

平成26年9月29日

～広島大学研究拠点（自立ステージ）紹介～
ゲノム編集研究拠点

[研究機能]

本学では、7月からの定例記者会見において「広島大学研究拠点」の紹介を行っています。第3回目となる今回は「ゲノム編集研究拠点」の研究概要についてご紹介いたします。

※ 広島大学研究拠点

広島大学では、研究において既に世界的水準にある自立型の研究拠点を含め、世界トップクラスの研究大学として、国際展開力・発信力を強化していくため、その中心的役割を担う「研究拠点」、10拠点を選定しています。これらの研究拠点には重点支援を行い、特に、活発な国際研究活動を通じた国際研究ネットワークの形成により国際発信力を向上し、本学の国際的評価の向上に寄与することを期待しています。

【お問い合わせ先】

（本拠点に関すること）

大学院理学研究科

教授 山本 卓

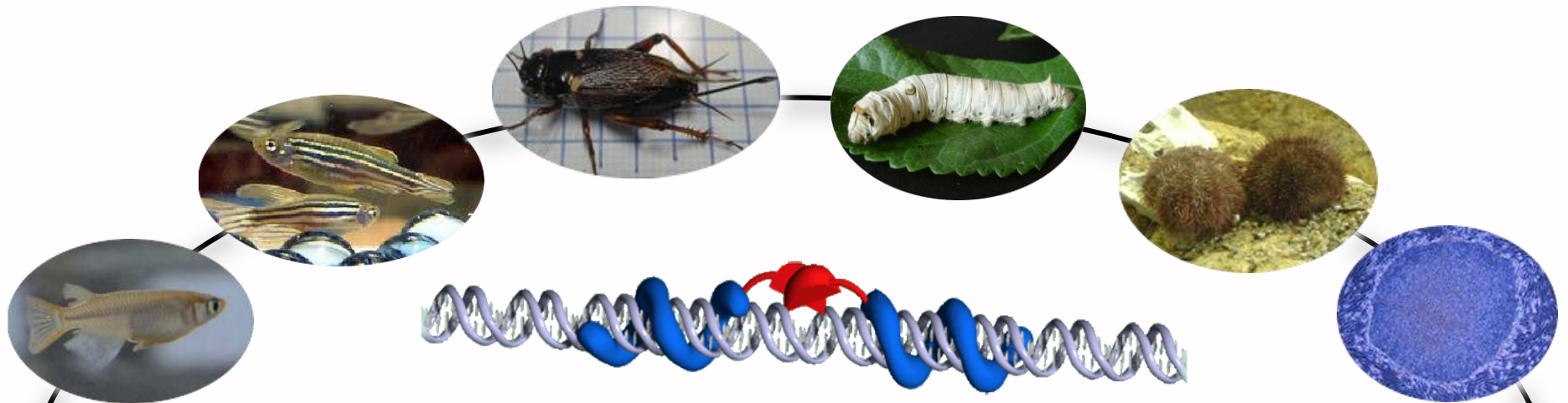
TEL: 082-424-7446

（研究拠点紹介に関すること）

学術・社会産学連携室広報グループ 楠本

TEL:082-424-6762 FAX:082-424-6040

September 29, 2014



広島大学研究拠点 「ゲノム編集研究拠点」

研究拠点リーダー

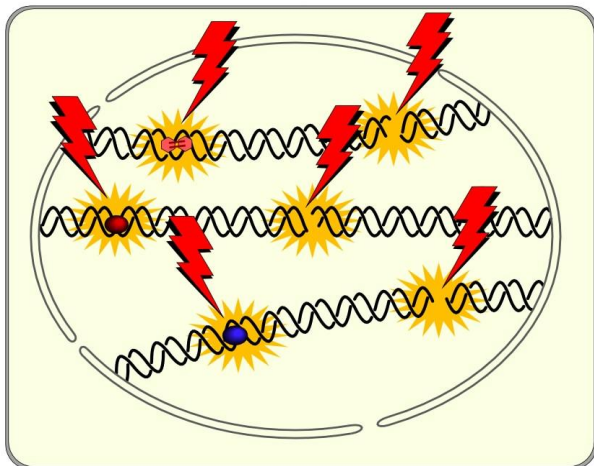
山本 卓（理学研究科・教授）



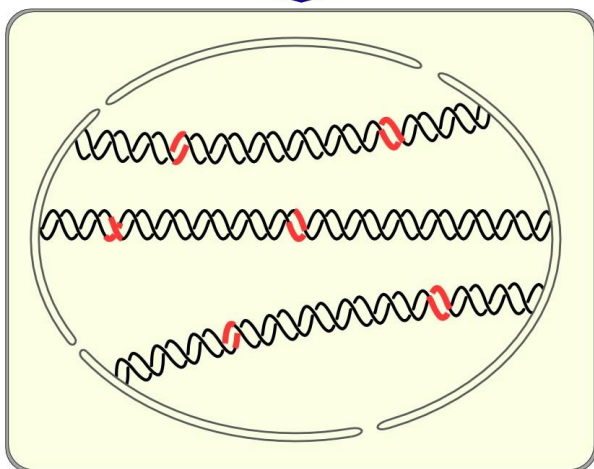
HIROSHIMA UNIVERSITY

細胞内でのゲノム遺伝子を改変する方法

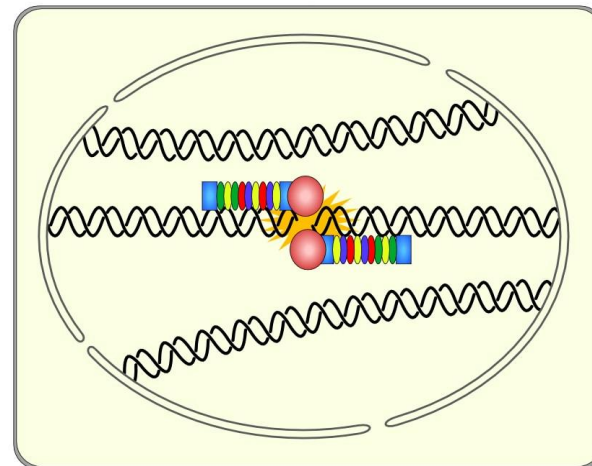
放射線・紫外線



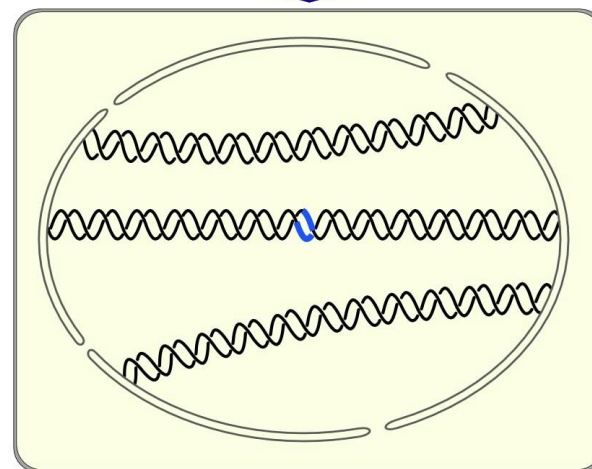
修復



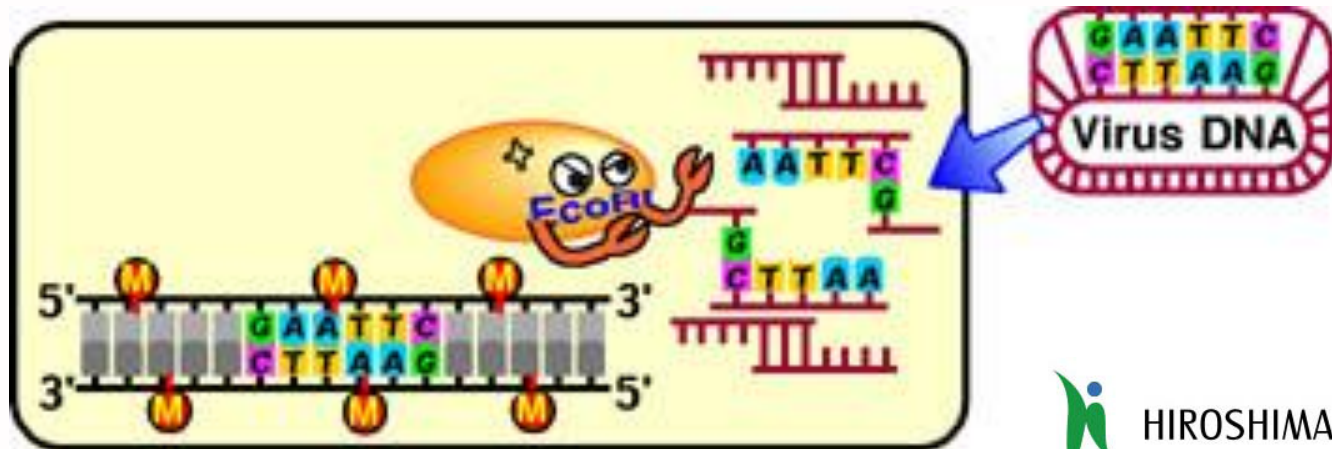
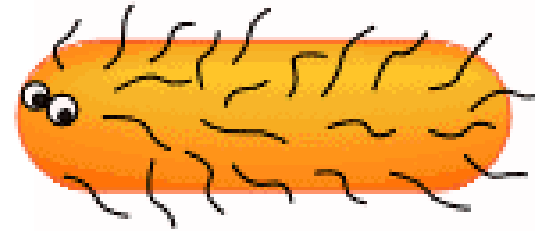
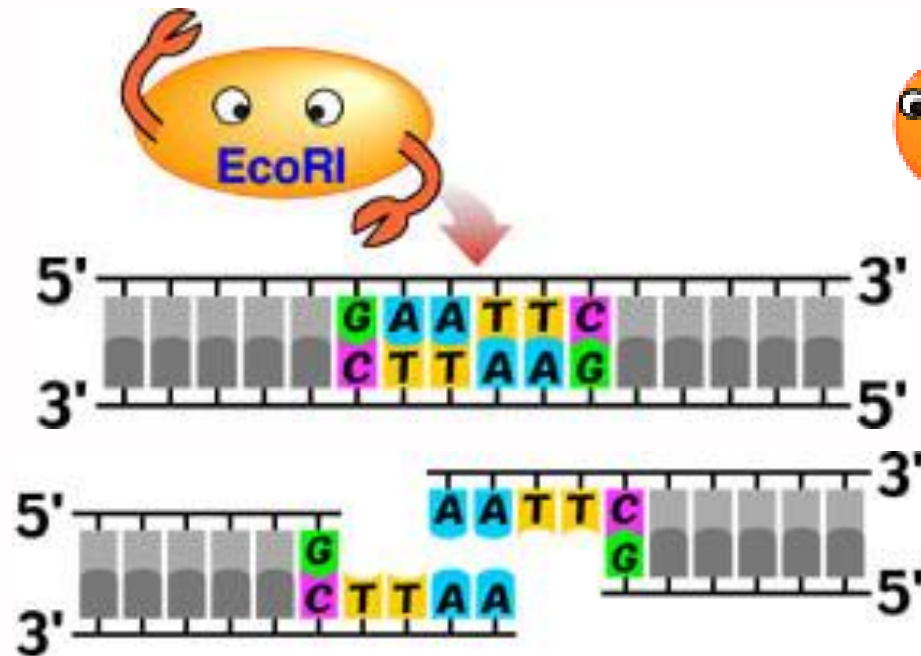
人工ヌクレアーゼ



修復

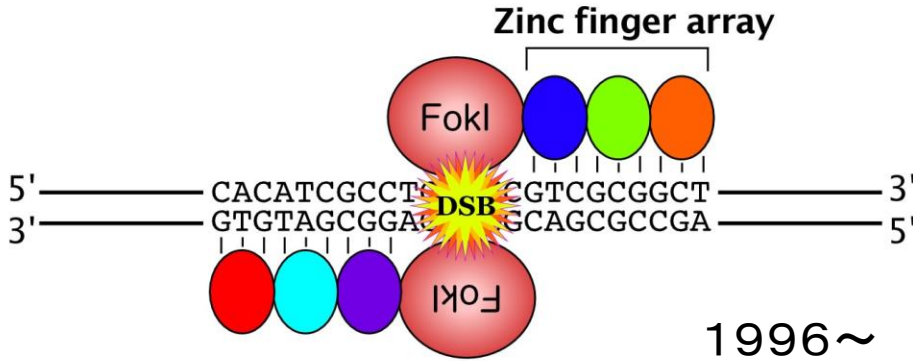


制限酵素（ヌクレアーゼ）は、もともと細菌がもっている酵素でバイオテクノロジーに活用されている

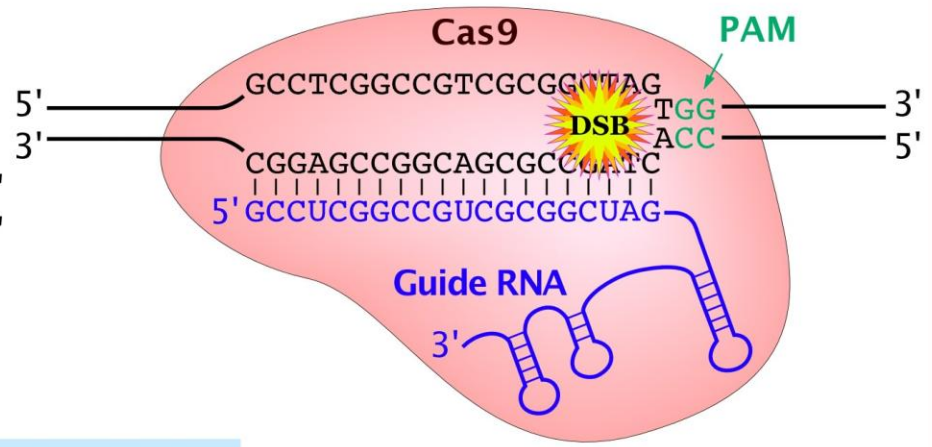


人工ヌクレアーゼとRNA誘導型ヌクレアーゼ

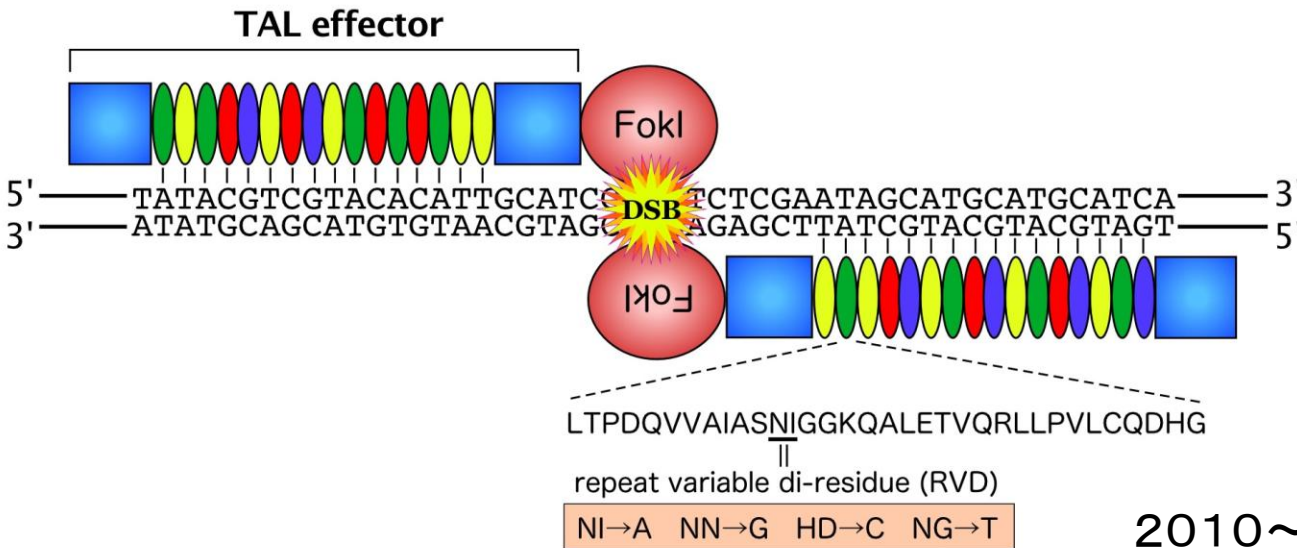
Zinc Finger Nuclease (ZFN)



CRISPR-Cas



Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN)

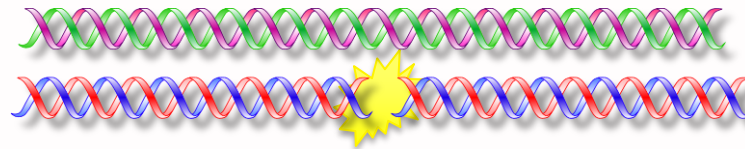
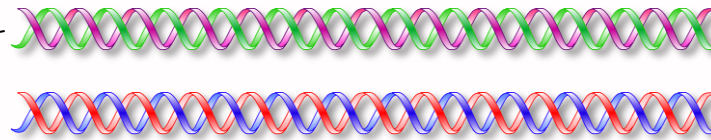


2010~



二本鎖DNAの切断 (DSB) は速やかに修復される

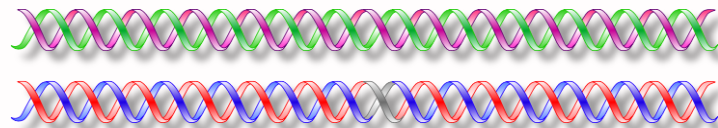
相同染色体
Homologous
chromosomes



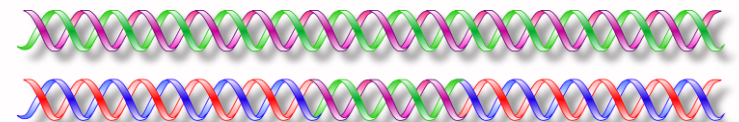
DSB

マイクロホモロジー
末端結合
(MMEJ)

DNA修復



Non-homologous End Joining
非相同末端結合(NHEJ)

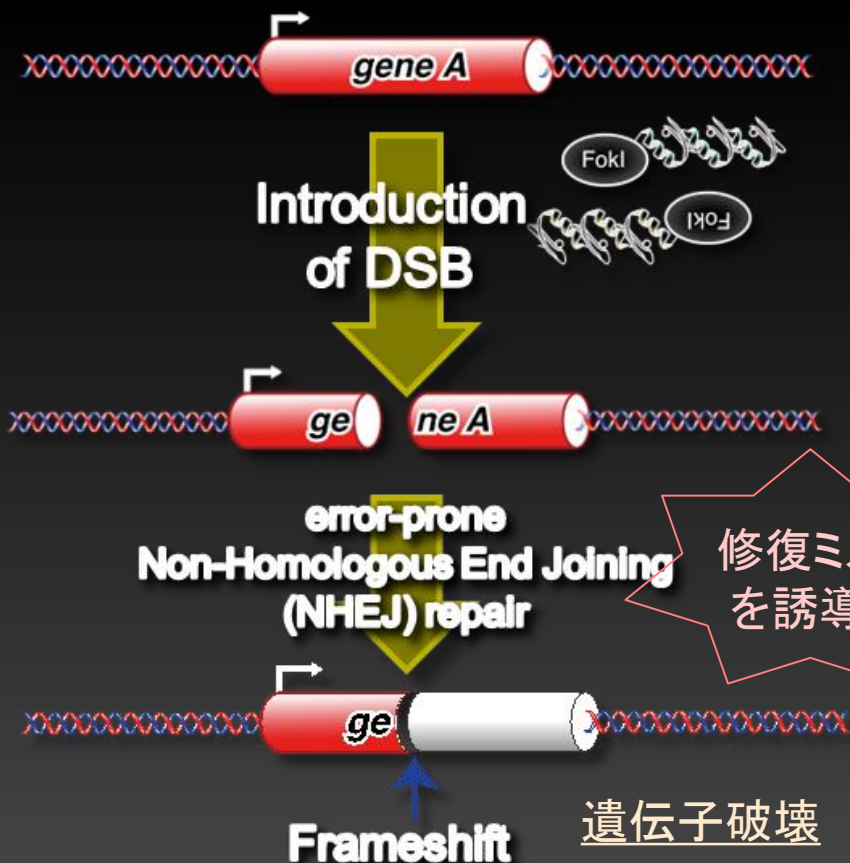


Homologous Recombination
相同組換え(HR)

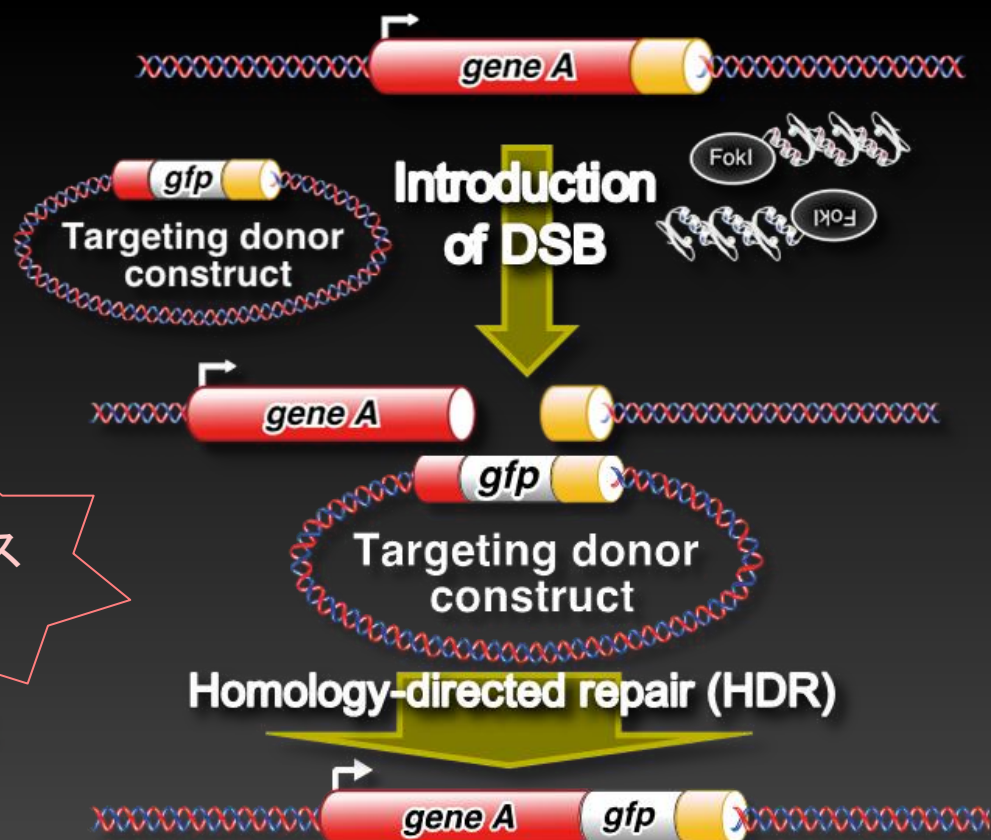


人工ヌクレアーゼを基盤とするゲノム編集

遺伝子ノックアウト



遺伝子ノックイン



- ・ゲノム編集がNature Methods誌のMethod of the year 2011
- ・TALENとCRISPR/CasがScience誌のBreakthroughの1つに選ばれる

第一世代のヌクレアーゼZFNを利用した コオロギ *lac2* 変異体の作製 (徳島大学との共同研究)

Lac2 ZFN
G2 (-/-)



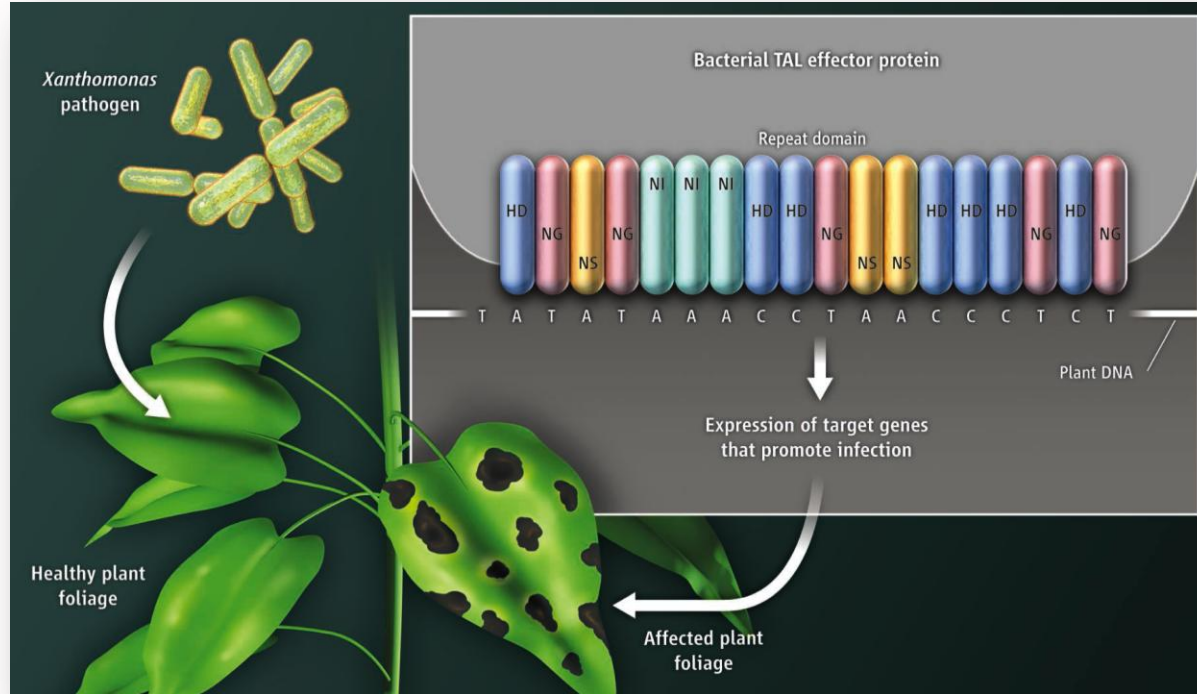
Lac2 ZFN
G2 (+/-)



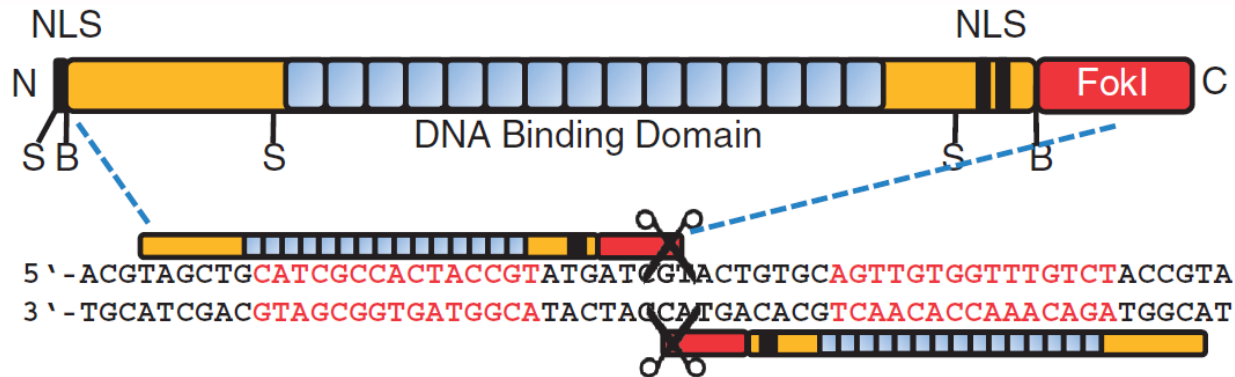
Control
(+/+)



第2世代の人工ヌクレアーゼ TALEN



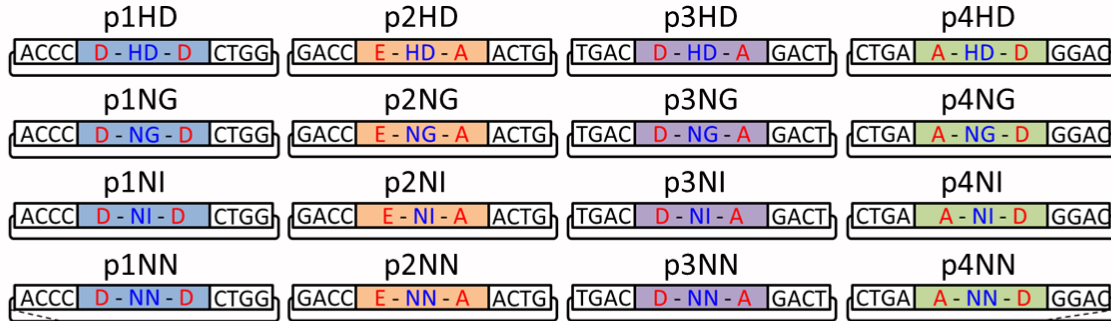
Voytas *et al.*, 2009



Cermak *et al.*, 2011

Platinum Gate TALEN 作製システム

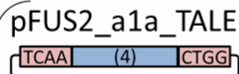
STEP 1



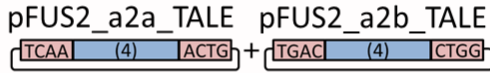
STEP 2

Number of modules

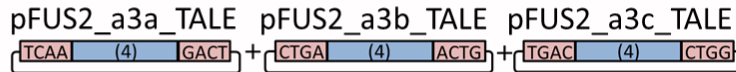
6-9



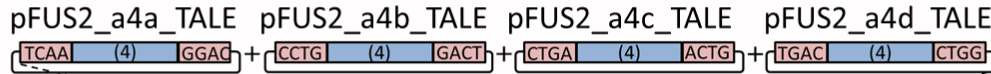
10-13



14-17



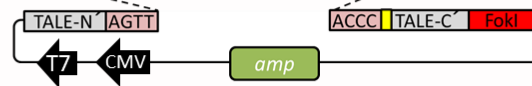
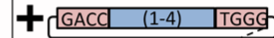
18-21



pFUS2_aXX or b(1-4)

pFUS2_aXX_TALE
 pFUS2_b(1-4)_TALE

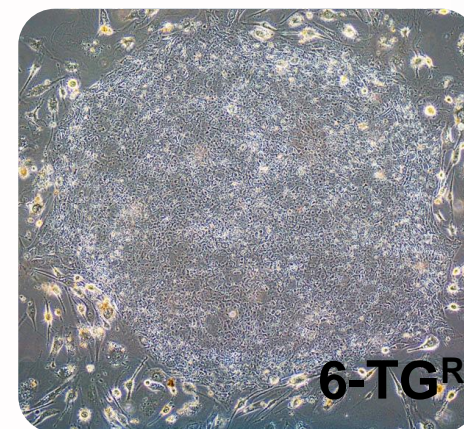
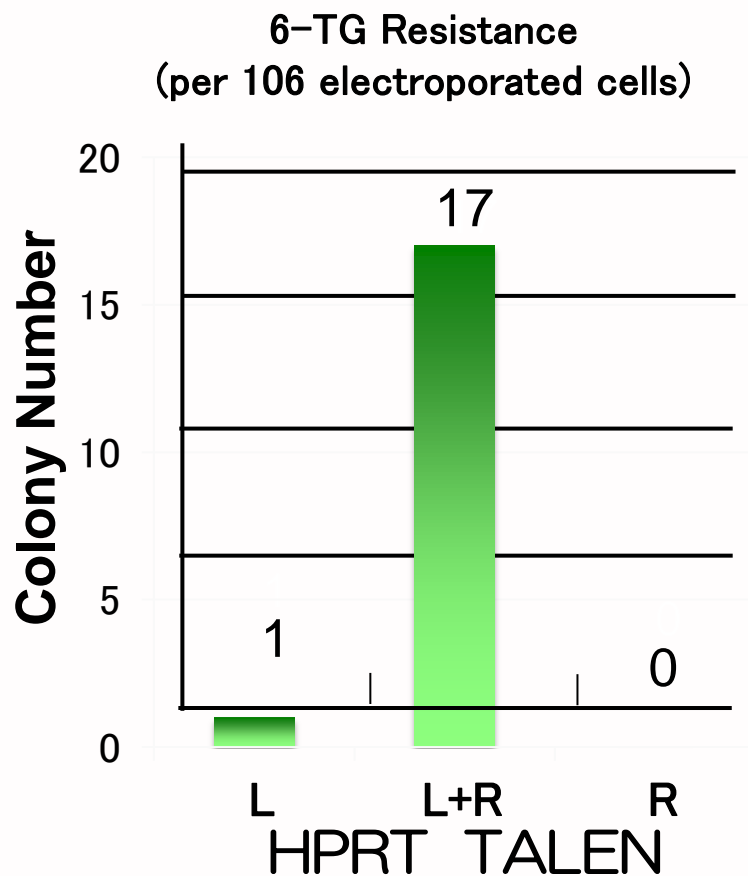
pFUS2_b(1-4)_TALE



ptCMV-153/47-VR-(HD, NG, NI, NN)
 ptCMV-136/63-VR-(HD, NG, NI, NN)

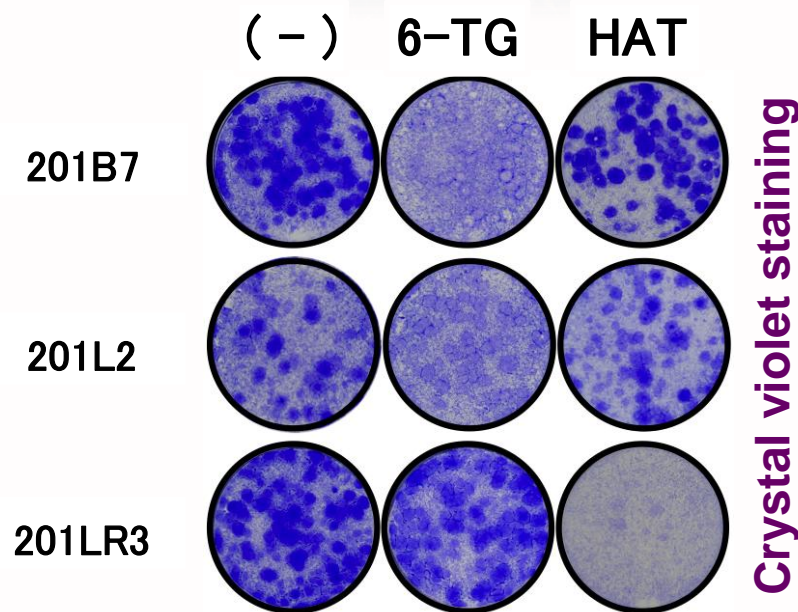


TALENを用いたヒト iPS細胞での標的遺伝子の破壊 (京都大学iPS研究所Woltjen 研究室との共同研究)



HPRT^{+/+} cells : 6-TG^S; HAT^R

HPRT^{-/-} cells : 6-TG^R; HAT^S



TALENを用いたiPS細胞の遺伝子改変が可能であることが示された。

Platinum TALENsを利用したカエルでの遺伝子改変 (両生類研究施設 柏木昭彦・啓子博士との共同研究)

Golden Gate *tyr* TALEN
(500 pg/egg)



Platinum *tyr* TALEN
(500 pg/egg)



プラチナTALENを用いて高効率にアルビノカエルを作製することに成功した。

科学の扉

遺伝子組み換え技術

目的とする機能を持つ外来遺伝子を細胞に導入する技術で、微生物を運び屋にして組み込む手法などがある。病に強い農産物や特定の遺伝子が働かない実験動物などに応用される。生物多様性条約に基づくカルタヘナ法で規制されている。

RNA

リボ核酸。DNAにある情報をもとに、たんぱく質が合成されるときにかかわる。DNAの配列がRNAにコピーされ、核の外に持ち出されてたんぱく質が作られる。DNAは2本、RNAは1本の鎖からなる。

今年一月には、中国の昆明大学のチームが、サルの変種卵の遺

伝子をカ所を交差させて出産に成功したと、米科学誌セルに発表した。人に応用するには倫理面の課題があるものの、病気の発症予防につながる技術だ。

京都大IPS細胞研究所の堀田秋津助教らは、筋ストロフィー患者の皮膚からIPS細胞を作製、病気の原因となる部分だけを削除し、修復することができた。筋肉の細胞が、患者に移植する治療法などが考えられるという。

大阪大微生物病研究所の伊川正人教授は「ゲノム編集は全くの可能性を秘めている。国際競争に負けないためには、国が支援し研究を進める必要がある」と話す。

「はさみ」でDNAを切断
遺伝子編集の鍵となる「ゲノム編集」という技術が注目されている。狙った場所を切断できる優れた「はさみ」が登場し、DNAの削除や切り張りなどが簡単に。病気の治療や動植物の品種改良に実用化に向けた研究が進む。だが痕跡が残らないため、新たな規制が必要との声も上がる。

ISPR/Cas9が登場、世界の研究者が飛びついた。従来の二つは作製が難しい人工たんぱく質を案内役にするのに対し、CRISPRは短いRNAの鎖を複数、安く購入でき、同時に複数の場所を切断できる。また、目的と違う場所にくっつき切断してしまう現象が起きやすい可能性はある。

広島大の山本卓教授は「様々なツールが登場し、基礎から応用まで、生命科学研究が大きく変わる可能性がある」と話す。米科学誌サイエンスは12年から2年連続で、ゲノム編集を「10大突破」に選んだ。従来の組み換え技術は、いすれ必要なく「という研究者も多い。

この技術は、農畜生産物の応用期待されている。しかし、従来の遺伝子組み換え生物を対象にした規制では対応できないという課題が浮上っている。

2日付「細胞の初期化」の図中、イモリの目的の再生のからくりを説明する「江口晋明氏」と岡田節人氏の実験(1973)は、ニトリの細胞を使ったもので、イモリの細胞を用いた実験は、74年に江口氏のほか、安部真一氏、渡辺憲二氏の3人が手がけています。「動物の再生能力」の説明でも同様の記述があり、あわせて訂正します。

DNAの削除や挿入、DNAは修復しようとするが、はさみは何度でも切ろうとする。この繰り返しで、ついには一部の塩基配列が失われたりする。修復配列が取り込まれたりする。修復ミスを利用して、望む遺伝子に改造するという原理だ。

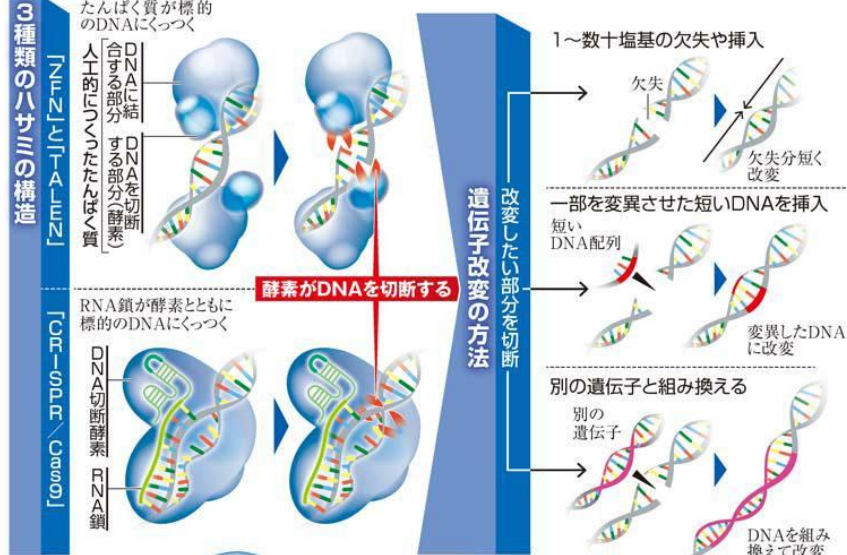
はさみは3種類ある。1996年登場の「ZFN」は高額で使い勝手が悪く広がらなかったが、2010年の「TALEN」は「N」は研究室でも作れ、脚光を浴びた。そして昨年、より作製が簡単で応用範囲も広い「CR

はさみ」でDNAを切断
遺伝子編集の鍵となる「ゲノム編集」という技術が注目されている。狙った場所を切断できる優れた「はさみ」が登場し、DNAの削除や切り張りなどが簡単に。病気の治療や動植物の品種改良に実用化に向けた研究が進む。だが痕跡が残らないため、新たな規制が必要との声も上がる。

界の突然変異と見分けにくい。規制対象となるかどうかは世界で議論が続いている。米農務省は10年、「数塩基を削除しただけのもの」として、規制の対象にならないという見解を示した。一方、ニュージーランドでは5月、規制にあたらなければならない環境庁の見解に、高裁が異議を唱える判決を出した。

北海道大の石井哲也特任准教授は「確率は低くても標的外的の変異が起るリスクはある。アレギーの原因となったり、生態系に影響を与えたりしかねない。ゲノム編集で作った農作物が輸入されるかもしれない。新たな規制を検討すべきではないか」と話す。

狙い定めてゲノム編集



ゲノム編集の応用

- 生命現象の解明
- 病気の特徴を持つ実験動物の作製
- 病気の治療法
- 人間にとって役に立つ農畜産物の作製
- バイオエネルギーの開発

グラフィック・大塚 昌敏

ゲノム編集技術の可能性

(1) どんな生物でも利用できる。

- ・動物や植物、微生物でもOK!!
- ・ES細胞やiPS細胞の遺伝子改変にも使える

(2) 人工ヌクレアーゼは消えてしまうので、痕跡は残らない。

- ・小さな変異なら自然の突然変異との区別が難しい
- ・新しい品種改良技術となる可能性 → バイオ産業の活性化?

(3) 目的の遺伝子だけを変化させることができる。

- ・ランダム変異導入に比べて安全

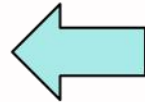
(4) 遺伝子疾患の治療などや再生医療を可能にする

- ・iPS細胞での遺伝子修復
- ・創薬スクリーニングのための培養細胞や動物の作製
- ・エイズやがんの治療薬?



ゲノム編集の農水畜産物の品種改良での利用

ブタやウシ

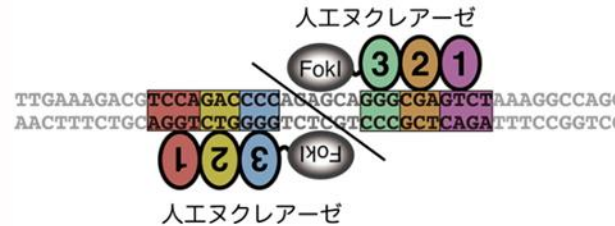


人工ヌクレアーゼ
による遺伝子破壊

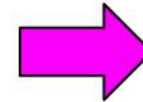
次世代の作出



有用なブタやウシ
(おいしい肉、
やわらかい肉質)



病気に弱い
がおいしい



病気に強くておいしい品種

病害虫に強いイネ
甘いトマト

ゲノム編集は品種改良に利用可能な新しい方法
(食品として利用可能?)



筋ジス患者のiPS細胞修復



筋ジストロフィー

遺伝子の異常で筋肉が衰えていく病気。最も多いデュシェンヌ型は男児で約3500人に1人が発病する。症状が軽いタイプもあるが、デュシェンヌ型は乳児期から歩き方などに症状が出始め、成人期に歩行や呼吸が難しくなり、死に至ることもある難病。iPS細胞から効率的に筋肉の細胞をつくり、筋ジストロフィーを再現する技術を京大が今年4月に発表した。

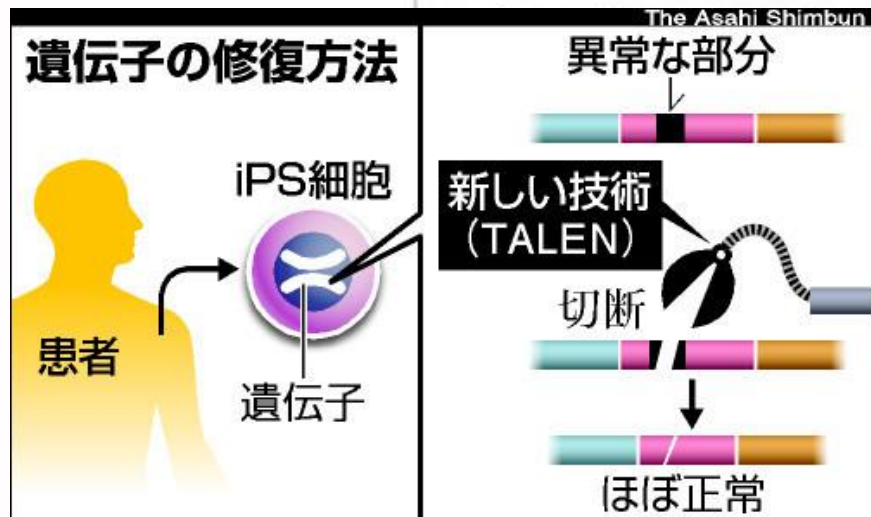
京都大、広島大などのグループは、特定の遺伝子を切る新たな技術を使い、筋ジストロフィー患者のiPS細胞を修復することに成功した。がん化の恐れが少ない新たな遺伝子治療につながると期待される。京大iPS細胞研究所の堀田秋津・特定拠点助教(遺伝子工学)からは、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型という最も多いタイプの患者の皮膚からiPS細胞をつくった。

遺伝子切除の新技术 京大・広大

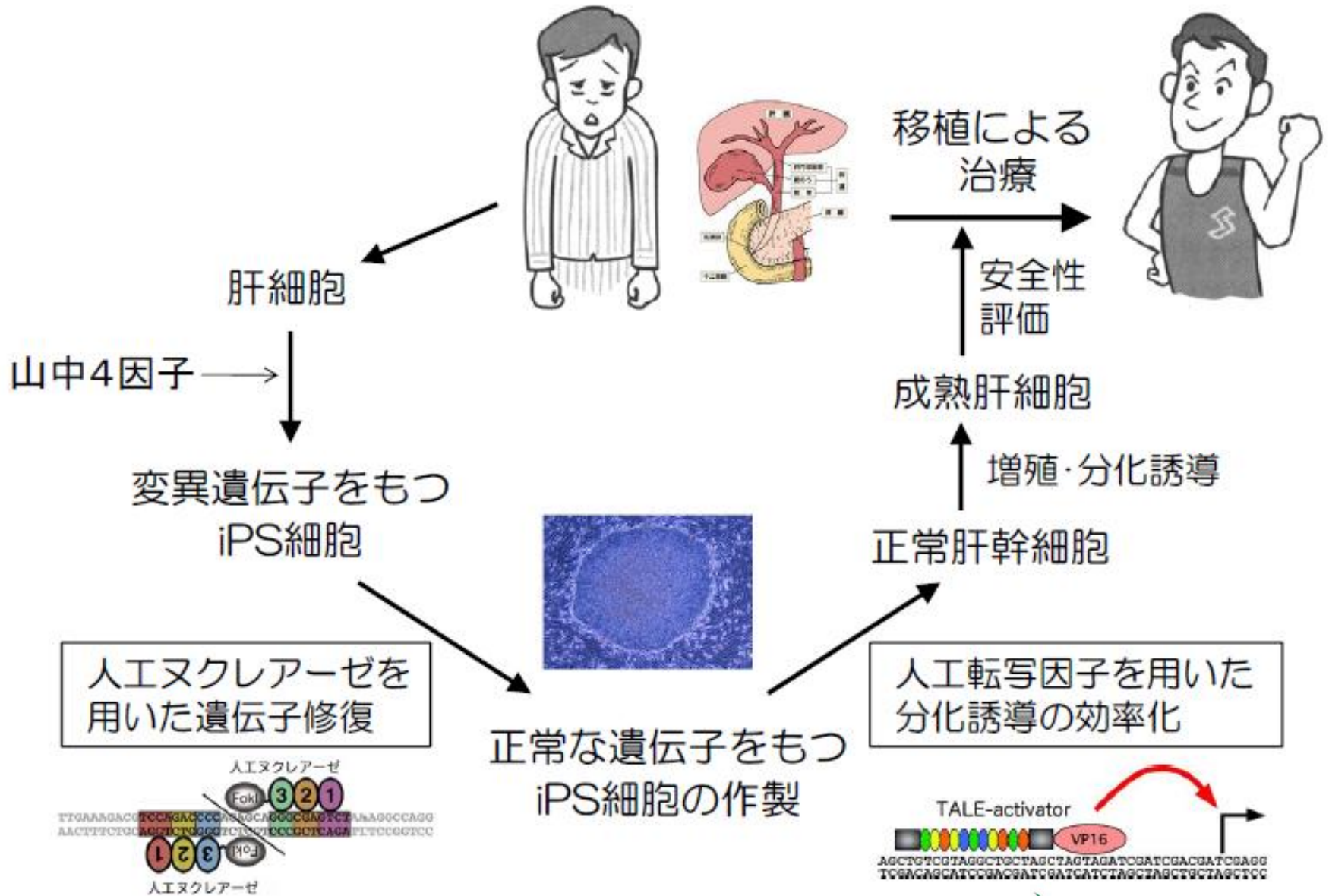
堀田さんらは、目的の遺伝子だけを切れるTALENという新しい技術で、患者のiPS細胞のこの遺伝子から余計な部分を削り、ほぼ正常な状態に戻した。さらに、このiPS細胞を筋肉に変えると、修復された遺伝子が働き出すことを確かめた。

これまでの遺伝子治療は運び屋となるウイルスなどを使って、正常な遺伝子を細胞に入れる方法だが、デュシェンヌ型の原因遺伝子は大きすぎて運べなかった。また、この技術は目的の遺伝子だけに作用し、ほかの遺伝子を傷つけないので安全性が高いという。

朝日新聞
平成25年5月9日
掲載



ゲノム編集の再生医療での利用可能性



ゲノム編集コンソーシアム

Genome Editing Consortium

運営メンバー：山本 卓、野地澄晴、芹川忠夫、刑部敬史
川原敦雄、笹倉靖徳、阿形清和

活動目的

- 人工ヌクレアーゼの作製・開発およびゲノム編集
- ゲノム編集に関する情報交換および共同研究の推進
- ゲノム編集の広報、啓発活動
- ゲノム編集を核とした産学官の連携

活動状況

- 第1回人工ヌクレアーゼ(ZFN)作製講習会(2011. 1. 20-21, 東広島)
- 遺伝子改変技術シンポ開催(2011. 7. 11-12, 岡崎)
- 第2回人工ヌクレアーゼ(TALEN)作製講習会(2012. 1. 23-26, 東広島)
- 第1回ゲノム編集研究会(2012. 2. 28-29, 東広島)
- 第3回人工ヌクレアーゼ(TALEN)作製講習会(2012. 1. 23-26, 東広島)
- 第2回ゲノム編集研究会(2012. 9. 20, 岡崎)
- 第4回人工ヌクレアーゼ(TALEN)作製講習会(2012. 10. 23-25, 東広島)
- 第5回人工ヌクレアーゼ(TALEN)作製講習会(2013. 1. 29-31, 東広島)
- 第6回人工ヌクレアーゼ(TALEN)作製講習会(2013. 4. 23-25, 東広島)
- 第3回ゲノム編集研究会(2013. 10. 26-27, 東広島)
- 第7回人工ヌクレアーゼ(TALEN)作製講習会(2014. 3. 26-28, 東広島)
- 第4回ゲノム編集研究会(2014. 10. 6-7, 東広島)

第3回ゲノム編集研究会 (H25.10.26-27日、東広島)



岡本副学長からのあいさつ

広島大学研究拠点「ゲノム編集研究拠点」

広島大学

【人材育成】

人工ヌクレアーゼ作製トレーニングコース、
変異導入トレーニングコース

理学研究科



★ 本学独自の作製システム
とオリジナル酵素

生命現象を
解明する

【新型酵素の開発】

ゲノム編集プラットフォームの確立

高活性型人工ヌクレアーゼの量産化

人工ヌクレアーゼの作製・開発・活用と人材育成

生物圏科学研究科

原爆放射線医学研究所

医歯薬保健学研究科

病院

【基礎および応用研究】

DNA修復機構を解明する

疾患モデル細胞の作製と研究

iPS細胞の遺伝子改変を行う

ウィルス感染の抑制研究

甘いトマトやおいしい肉のブタを作る

・京都大学理学研究科
・大阪大学生命機能研究科
・理化学研究所
・ブラウン大

・京都大学iPS研究所
・慶應義塾大学医学部
・鳥取大学染色工学センター

・筑波大学遺伝子実験施設
・麻布大学獣医学部
・大阪大学工学研究科

企業との共同開発
・遺伝子導入機器の改良
・変異導入細胞株の単離法

ゲノム編集コンソーシアム(GenEdiC)ー代表:広島大学

希望する大学・研究所・企業参入

次世代人工ヌクレアーゼ技術の標準化

基礎研究への貢献

疾患研究と再生研究への貢献

新薬の開発への貢献

バイオ産業の活性化に貢献