

【本件リリース先】  
文部科学記者会、科学記者会、  
広島大学関係報道機関



広島大学

広島大学広報室  
〒739-8511 東広島市鏡山 1-3-2  
TEL : 082-424-4383 FAX : 082-424-6040  
E-mail: koho@office.hiroshima-u.ac.jp

NEWS RELEASE

令和6年4月16日



純国産ゲノム編集ツール「Zinc Finger-ND1」の高機能化に成功  
～産業応用可能なゲノム編集法として期待～

論文掲載

【本研究成果のポイント】

- ゲノム編集ツール「Zinc Finger-ND1」を効率よく作製する方法を発見し、またその機能の向上に成功しました。
- ゲノム編集の産業利用への一助となることが期待されます。

【概要】

広島大学ゲノム編集イノベーションセンターの片山翔太特任准教授、山本卓教授、医系科学研究科の野村渉教授、産業技術総合研究所の渡邊真宏主任研究員、加藤義雄グループ長らのグループは、構造モデリングに基づく改変により、純国産ゲノム編集ツール「Zinc Finger-ND1」の高機能化に成功しました。

本研究成果は、「Advanced Science」(IF=15.1)に令和6年4月11日付でオンライン掲載されました。

<発表論文>

論文タイトル

Engineering of Zinc Finger Nucleases through Structural Modeling Improves Genome Editing Efficiency in Cells

著者

片山 翔太<sup>1,\*</sup>、渡邊 真宏<sup>2</sup>、加藤 義雄<sup>3</sup>、野村 渉<sup>4</sup>、山本 卓<sup>1, 5,\*</sup>

1. 広島大学ゲノム編集イノベーションセンター
2. 産業技術総合研究所 機能化学研究部門 バイオ変換グループ
3. 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 構造創薬研究グループ
4. 広島大学大学院医系科学研究科
5. 広島大学大学院統合生命科学研究科

\* 責任著者

掲載雑誌

Advanced Science (IF=15.1) (Q1)

DOI 番号

DOI: 10.1002/advs.202310255

この研究成果は、COI-NEXT「バイオ DX 産学共創拠点」の支援を受けて研究を行い、得られたものです。

## 【背景】

標的 DNA を改変するゲノム編集ツールは、遺伝子細胞治療のための強力なツールです。主なゲノム編集ツールとして、最も使われている CRISPR-Cas、次に使われている TALEN、最も使われていない ZFN 等があり、そのうち、CRISPR-Cas や TALEN は基本特許が 2030 年以降まで継続しているため、医療分野への使用には高額なライセンスフィーの支払いが必要です。一方、ZFN は基本特許が 2020 年までに切れしており、ライセンスフリーで使用できるゲノム編集ツールです。DNA を認識する Zinc Finger と DNA を切断する FirmCutND1 Nuclease（広島大学で独自に開発）を組み合わせることにより、純国産ゲノム編集ツール「Zinc Finger-ND1」を作製することができます。しかし、機能的な ZFN を構築し、そのゲノム編集効率を向上させることは非常に困難でありました。

## 【研究成果の内容】

ZFN の作製は、従来、無作為に並べ替えた ZF から標的 DNA に結合する ZF を取ってくるスクリーニングによるものが主流でした。しかし、機能的な ZFN の作製までに 2 ヶ月ほどの時間を要し、かなりの時間と労力を要するものでした。また、ZF を遺伝子工学的に連結させる Modular Assembly と呼ばれる方法も考案されましたが、3-finger ZFN（ZF を 3 つ連結）を作製した場合、機能的な ZFN が得られる確率が 5% 程度であり、作製効率が悪く使い物になりませんでした。我々は、Finger の数が少ないことで認識する塩基数が少なくなり、機能的な ZFN の作製効率の低下をもたらしていると考えました。そこで、本研究では、6-finger ZF-ND1（図 1）を Modular Assembly を用いて作製し、認識する塩基数を多くしました。その結果、作製した 10 個の ZF-ND1 の中で、2 個の ZF-ND1 でゲノム DNA 切断活性を確認、つまり、20% の確率で機能的な ZFN を得ることに成功しました。

ZF-ND1 の機能をより高めるべく、我々は、構造モデリングの手法（AlphaFold, Rossetta, Coot による分子モデリング）を用いて、ZF と DNA の相互作用をモデリングしました（図 2）。Zif268（DNA に結合する天然の 3-finger ZF）の DNA との相互作用のモデルと比較して、5 個の変異導入候補が同定されました。さらに、Zif268 の DNA sugar-phosphate backbone と結合するアミノ酸と比較して、4 個の変異導入候補が同定されました。これら 9 個の変異候補を 1 つ 1 つ機能的な ZF-ND1 に導入したところ、3 個の変異（図 3）でゲノム DNA 切断活性の向上が見られました。V109K 変異においては、5% の切断活性の向上が見られ、構造モデリングに基づく、ZF-ND1 の高機能化に成功しました。

	TALEN	CRISPR-Cas	ZFN	
			3-Finger	6-Finger
創薬におけるライセンス料	100 億円以上（年間）	100 億円以上（年間）	不要	不要
作製の難易度	容易	かなり容易	かなり困難	困難
作製までの所要時間	数日	数日	2 ヶ月	数日
標的配列の認識	30~40 塩基	20 塩基	18 塩基	36 塩基

## 【今後の展開】

高機能化した ZF-ND1 は、*ex vivo*（がん治療や再生医療用の細胞作り）/*in vivo*（生体内）ゲノム編集治療に用いることができるものと考えられます。広島大学ではこれまでも、「Platinum TALEN」というゲノム編集ツールを独自に作成し、基礎研究に



【お問い合わせ先】

ゲノム編集イノベーションセンター 特任准教授 片山 翔太

Tel : 082-424-4008

E-mail : [shota-katayama@hiroshima-u.ac.jp](mailto:shota-katayama@hiroshima-u.ac.jp)

ゲノム編集イノベーションセンター センター長 山本 卓

大学院統合生命科学研究科 教授 山本 卓

Tel : 082-424-4008

E-mail : [tybig@hiroshima-u.ac.jp](mailto:tybig@hiroshima-u.ac.jp)

発信枚数 : A4版 4枚 (本票含む)

