



大阪大学
OSAKA UNIVERSITY

国立大学法人 大阪大学

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-1

TEL: 06-6877-5111 (代)

www.osaka-u.ac.jp



大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構

国立遺伝学研究所

Press Release

本研究成果は「Nature Communications 誌」から、以下のとおり
報道解禁設定があります。

1月20日(水)午前10時(英国時間)

TV・ラジオ・WEB ……1月20日(水) 19時(日本時間)

新聞 ……1月21日(木) 朝刊(日本時間)

平成 28 年 1 月 18 日

従来の約 100 倍のサイズのゲノム編集が可能に！ マウス・ラット等の遺伝子改変効率を向上させる新しい技術を開発

【研究成果のポイント】

- ゲノム編集技術‘CRISPR/Cas システム’^{*1}と一本鎖オリゴ(ssODN)^{*2}を利用する二つの新しい遺伝子改変技術の方法を開発
- これにより、動物の受精卵において、これまで難しかった数百 kb の大きさの染色体領域のゲノム導入に成功
- マウスやラットなど様々な動物における遺伝子改変操作の効率を向上させるとともに、作製された遺伝子改変動物^{*3}は、創薬研究、トランスレーショナル研究、再生医療研究などへの幅広い利用に期待

❖ 概要

大阪大学大学院医学系研究科附属動物実験施設の真下知士(ましもと)准教授、情報・システム研究機構国立遺伝学研究所マウス開発研究室の吉見一人(よしみかずと)助教らの研究グループは、ゲノム編集技術‘CRISPR/Cas システム’と一本鎖オリゴ(ssODN)を利用する二つの新しい遺伝子改変技術の方法(「IsODN(長鎖一本鎖 DNA)法」^{*4}と「2H2OP(2 ヒット 2 オリゴ)法」^{*5}(図1))を開発しました。

‘CRISPR/Casシステム’は、マウスやラットにおける新しい遺伝子改変技術として注目されている技術です。DNAを切断する酵素Cas9と、ゲノム上の編集箇所を見つけ出すgRNAを動物の受精卵に注入することで、特定の遺伝子を破壊(ノックアウト)したり、特定の箇所へ導入(ノックイン)することができます。しかしながらこれまで動物の受精卵では、遺伝子などの大きなDNA配列の導入効率が低く、ノックイン動物を作製することが困難でした。

本研究で開発した二つの新しい遺伝子改変技術の方法により、GFP 遺伝子^{*6}の効率的かつ正確なノックインに加え、これまで不可能だった大きなサイズのゲノム領域(約 200 kbp)の導入、ラット遺伝子のヒト由来遺伝子への置き換え(遺伝子ヒト化動物)に成功しました(図2)。

今後、これら二つのノックイン法は、マウスやラットなどのみならず様々な生物種における遺伝子改変操作の効率を向上させ、新しい遺伝子組み換え生物の作製に非常に有用な技術になることが期待されます。また、作製された遺伝子改変動物は、創薬研究、トランスレーショナル研究、再生医療研究などへの幅広い利用が期待されます。

本研究成果は、平成28年1月20日(水)に英国ネイチャー出版グループ オープンアクセス誌「Nature Communications」から公開されます。

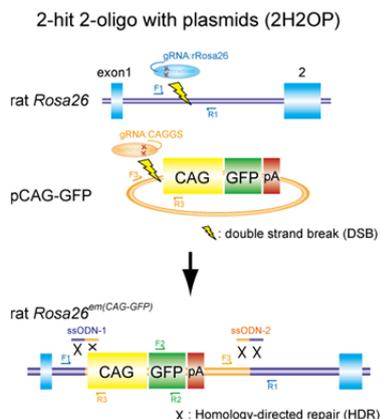


図 1. 2H2OP 法の略図

一本鎖 DNA(ssODN)を‘のり’として利用することで、プラスミドを標的部位へ効率的にノックインできる。



図 2. 2H2OP 法により作製された GFP ノックインラット。ノックイン個体は全身で緑色蛍光タンパク質を発現するため、全身が緑色の蛍光を発する。



大阪大学
OSAKA UNIVERSITY

国立大学法人 大阪大学

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-1

TEL: 06-6877-5111 (代)

www.osaka-u.ac.jp



大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構

国立遺伝学研究所

Press Release

❖ 研究の背景と成果

CRISPR/Cas の登場により、マウス、ラットなどにおける遺伝子改変が簡単になりました。動物の受精卵に Cas9 のメッセンジャーRNA と gRNA を導入することで、gRNA が標的となる DNA 配列を認識し、Cas9 がその標的部位を切断します。切断された DNA 部位は非相同末端結合(non-homologous end joining)により修復されますが、その際に、DNA 変異が導入されることで、遺伝子を破壊(ノックアウト)できます。また、Cas9/gRNA と一緒に、ドナーDNA となる一本鎖オリゴ(ssODN)を導入すると、ドナーDNA を利用した相同性修復(homology-directed repair)により切断部位が修復され、1~数十塩基(bp)の DNA 配列を導入(ノックイン)することができます。しかしながら、これまで ssODN は 200 bp 程度までしか合成できず、そのため ssODN を用いて GFP などの大きなサイズの DNA 配列をノックインすることが困難でした。一方、より長い配列を保持できる DNA プラスミドをドナーDNA として用いた場合、受精卵では相同組換え効率が低いため、プラスミド DNA をノックインすることが困難でした。

本研究の成果は以下になります。

- 1) Cas9 発現プラスミドのターミネーター配列にポリアデニン鎖 polyA を付加することで、受精卵での Cas9 タンパク質の発現が上昇しました。この Cas9-polyA を利用して、受精卵でのゲノム編集効率を向上させることができました。
- 2) バイオダイナミクス研究所との共同研究により、長鎖の一本鎖 DNA (lsODN)の作製方法を新たに開発し、lsODN をドナーDNA として用いることで効率的および正確に GFP 配列をノックインすることに成功しました。
- 3) CRISPR/Cas システム(Cas9 mRNA、二つの gRNA)を‘はさみ’として、一本鎖 DNA(ssODN)を‘のり’として利用する方法(2 ヒット 2 オリゴ法:2H2OP と命名)を開発し、CAG-GFP 配列 5.5 kbp のプラスミドを標的部位へ効率的にノックインしました。
- 4) この 2H2OP 法を利用することで、これまでノックインが不可能だった大きなサイズ(200-kbp)である BAC プラスミド^{※7}(ヒト *SIRPA* 遺伝子配列全体を含む)をノックインすることに成功しました。
- 5) 最後に、三つの gRNA を利用する 3H2OP 法により、DNA 切断部位を増やすことで、ラット *Cyp2d* クラスター遺伝子座 58 kbp をヒト *CYP2D6* 遺伝子 6.2 kbp に置換することに成功しました。

❖ 本研究成果が社会に与える影響 (本研究成果の意義)

今回、CRISPR/Cas システム と一本鎖オリゴを組み合わせることで大きなサイズの DNA 配列を効率的にノックインする二つの新しい方法(lsODN 法と 2H2OP 法)を開発しました。1) lsODN を利用することで、GFP や DsRed などのレポーター遺伝子を正確にノックインできるため、マウスやラットの遺伝子を標識することができるようになりました。2) 2H2OP 法を利用することで、これまで不可能であった BAC プラスミドのノックイン、遺伝子クラスターを含む DNA 領域の置換などが可能になりました。例えば、マウスやラットの遺伝子をノックアウトすると同時に、ヒト遺伝子をノックインした「遺伝子ヒト化動物」^{※8}の作製が可能です。

今回の新しいノックイン技術は、マウスやラットなど様々な動物における遺伝子改変操作の効率を向上させるとともに、作製された遺伝子改変動物は、創薬研究、トランスレーショナル研究、再生医療研究などに幅広く利用されることが期待されます。



大阪大学
OSAKA UNIVERSITY

国立大学法人 大阪大学

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-1

TEL: 06-6877-5111 (代)

www.osaka-u.ac.jp



大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構

国立遺伝学研究所

Press Release

❖ 用語解説

<用語解説>

※1 CRISPR/Cas システム

CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)とは、細菌や古細菌のゲノム DNA に存在する繰り返し配列のことで、1987 年、大阪大学中田篤男らにより初めて発見されました。CRISPR から転写されたガイド RNA(gRNA)が標的とする DNA 配列を認識して、DNA を切断する酵素 CRISPR-associated protein(Cas9)と一緒に複合体として、標的とする DNA 配列を切断します。この CRISPR/Cas システムを利用することで、細胞や植物、動物などで効率的な遺伝子改変(ゲノム編集)が可能となりました。

※2 一本鎖オリゴ

一本鎖オリゴ(ssODN: single-stranded oligodeoxynucleotide)とは、一本鎖の直鎖状 DNA のことです。CRISPR/Cas システムと一緒に、通常、両末端に 40-60 bp の相同配列(homology arms)が付加された ssODN をドナー DNA として利用することで、効率的なノックインが可能です。ssODN は化学合成により作られますが、安定して正確に合成できる最大長は、現時点では 200 塩基程度です。

※3 遺伝子改変動物

遺伝子改変動物は、遺伝子の機能を個体レベルで調べる目的で、あるいは、ヒト遺伝性疾患のモデル動物として利用されています。遺伝子改変動物には、遺伝子を破壊する‘ノックアウト’と遺伝子を挿入する‘ノックイン’の 2 種類があります。遺伝子改変動物を作製するためには、これまで、胚性幹(ES)細胞が利用されてきましたが、CRISPR/Cas システムの登場により、短期間で効率的に行われるようになりました。

※4 IsODN(長鎖一本鎖 DNA)法

1 から 3 k(キロ)bp ほどの長い一本鎖オリゴ(IsODN: long single-stranded oligodeoxynucleotide)のことで、バイオダイナミクス研究所との共同研究により、作製することに成功しました。作製した IsODN は、ssODN と同様にドナー DNA として利用でき、CRISPR/Cas システムを組み合わせることで効率的にノックインできます。

※5 2H2OP(2 ヒット 2 オリゴ)法

プラスミド DNA などの大きな DNA 配列を導入するために開発した方法で、CRISPR/Cas システムを‘はさみ’として、一本鎖オリゴ(ssODN)を‘のり’として利用します。ゲノム上の標的配列と、導入したいプラスミド DNA を、それぞれ設計した二つの gRNA(はさみ)で切断し、切断点を結合させるために二つの ssODN(のり)を利用することで、相同配列がなくても効率的にプラスミドを導入することができます。

※6 GFP 遺伝子

2008 年にノーベル化学賞を受賞した下村脩氏によって発見された緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードする遺伝子。GFP 遺伝子を動物へ導入すると、体内で GFP が合成され、その組織・細胞は緑色の蛍光を発します。こうした GFP などのレポーター遺伝子をゲノム上の標的遺伝子の部分に導入することで、その遺伝子が機能する時期や場所を明らかにすることができ、生体内における生命現象を可視化することができます。

※7 BAC プラスミド

BAC (bacterial artificial chromosome) とは、大腸菌由来の人工染色体プラスミドのことです。100~250 kbp 程の長い染色体領域を DNA 断片としてクローン化することができることから、ヒト全ゲノム領域をクローニングした BAC ライブラリーが作製されています。



大阪大学
OSAKA UNIVERSITY

国立大学法人 大阪大学

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-1

TEL: 06-6877-5111 (代)

www.osaka-u.ac.jp



大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構

国立遺伝学研究所

Press Release

※8 遺伝子ヒト化動物

ゲノム編集技術によりヒト遺伝子をノックインすることで、ヒト遺伝子機能を持ったマウス・ラットを作製することができます。例えば、肝臓でヒト特有の代謝機能に関連するp450 遺伝子群や、ヒト免疫反応に関するMHC 遺伝子群などをノックインすることで作製できます。作製されたヒト化動物は、動物とは異なるヒト特有の生理的反応を示すことが期待され、薬物安全性試験や毒性試験、ヒト病態モデルなどに利用できます。

❖ 特記事項

〈研究助成〉

本研究の一部は、以下の事業の助成を受けて実施されました。

- ・ 独立行政法人日本学術振興会 科学研究費助成事業(基盤研究(B))

「実験用ラットにおけるゲノム編集基盤技術の開発」(課題番号:26290033、代表:真下知士)

- ・ 独立行政法人日本学術振興会 科学研究費助成事業(研究活動スタート支援)

「CRISPR/Cas9 を用いた多重遺伝子ノックアウトラット作製技術の開発」(課題番号:25890011、代表:吉見一人)

〈掲載論文〉

‘ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes’

「CRISPR-Cas システムと一本鎖オリゴによる受精卵での大きなゲノム領域のノックイン」

Kazuto Yoshimi^{1,2}, Yayoi Kunihiro^{1,3}, Takehito Kaneko¹, Hitoshi Nagahora⁴, Birger Voigt¹ and Tomoji Mashimo^{1,3}

吉見 一人^{1,2}、国広弥生^{1,3}、金子武人¹、長洞仁⁴、フォークト ビルガー¹、真下知士^{1,3}

¹Institute of Laboratory Animals, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8501,

²Mouse Genomics Resource Laboratory, National Institute of Genetics, Shizuoka 411-8540,

³Institute of Experimental Animal Sciences, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka 565-0871,

⁴BioDynamics Laboratory Inc., Tokyo 113-0033, Japan

¹京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

²国立遺伝学研究所系統生物研究センターマウス開発研究室

³大阪大学大学院医学系研究科附属動物実験施設

⁴株式会社バイオダイナミクス研究所

❖ 本件に関する問い合わせ先

真下知士(ましもともし)

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2

大阪大学大学院医学系研究科附属動物実験施設

吉見一人(よしみかずと)

〒411-8540 静岡県三島市谷田 1111

国立遺伝学研究所マウス開発研究室