

合成化学とゲノム生物学の融合による 化学的遺伝子制御法の基盤技術開発

金森功吏^{*1} 河添好孝^{*2}

Development of a Chemical Technology for Gene Regulation by Synthetic Chemistry and Genome Biology

Takashi KANAMORI^{*1} and Yoshitaka KAWASOE^{*2}

Recent advances in oligonucleotide and mRNA therapeutics have accelerated the development of gene-targeted therapies. Genome editing technologies such as CRISPR/Cas9 enable direct modification of disease-causing genes. However, safety concerns remain, including immunogenicity of foreign proteins, delivery difficulties, and unpredictable mutations caused by DNA double-strand breaks (DSBs). Therefore, safer and more controllable gene editing strategies are needed. In this study, we focused on peptide nucleic acid (PNA), an artificial nucleic acid capable of invading double-stranded DNA and binding sequence-specifically. We designed a photo-induced gene editing approach by introducing a photosensitizer into PNA. Upon light irradiation, the photosensitizer generates reactive oxygen species that induce oxidative DNA damage near the PNA binding site, thereby triggering DNA repair reactions. Our results demonstrate that photosensitizer-modified PNA can effectively induce DNA damage, leading to subsequent repair reactions. Since this method does not rely on DSB formation and can be controlled spatiotemporally by light, it is expected to provide a promising strategy for safer and more precise gene editing.

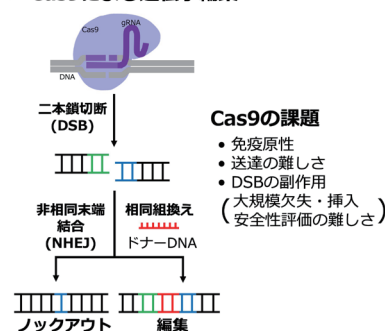
1. 研究の背景と目的

近年、核酸医薬やmRNA医薬の発展により、遺伝子を標的とした治療法が急速に進展している。特にCRISPR/Cas9に代表されるゲノム編集技術は、疾患原因遺伝子そのものを改変可能な革新的手法として注目されている。一方で、Cas9は外来タンパク質であることに起因する免疫原性⁽¹⁾、細胞内送達の難しさ⁽²⁾、さらにDNA二本鎖切断 (DSB) に伴う予期しない大規模変異⁽³⁾などの安

全性上の懸念が指摘されている。そのため、送達が容易で、安全性の高い遺伝子編集手法の開発が求められている。一方、近年の遺伝子治療薬開発を振り返ると、核酸医薬品やmRNA医薬が、合成分子の活用によって飛躍的に進展した歴史がある。そこで本研究では、DNA標的の遺伝子治療薬開発を見据え、合成分子の活用による低分子化と送達性の向上、さらに免疫原性の低減や変異による副作用リスクを抑えた遺伝子編集手法の開発を目指した。

本研究では人工核酸であるペプチド核酸 (PNA) に着目した⁽⁴⁾。PNAはペプチド骨格を有する人工核酸であり、DNA二重鎖へ侵入して配列特異的に結合可能である。この特異な構造はDNA損傷として認識され修復反応を誘導することが知られており、ドナーDNAを共存させることで相同組換え型遺伝子編集が可能となる⁽⁵⁾。しかし既報では編集効率は数%程度に留まっており、実用化に向けた大きな課題となっている (図1)。筆者らはこの低編集効率の要因の一つとして、編集の際に必須の修復反応のきっかけがPNA結合のみに依存しており、修復を効果的に誘導できていない可能性を考えた。そこで本研究では、修復を効果的に誘起するため、PNAに光増感剤を導入し、光照射によって活性酸素を発生させDNAへ触媒的に損傷を導入することで修復反応を効率的に誘導し、遺伝子編集効率の向上を目指した。

■ Cas9による遺伝子編集



■ 人工核酸 (PNA)による遺伝子編集

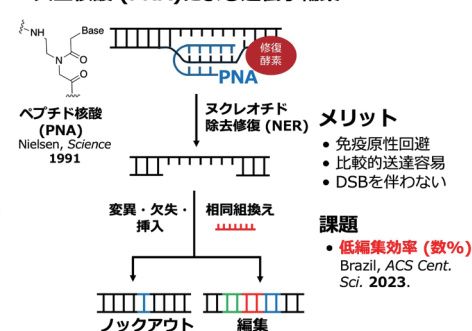


図1 Cas9を用いた遺伝子編集法と、人工核酸であるペプチド核酸 (PNA) を用いた遺伝子編集法。

2. 光増感剤修飾 PNA を用いた修復誘導による遺伝子編集法

著者らはこれまでの共同研究から、光増感剤を核酸塩基部に導入したプラスミドを用い、光増感剤を部位特異的に導入したプラスミドを用いると、光で DNA に損傷を導入でき、さらにその損傷は周辺の限られた領域において修復されることを初めて明らかにしている。この結果から着想を得、光増感剤を有する PNA を用いて DNA に光で損傷を導入し、修復を誘起する方法を考えた (図 2)。従来法では PNA の結合のみによる修復誘導に依存しており、PNA が解離すると修復が働かず、遺伝子編集が生じない。一方本研究では、光増感剤-PNA コンジュゲートを用い、光照射によって塩基に触媒的に損傷を導入して修復を誘導できるため、遺伝子編集効率の向上が期待される。

まず光増感剤として、申請者らが開発してきたニトロピフェニル (NBP) ⁽⁶⁾ およびリボフラビンを選択し、リンカー長の異なる複数の PNA コンジュゲートを設計・合成した。リンカー長は活性酸素の拡散距離や DNA 損傷効率に影響すると考えられるため、PEG 鎖長を変化させた 3 種類の分子を作製した。DNA 損傷導入評価にはプラスミドおよびモデル二本鎖 DNA を用いた。光照射後、ペペリジン処理による酸化損傷塩基の切断反応を利用し、電気泳動による DNA バンド強度変化から損傷効率を評価した。さらに損傷後の DNA 修復誘導評価として、ツメガエル卵核質抽出液を用いた *in vitro* 修復系を構築し、蛍光標識 dUTP の取り込み量から修復領域の広がりや効率を解析した。加えて、将来的な遺伝子編集評価を見据え、EGFP 発現回復型プラスミドの構築、長鎖 PNA の合成を進めた。

3. 研究成果

(1) 光増感剤 PNA による DNA 損傷導入

光増感剤と PNA をつなぐリンカー長を種々検討し、PEG₆ リンカーを用いた場合、二本鎖 DNA バンドの約 57% の減少が観測され、効率的な DNA 酸化が達成された。

(2) DNA 修復誘導の検証

光増感剤修飾 PNA を DNA に結合させて光照射した後、ツメガエル卵核質抽出液による修復反応 ^(7,8) を行ったところ、Cy5 標識 dUTP の取り込みが確認され、DNA 損傷導入と修復誘導が実証された (図 3)。特に光増感剤修飾 PNA の添加のみでは修復誘導がほとんど観察されなかったのに対し、光照射条件では当量依存的に修復が増加した。また、光増感剤モノマーでは光照射してもわずかな修復誘導を示す結果となり、光増感剤を導入した PNA を用いることで効果的に損傷導入と修復誘導を起こせることが示された。

(3) 配列選択性と課題

一方でスクランブル配列 DNA に対しても一定の修復シグナルが観測され、非特異的酸化の存在が示唆された。この理由として、今回用いた PNA が短く DNA への結合力が低く、DNA 二重鎖への侵入を可能にするため低塩濃度条件で行ったことに由来すると考えられる。低塩濃度条件では DNA 二重鎖が緩むため、非特異的結合が増加したと考えられる。一方、長鎖 PNA を用いることで、生理的塩濃度条件での DNA への配列選択的な結合が可能になると考えられる。

(4) 次段階研究への準備

遺伝子編集評価用 EGFP プラスミドの構築を完了し、さらに配列選択性も考慮した長鎖の PNA の合成にも成功した。また、ゼブラフィッシュを用いた色素形成遺伝子チロシナーゼを標的

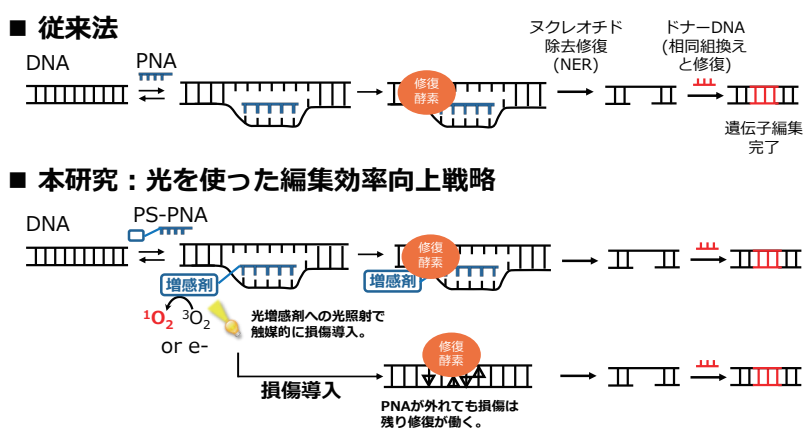


図 2 従来の PNA を用いた遺伝子編集法 (上段) と、本研究の光増感剤 (PS) 修飾 PNA を用いた遺伝子編集法 (下段)。

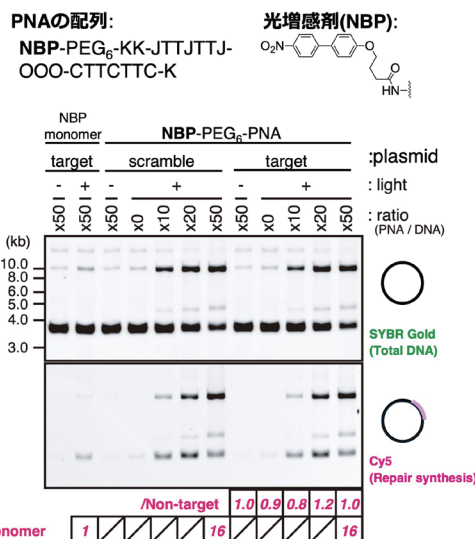


図 3 光増感剤 (NBP) 修飾 PNA を用いたプラスミド DNA の光酸化と、ツメガエル卵核質抽出液を用いた修復反応の検証実験。

とした *in vivo* ノックアウト評価を計画しており、標的配列の設計を完了した。今後は、光編集法を生体適用する検証を進める予定である。

4. まとめと今後の展望

本研究により、光増感剤修飾PNAを用いることでDNA損傷導入と修復誘導が可能であることを明らかにした。この手法は、既存のPNA単独による遺伝子編集法と比較して、損傷導入による修復誘導によって、編集効率を向上できると期待される。また原理的にはDSBを伴わないと考えられるため、重篤な変異のリスクを抑え、さらに時空間制御が可能であり安全性向上が期待できる。今後は長鎖PNAを用いた配列特異性の向上を検討するほか、遺伝子編集効率の定量評価、*in vivo* モデルでの実証を進める。最終的には光による遺伝子治療を医療応用への展開を目指していきたいと考えている。

REFERENCES

- 1) C. T. Charlesworth, P. S. Deshpande, D. P. Dever, J. Camarena, V. T. Lemgart, M. K. Cromer, C. A. Vakulskas, M. A. Collingwood, L. Zhang, N. M. Bode, *et al.*, *Nat. Med.*, **25** (2019) 249-254.
- 2) C. A. Lino, J. C. Harper, J. P. Carney and J. A. Timlin, *Drug Deliv.*, **25** (2018) 1234-1257.
- 3) M. Kosicki, K. Tomberg and A. Bradley, *Nat. Biotechnol.*, **36** (2018) 899.
- 4) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg and O. Buchardt, *Science*, **254** (1991) 1497-1500.
- 5) R. Bahal, N. Ali McNeer, E. Quijano, Y. Liu, P. Sulkowski, A. Turchick, Y. C. Lu, D. C. Bhunia, A. Manna, D. L. Greiner, *et al.*, *Nat. Commun.*, **7** (2016) 13304.
- 6) Y. Du, T. Kanamori, Y. Yaginuma, N. Yoshida, S. Kaneko and H. Yuasa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **114** (2024) 129988.
- 7) W. S. Hoogenboom, D. K. Douwel and P. Knipscheer, *Dev. Biol.*, **428** (2017) 300-309.
- 8) Y. Kawasoe, S. Shimokawa, P. J. Gillespie, J. J. Blow, T. Tsurimoto and T. S. Takahashi, *J. Biol. Chem.*, **300** (2024) 105588.