

ゲノム編集技術を用いた簡便・正確・高効率な 遺伝子挿入法の開発 — ヒト培養細胞、カイコ、カエルで成功 —

説明者 鈴木賢一・佐久間哲史・中出翔太・坂根祐人（広島大学）
瀬筒秀樹・坪田拓也（農業生物資源研究所）

本研究成果の概略

- 人工DNA切断酵素とDNA修復機構の一つを利用して、染色体上の狙った位置に外来遺伝子を挿入する技術を開発
- ヒト培養細胞や両生類(カエル)において、目的タンパク質を可視化することに成功
- 昆虫(カイコ)においても、染色体上の狙った位置に蛍光タンパク質遺伝子を挿入することに成功

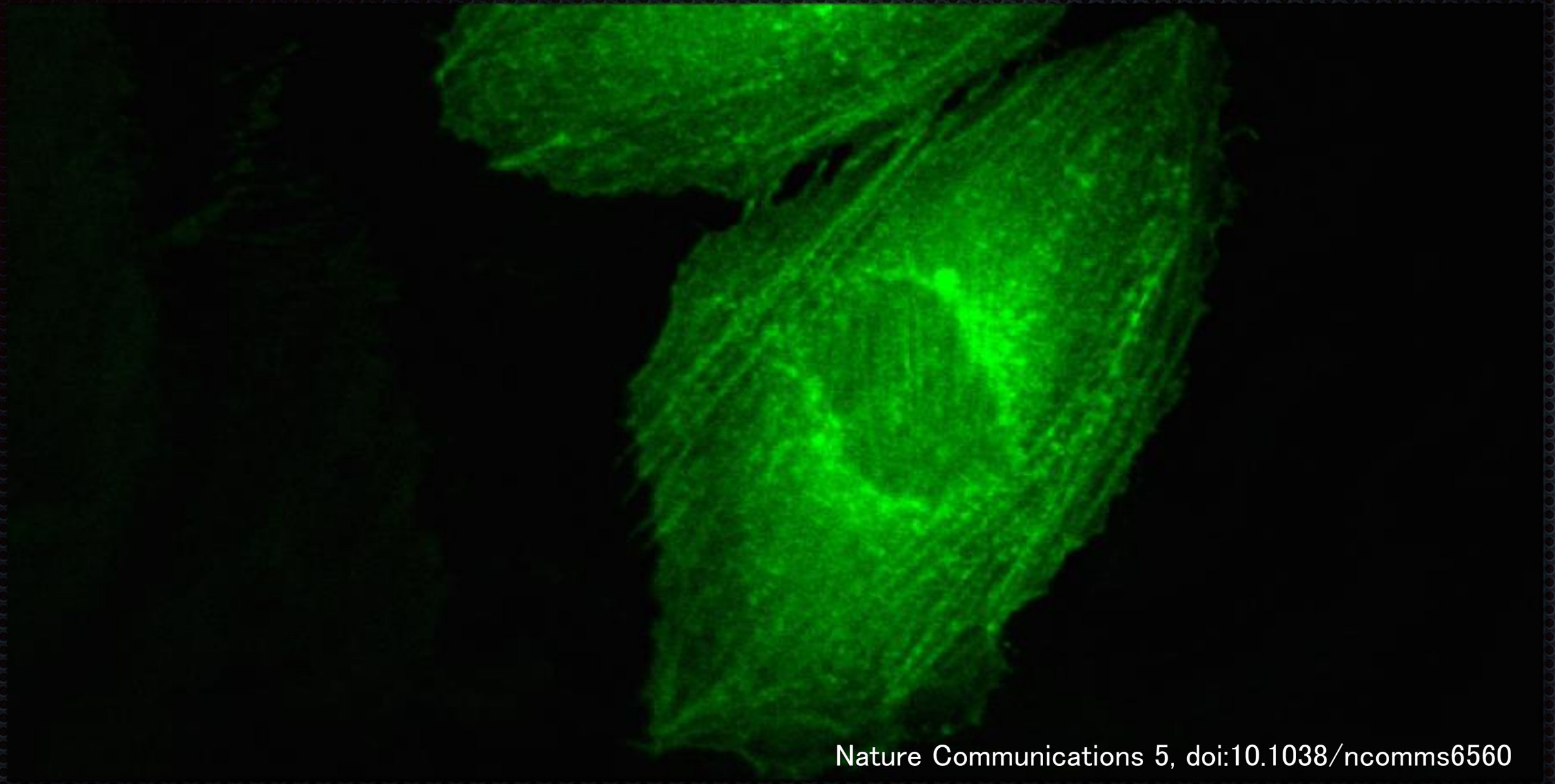
本研究成果は、11月20日(日本時間午後7時)、英国Nature Publishing Groupの科学雑誌『Nature Communications』のオンライン版に掲載。

【論文タイトル】

Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9

【著者】

Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, Yamamoto T, Sakuma T and Suzuki K



Nature Communications 5, doi:10.1038/ncomms6560

PITCh system

Precise Integration into Target Chromosome

標的染色体領域への正確な遺伝子挿入技術

PITChシステムとは

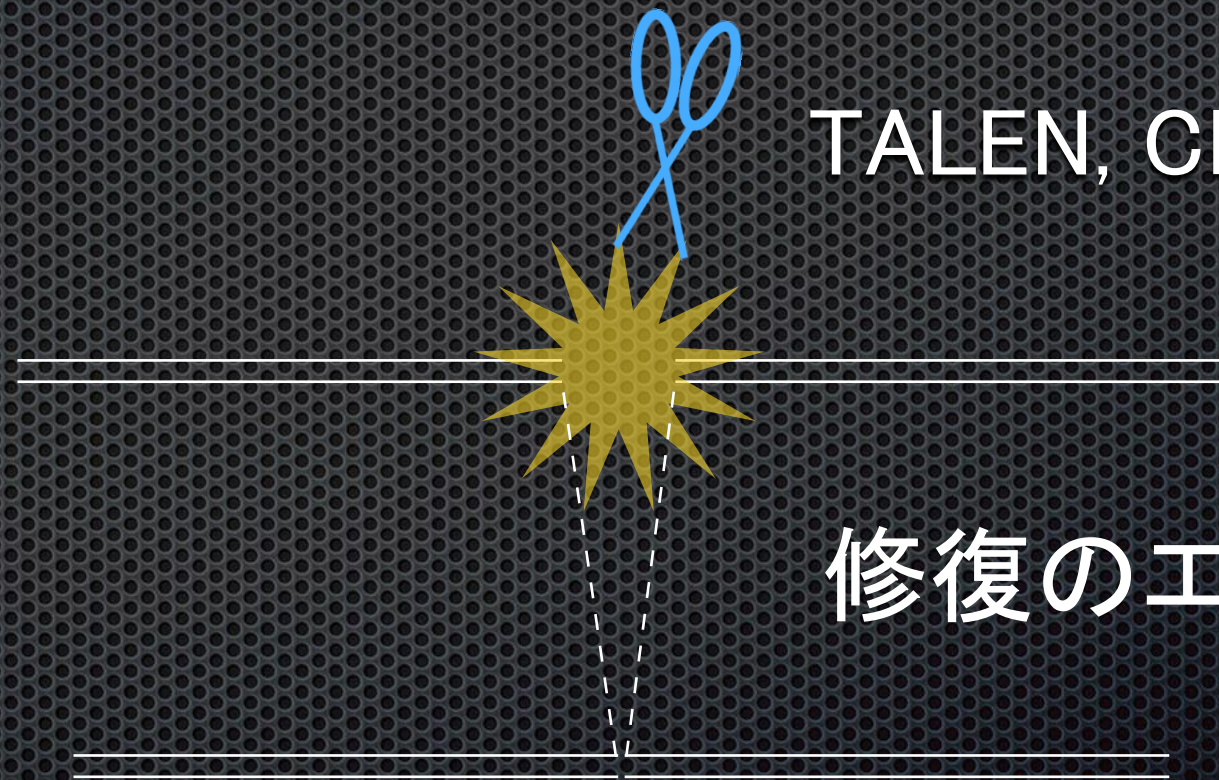
ゲノム編集技術を用いた

新規遺伝子ノックイン法

ゲノム編集とは

ゲノム上の特定の領域を切断することにより、
遺伝子配列を編集する技術

例) ゲノム編集ツールによるDNA二本鎖切断



TALEN, CRISPR/Cas9など

修復のエラー

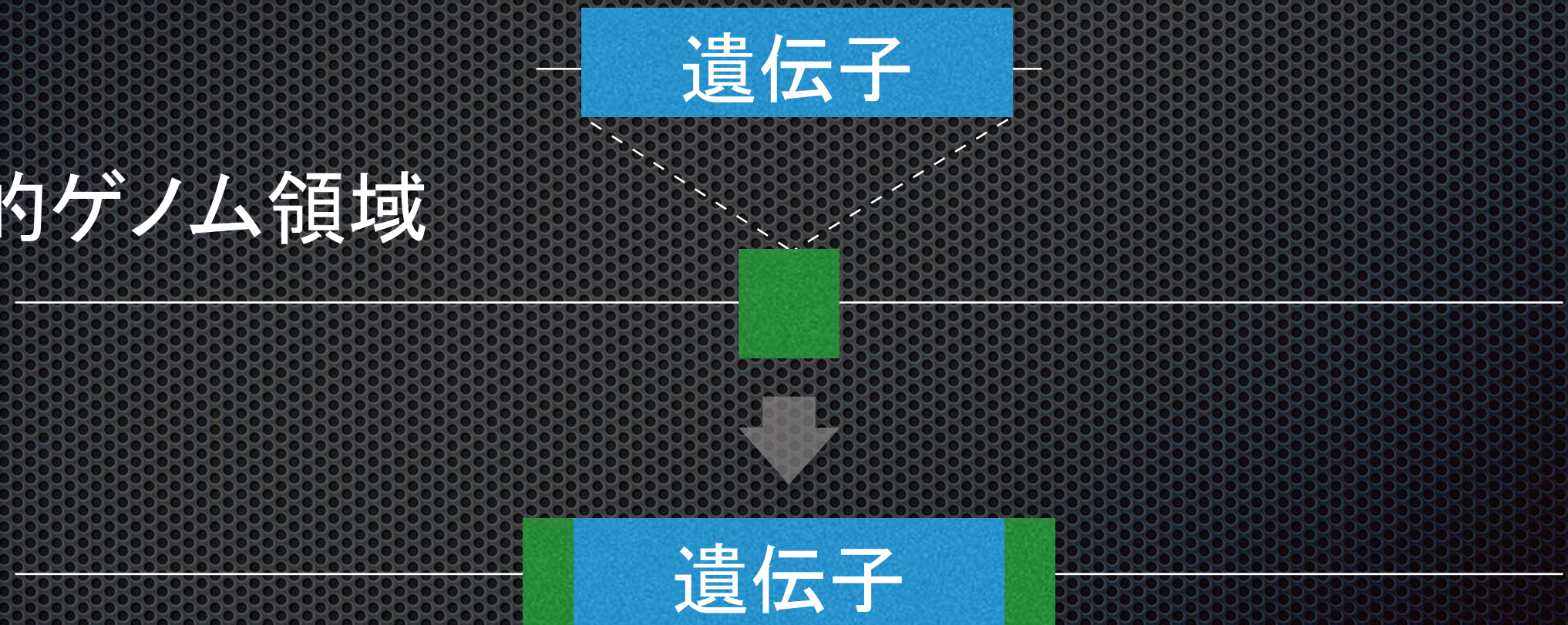
塩基の欠失など

遺伝子ノックインとは

ゲノム上の特定の領域に外来の遺伝子を挿入する技術

例)

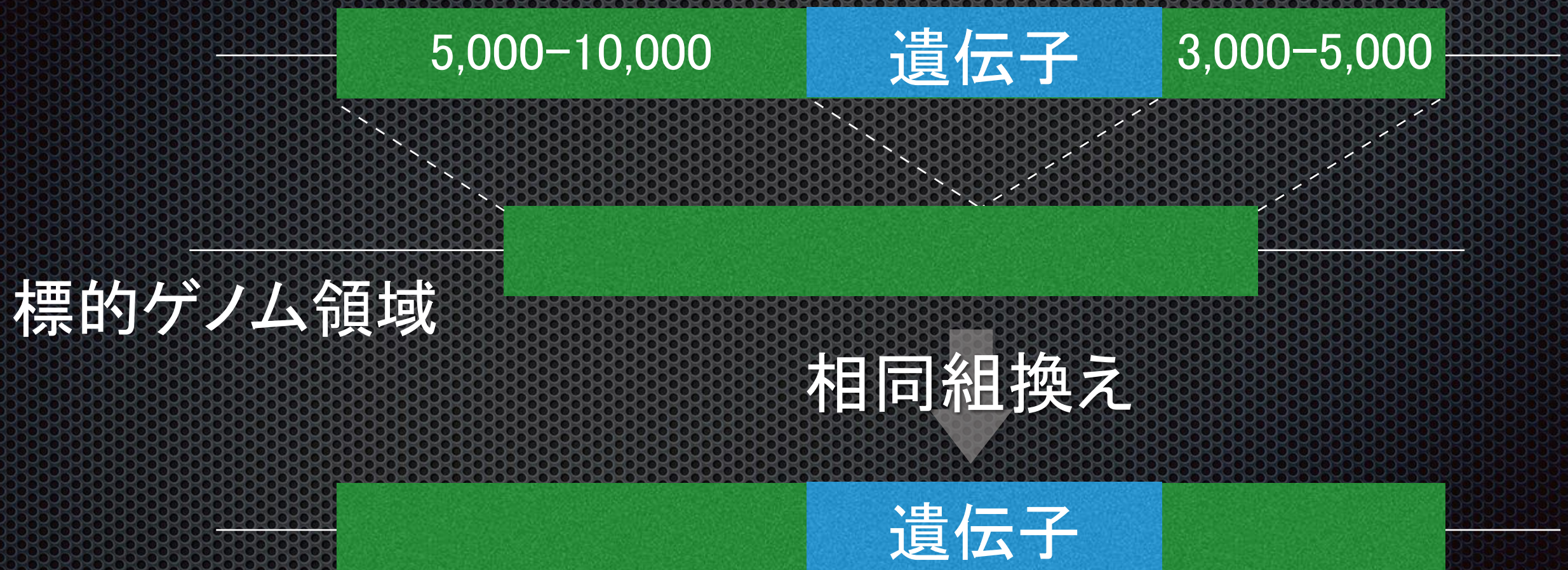
標的ゲノム領域



ただし、外来遺伝子をただ入れただけでは、標的のゲノム領域に狙って挿入することはできない

相同組換えを利用した遺伝子ノックイン(従来法)

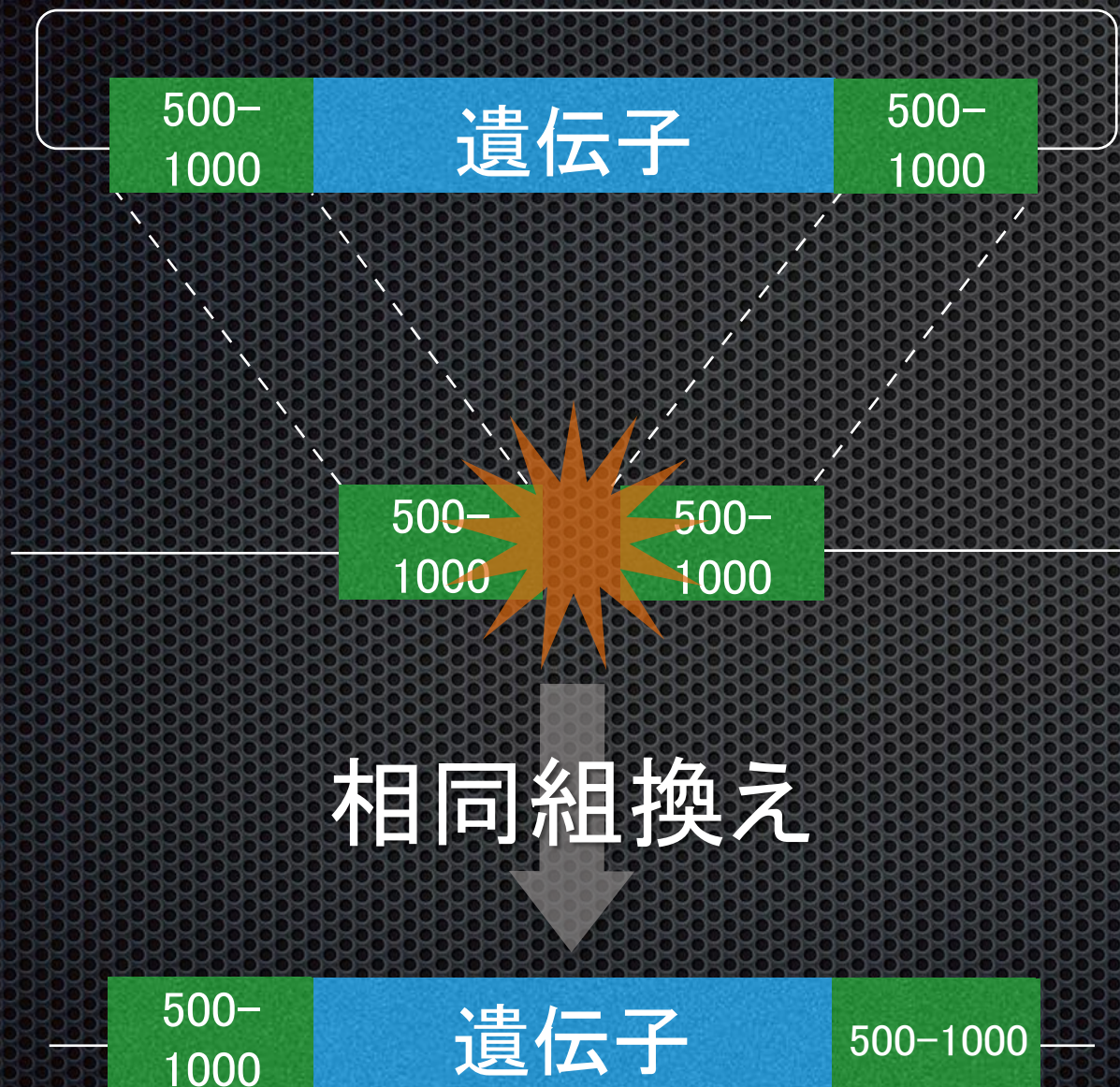
これまで、遺伝子ノックインには、相同組換えを利用した方法が用いられてきた



しかし、相同組換えによる遺伝子ノックインの効率は極めて低く、マウスの胚性幹細胞(ES細胞)や酵母など、ごく一部の細胞および生物でしか利用できない手法であった

ゲノム編集を用いた遺伝子ノックイン(相同組換え法)

ゲノム編集技術を用いることで、相同組換えを利用した遺伝子ノックインの効率を向上させることができる

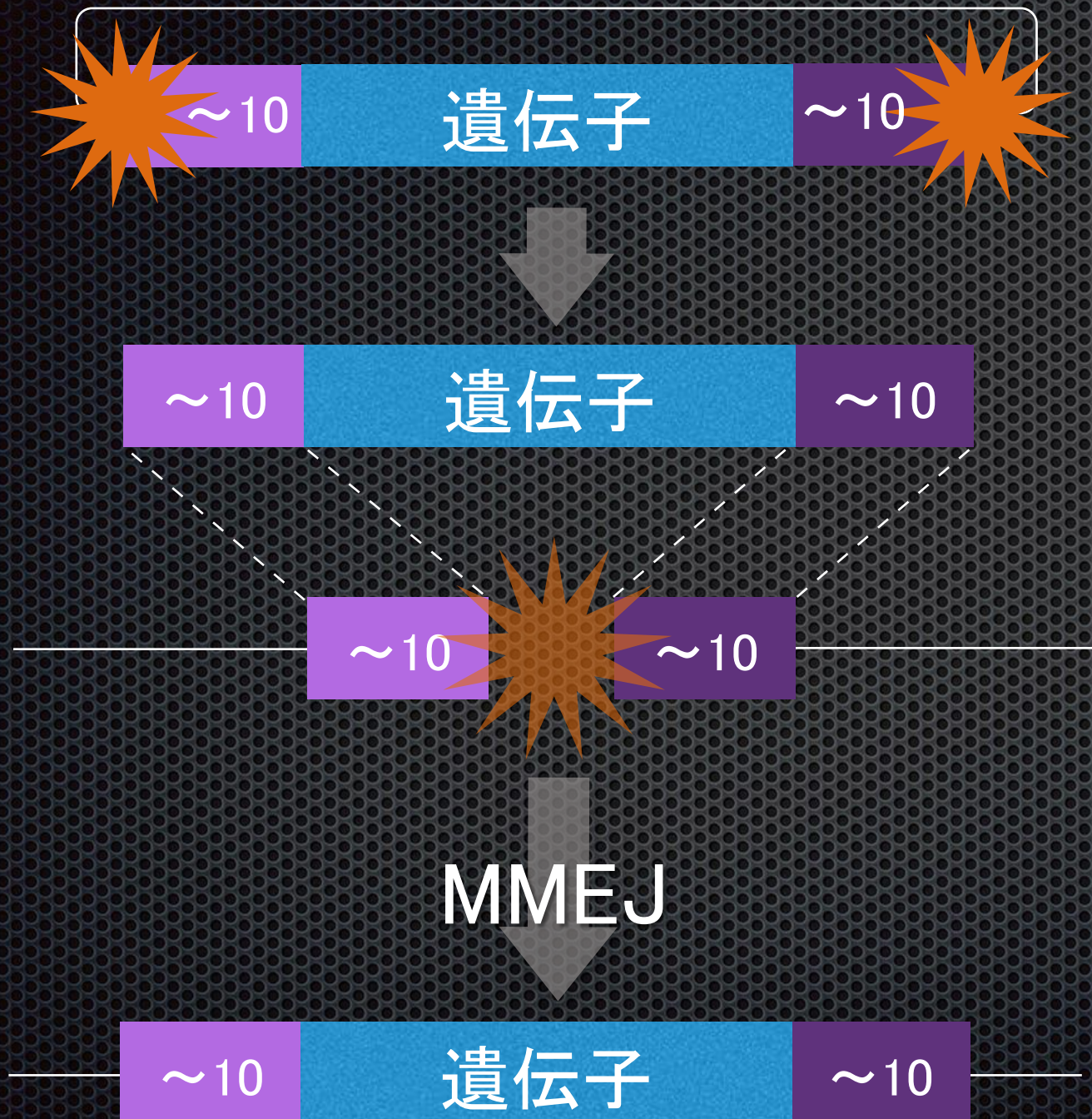


しかしながら、相同組換えに依存するノックイン法では、依然として十分なノックイン効率が得られない場合が多かった

あらゆる細胞・生物で汎用的に使用できる高効率な遺伝子ノックイン法の開発

PITChシステム（新技術）の概要

PITChベクター



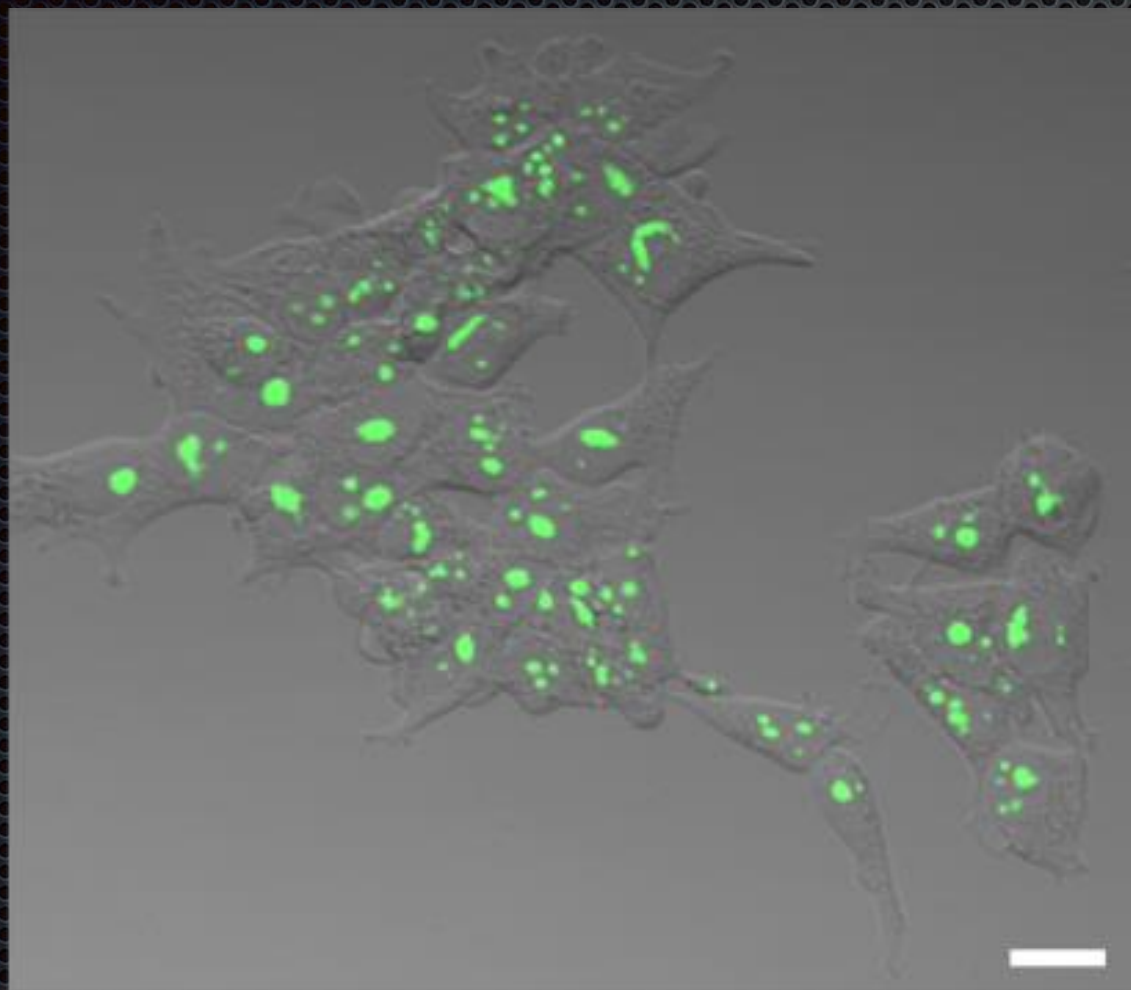
①10塩基対程度の短い相同配列（マイクロホモロジー）を外来遺伝子に付加

②ゲノム領域と外来遺伝子の外側を同時に切断

相同組換えとは異なる修復経路（MMEJ）を利用した高効率な遺伝子ノックイン

実施例① ヒト培養細胞での遺伝子ノックイン

ヒト培養細胞内で、核小体に局在するタンパク質をコードする遺伝子領域に、蛍光タンパク質遺伝子を挿入



Nature Communications 5, doi:10.1038/ncomms6560

CCCCCcaactgaAGTTCAGC

CCCCCcaactgaAGTTCAGC x4

~10

遺伝子

~10

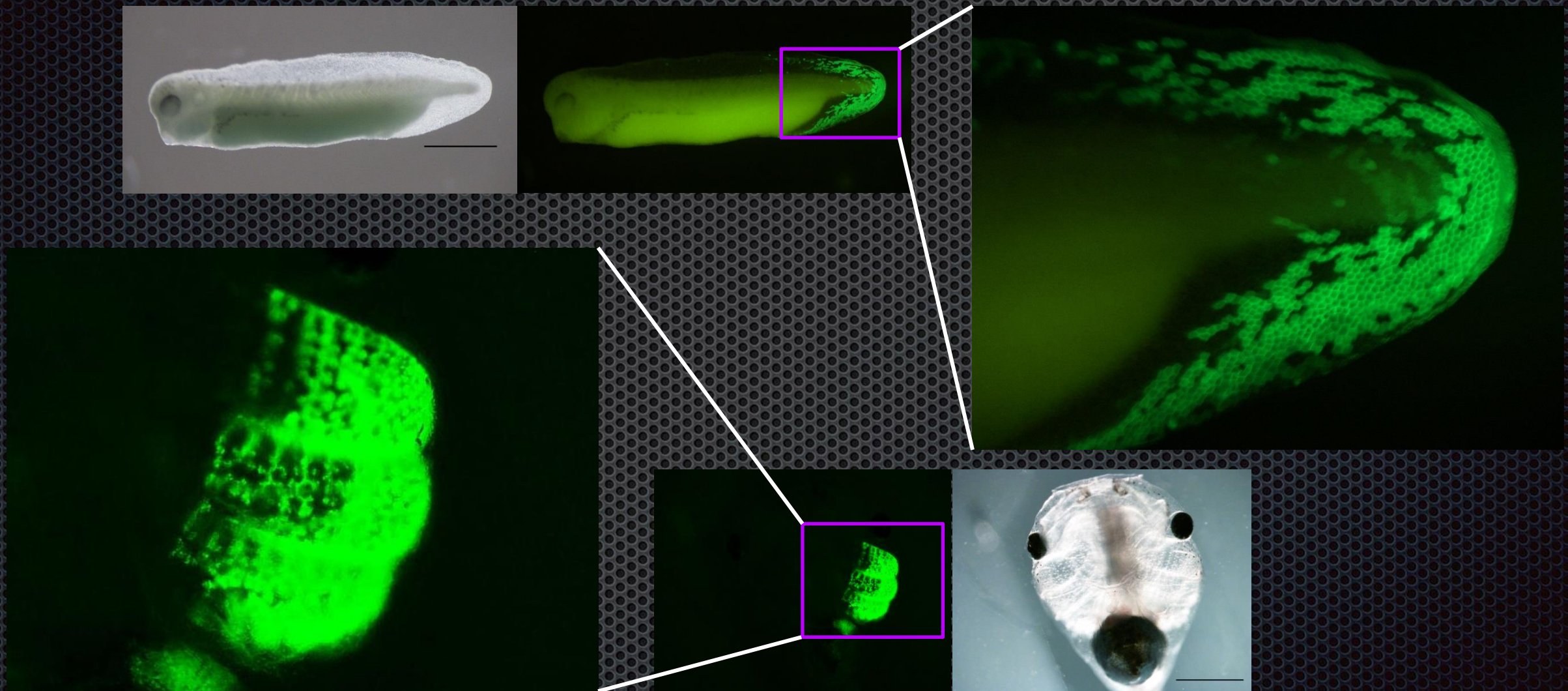
CCCCCcaaggtgaAGTTCAGC

CCCCCcaaggtgaAGTTCAGC x4

- ・内在の核小体タンパク質を可視化することに成功
- ・正確性の高い遺伝子ノックインを実現

実施例② アフリカツメガエルでの遺伝子ノックイン

アフリカツメガエル幼生で、ヒレとエラに局在するタンパク質をコードする遺伝子領域に、**蛍光タンパク質遺伝子**を挿入



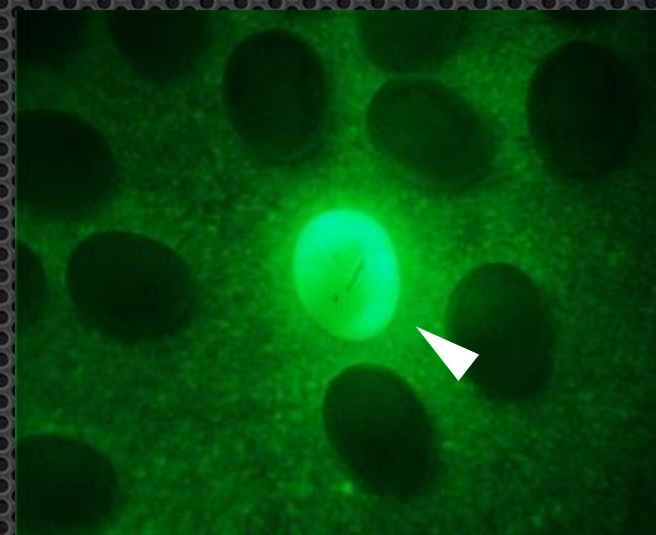
Nature Communications 5, doi:10.1038/ncomms6560

これまでノックインが困難であったアフリカツメガエル個体においても、目的の遺伝子領域への遺伝子挿入に成功(世界初)

実施例③ カイコでの遺伝子ノックイン

カイコ生体内で、皮膚の着色に関わる遺伝子を破壊しつつ、
蛍光タンパク質遺伝子を挿入

卵



幼虫



Nature Communications 5, doi:10.1038/ncomms6560

卵および幼虫で蛍光タンパク質の活性が確認され、さらに
幼虫では遺伝子の破壊による皮膚の透明化も見られた

実施例③ カイコでの遺伝子ノックイン

従来法による
ノックイン効率

$\frac{1}{11770}$
(0.0085%)

PITCh法による
ノックイン効率

$\frac{92}{14000}$
(0.66%)

約100倍効率が上昇!

これまでノックイン効率が非常に低かったカイコで、
実用で使えるレベルにまで効率が上昇

実施例③ カイコでの遺伝子ノックイン

CAAGTA~~taaggag~~CCTAGCC

CAAGTA~~taaggag~~CCTAGCC x4

~10

遺伝子

~10

CAAGTA~~cgccgat~~CCTAGCCG

CAAGTA~~cgccgat~~CCTAGCCG x4

正確性の高い遺伝子ノックインを実現

本成果の応用展開例

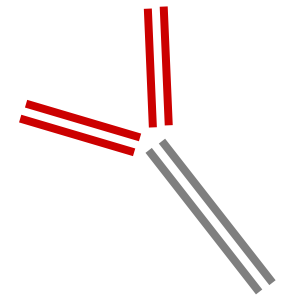
PITCh技術により...

染色体上の狙った位置
(外来遺伝子を安定して
発現する場所等)

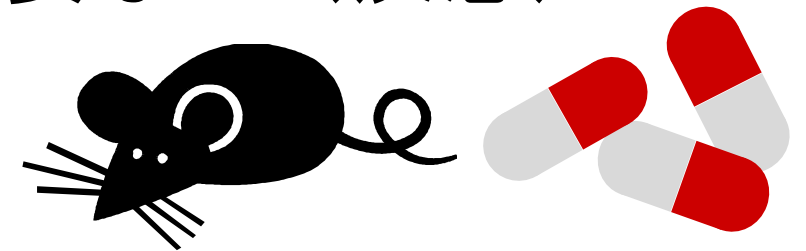
有用なタンパク質の遺伝子配列
の挿入

簡便かつ効率よく！

・動物細胞における抗体医薬品や組換えタンパク質産
生能の向上



・医薬品スクリーニング及び治療法開発に必要なヒト(疾患)
遺伝子を挿入した細胞や動物の作製



・カイコを用いた組換えシルクの機能向上や
有用タンパク質産生能の向上



生命科学や医農工連携分野への大きな貢献が期待される！