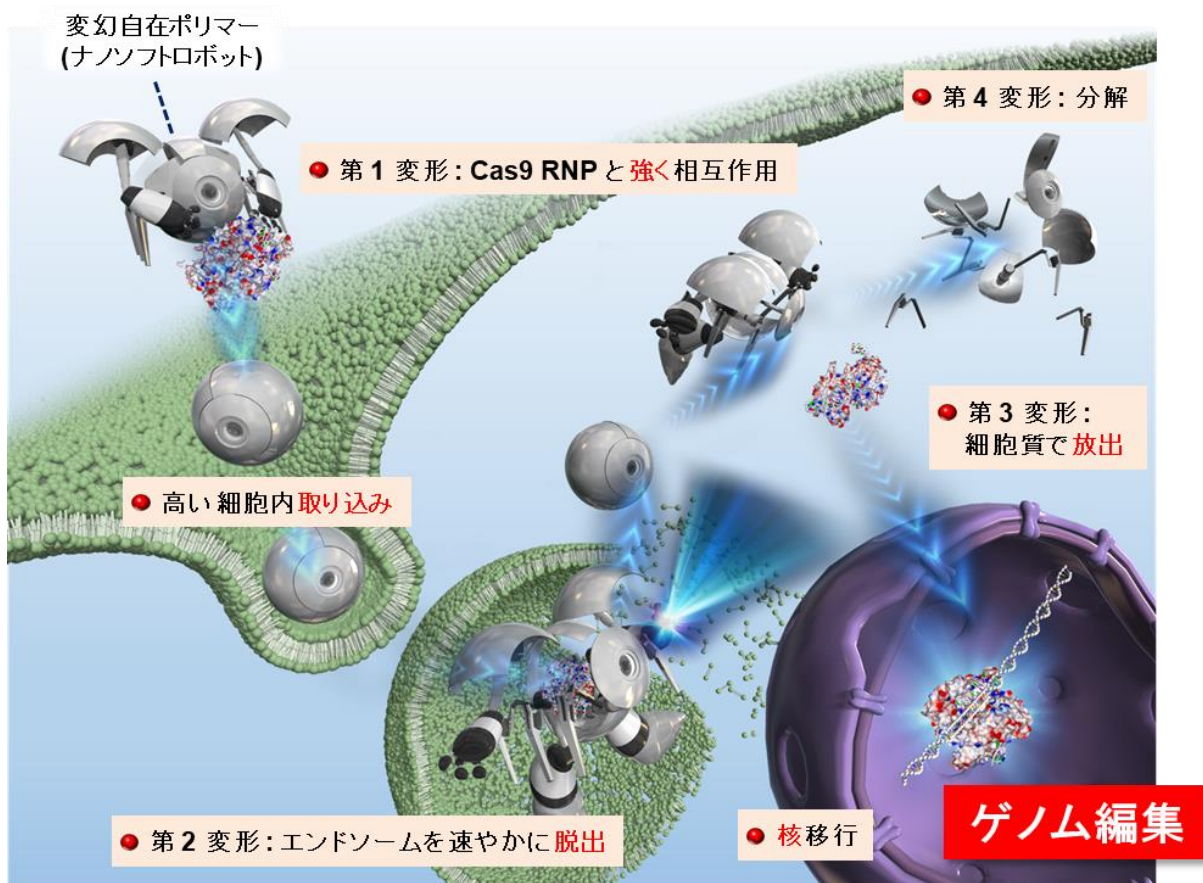


図 6. ナノソフトロボットとして振舞う変幻自在ポリマー

(論文情報)

論文名 : Polyrotaxane-based Multi-step Transformable Materials for the Delivery of Cas9 Ribonucleoprotein

著者 : Toru Taharabaru, Takuya Kihara, Risako Onodera, Tetsuya Kogo, Kenjiro Higashi, Kunikazu Moribe, Teruya Nakamura, Keiichi Motoyama, Taishi Higashi

掲載誌 : Applied Materials Today

doi : doi.org/10.1016/j.apmt.2022.101488

URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352940722001238>

【お問い合わせ先】

熊本大学大学院先導機構

担当 : 准教授 東 大志

電話 : 096-371-4168

e-mail : higashit@kumamoto-u.ac.jp