



令和3年6月4日

新規国産ゲノム編集ツール TiD システムを用いて
ヒト細胞でのゲノム編集に成功
-海外技術に依存しないゲノム編集による創薬、医療への貢献に期待-

徳島大学大学院社会産業理工学研究部 刑部敬史教授らの研究グループは、東京工業大学生命理工学院 刑部祐里子教授、および近畿大学生物理工学部 宮下尚之准教授らと共同で、このたび、世界で初めて、サブタイプ Type I-D に属する CRISPR-Cas がヒト細胞においてゲノム編集に活用できることを実証しました。今回の成果により、海外特許に抵触することなく、ゲノム編集技術の創薬や医療分野への応用が可能になると期待できます。

・ 研究の背景と概要

近年、ゲノム上の特定の DNA 配列を特異的かつ効率的に変異を導入できる技術としてゲノム編集技術の開発が進んでいます。ゲノム編集による遺伝子改変は、遺伝子の機能解明など基礎研究の発展だけでなく、遺伝子治療や再生医療などの医療分野、新薬の開発などの創薬分野、植物、家畜の品種改良などの農林水産業分野など、幅広い分野での応用、活用が期待されています。ゲノム編集技術の中でも、微生物の獲得免疫システムの一つである CRISPR-Cas9 システムを活用した技術は、その簡便さと高効率性から最も広く利用されており、共同開発者であるジェニファー・ダウドナ博士とエマニュエル・シャルパンティエ博士が昨年ノーベル化学賞を受賞したことも記憶に新しいところです。

一方で、課題としては、意図しない配列へと変異を導入してしまうオフターゲット効果が生じる可能性や、標的配列の選択性の制限などが挙げられています。また、ゲノム編集技術はほとんどが欧米で開発された技術であるため、国内の産業・医療での活用をする際には知的財産の問題が生じる、という問題点があることから、新しい国産ゲノム編集技術の開発が望まれていました。これまで、徳島大学大学院社会産業理工学研究部の刑部敬史教授・刑部祐里子 教授（当時）らのグループは、自然界に存在する多様な CRISPR-Cas システムの中から、機能未知であった CRISPR-Cas type I-D システムを同定し、新規ゲノム編集ツール TiD として開発、植物でのゲノム編集の成功を報告していました（Osakabe et al., 2020）。

このたび、 刑部敬史教授、和田直樹特任助教らのグループは、東京工業大学生命理工学院 刑部祐里子教授、近畿大学生物理工学部の宮下尚之

准教授と共同研究を行い、TiD の構成タンパク質の中でも Cas10d タンパク質が DNA を切断するヌクレアーゼとして機能することを明らかにし、さらに TiD システムを用いたヒト細胞でのゲノム編集に成功しました。今回の成果により、海外特許に抵触することなく、ゲノム編集技術の創薬や医療分野への応用が可能になると期待できます。また、TiD は Cas9 よりも長い配列を認識することから(Cas9 は 20 塩基を認識するのに対し、TiD は 35, 36 塩基を認識する)、狙った配列のみを改変する、より特異的なゲノム編集が可能になると期待できます。

・ 研究の内容と成果

TiD システムは、5 つの Cas タンパク質(Cas3d、Cas5d、Cas6d、Cas7d、Cas10d)と 35-36 bp の標的配列を認識するガイド RNA から構成されます(図 1)。そのなかでも Cas10d は、他の CRISPR-Cas システムにはない、TiD システムにユニークなタンパク質ですが、その機能はまだ明らかではありませんでした。本研究で、刑部、和田らは、試験管内で Cas10d がヌクレアーゼ活性を持つこと(図 2)、また Cas10d と Cas3d が DNA の巻き戻しに関連すると考えられる ATPase 活性を持つこと、ヒト細胞内で Cas10d が他の Cas タンパク質から構成される複合体へと Cas3d をリクルートするために必要であること等を明らかにしました。また、分子動力学シミュレーションによって、ガイド RNA と Cas タンパク質との複合体形成に重要な Cas7d 内のアミノ酸残基も明らかにしました。さらに、ゲノム編集の利用にあたって重要な情報である変異導入の特異性を明らかにするため、標的配列とミスマッチを持つガイド RNA を設計し、レポーターアッセイによってその影響を解析しました。その結果、ミスマッチの位置にもよりますが、1 塩基のミスマッチでも活性に大きな影響を与えることを明らかにしました。これらの結果により、TiD がオフターゲット変異のリスクを低減する高い特異性を持つこと、TiD が既報のシステムとは異なるユニークなメカニズムを持つシステムであることが明らかにしました。

さらに、TiD を用いてヒト HEK293T 細胞でのゲノム編集に成功しました(図 3)。ヒト細胞でのゲノム編集に向けて TiD を構成する Cas 遺伝子の発現について最適化を行い、ヒト内在遺伝子への変異導入を行いました。その結果、TiD は CRISPR-Cas9 と似た数塩基程度の短い挿入/欠失変異を誘導するのに加え、最長 18 kb にも及ぶ長鎖欠失も誘導できることがわかりました(図 3)。近年、CRISPR-Cas3 が同様に長鎖欠失を誘導することが報告されていますが(Morisaka et al., 2019)、CRISPR-Cas3 は標的配列の上流に向けて長鎖欠失を誘導するのに対し、TiD は標的配列に対して両方向に長鎖欠失を誘導するなど、異なる性質を持つことがわかりました。これらの結果は、TiD がヒト細胞でのゲノム編集にも利用できるユニークな新規国産ゲノム編集ツールであることを示しており、遺伝子ノックアウト

図 2. 試験管内での一本鎖 DNA 切断活性の検証. Type I-E システムで報告のある Cas3d ではなく、Cas10d が一本鎖 DNA を分解することが示された。

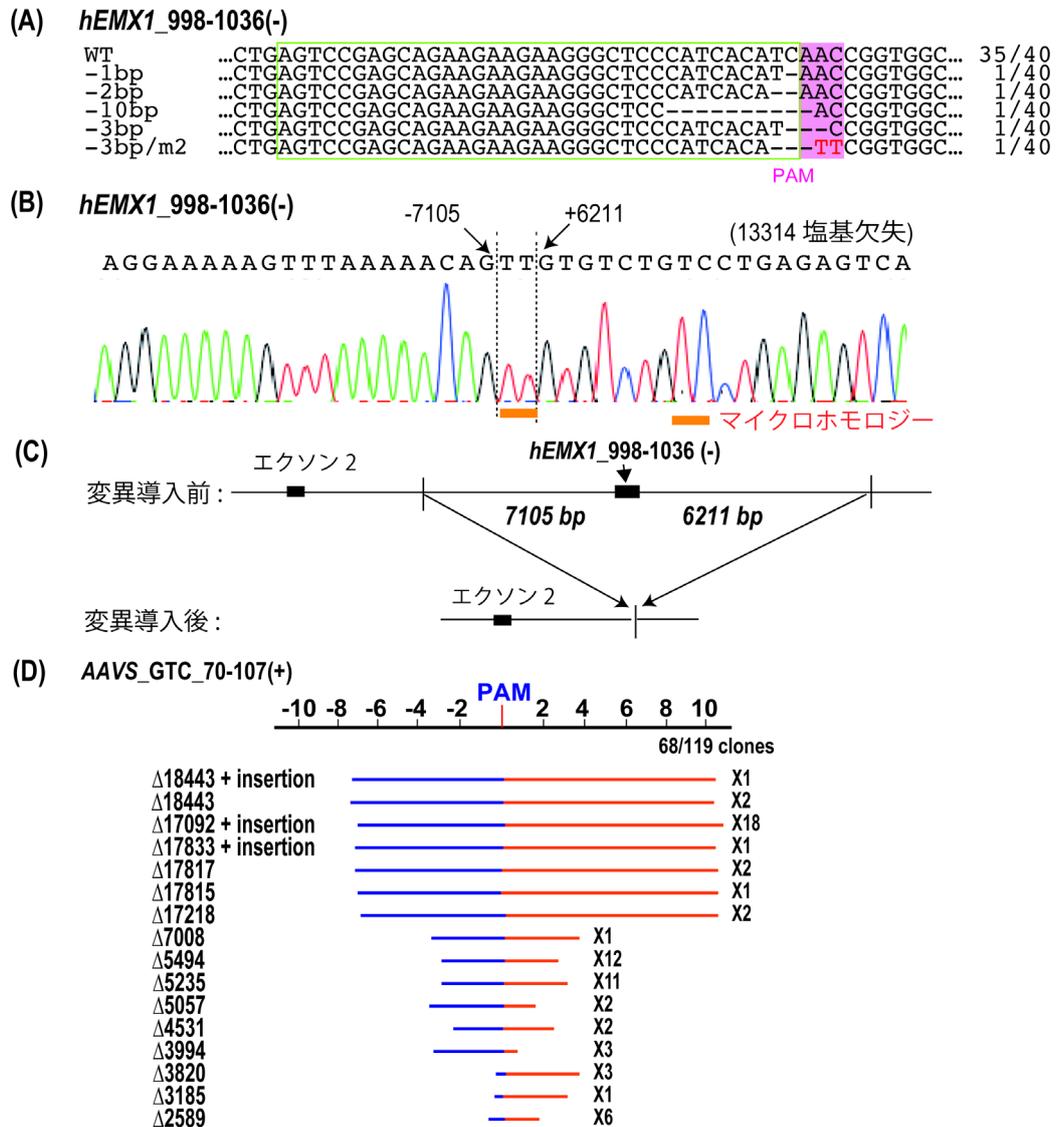


図 3. TiD を用いたヒト細胞でのゲノム編集。

A) 短い数塩基の欠失変異の検出

B) 長鎖欠失変異の DNA 配列解析の一例。検出された欠失の両端ではマイクロホモロジーが高頻度で検出された。

C) B)の長鎖欠失変異で起きた遺伝子構造変化の模式図。TiDによりエクソン 3 を含む 13 kb の DNA 領域が欠失した。

D) 検出された長鎖欠失変異の分布。標的配列を挟んで両方向に 2.5 kb から

18 kb までの欠失が検出された。

・論文情報

“Genome editing in mammalian cells using the CRISPR type I-D nuclease”

Keishi Osakabe^{*,†}, Naoki Wada[†], Emi Murakami, Naoyuki Miyashita and Yuriko Osakabe

Nucleic Acid Research (2021) <https://doi.org/10.1093/nar/gkab348>

[†]:共同第一著者

・補足説明

※ CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) ; 真正細菌や古細菌が持つファージなどに対する獲得免疫機構の一つ。標的DNAを認識するRNA分子 (crRNAと呼ばれる) およびcrRNAと複合体を形成するCas (CRISPR associated) タンパク質とからなる。現段階では、30種を超える多様なCRISPRシステムが同定されている。

<取材に関するお問い合わせ>

国立大学法人徳島大学

常三島事務部生物資源産業学部事務課総務係

電話番号 088-656-8024

メールアドレス bb.gene.section@tokushima-u.ac.jp

国立大学法人東京工業大学

総務部広報課

メールアドレス media@jim.titech.ac.jp

近畿大学生物理工学部

大学運営本部和歌山キャンパス学生センター

電話番号 0736-77-3888

メールアドレス bost-pr@waka.kindai.ac.jp

<内容に関するお問い合わせ>

徳島大学大学院社会産業学理工学研究部

連絡先 教授 刑部敬史

電話番号 088-634-6418

メールアドレス kosakabe@tokushima-u.ac.jp

東京工業大学生命理工学院
連絡先 教授 刑部祐里子
電話番号 045-924-5733
メールアドレス osakabe.y.ab@m.titech.ac.jp

分子動力学シミュレーションによる解析
近畿大学生物理工学部
連絡先 准教授 宮下尚之
電話番号 0736-77-3888
メールアドレス miya@waka.kindai.ac.jp