

【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、京都大学記者クラブ



NEWS RELEASE

本件の報道解禁につきましては、平成 30 年 3 月 5 日(月)午後 7 時以降にお願いいたします。

平成 30 年 3 月 2 日
国立大学法人 広島大学
国立大学法人 京都大学
京都大学 iPS 細胞研究所

ゲノム編集技術を用いたヒト iPS 細胞での正確な一塩基置換技術 (MhAX 法) を開発

【本研究成果のポイント】

- 人工 DNA 切断酵素と生物がもつ DNA 修復機構の一つを利用して、精密な一塩基置換を実現する技術 (MhAX 法) を開発
- ヒト iPS 細胞を用いて、遺伝性疾患でみられる一塩基多型を再現することに成功
- 正常な塩基を二つもつ細胞と、変異した塩基を二つもつ細胞、正常な塩基と変異した塩基を一つずつもつ細胞を、同時に樹立する技術を確立

【概要】

広島大学大学院理学研究科 山本 卓 教授、京都大学 iPS 細胞研究所 Knut Woltjen 准教授および 慶應義塾大学 先端生命科学研究所 曾我 朋義 教授らは、人工 DNA 切断酵素 (※ 1) を用いたヒト iPS 細胞での正確な一塩基置換技術 (MhAX 法) を開発しました。本法は、従来法と比較して、目的の一塩基多型 (※ 2) 以外の変異が最小限である点や、二次的なドナー DNA を必要としない点など多くの利点を有します。このゲノム編集技術 (※ 3) を用いた精密な一塩基置換技術は、ヒト iPS 細胞での遺伝性疾患のモデリングや修復に広く利用され、疾患の本態性解明や新薬の開発、遺伝子治療等へ応用されることが期待されます。

本研究成果は、3 月 5 日 (日本時間午後 7 時)、英国 Nature Publishing Group の科学雑誌『Nature Communications』に掲載される予定です。

URL: <https://www.nature.com/ncomms/>

DOI: 10.1038/s41467-018-03044-y

論文タイトル: "Microhomology-assisted scarless genome editing in human iPSCs"

著者: Shin-Il Kim^{1*}, Tomoko Matsumoto^{1*}, Harunobu Kagawa¹, Michiko Nakamura¹, Ryoko Hirohata¹, Ayano Ueno², Maki Ohishi², Tetsushi Sakuma³, Tomoyoshi Soga³, Takashi Yamamoto³ and Knut Woltjen^{1, 4**}

*筆頭著者

**責任著者

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)
2. 慶應義塾大学 先端生命科学研究所
3. 広島大学大学院 理学研究科
4. 京都大学 白眉センター

【背景】

人工 DNA 切断酵素である TALEN や CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術により、遺伝性疾患でみられる一塩基多型を導入または修復する手法は、疾患のモデリングや治療のために必須となる技術です。しかしながら一塩基置換のみを導入した細胞は薬剤選抜を適用できないため、正確に目的の一塩基が改変された細胞を効率的に得るには、一度薬剤耐性遺伝子を挿入したノックイン細胞を作製し、その後抜き取る操作が必要となります。従来法では、この薬剤耐性遺伝子の除去の過程で複数の余分な塩基が残ったり、二次的なドナー DNA が必要となったりなど、正確性や効率の面で改善が必要とされていました。

一方で、本研究グループは、マイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ ※4) に依存した新規遺伝子挿入法として、PITCh システムを考案し、2014 年に英国 Nature Publishing Group の科学雑誌『Nature Communications』に (参考論文 1)、これを改良したプロトコルを 2016 年に英国 Nature Publishing Group の科学雑誌『Nature Protocols』に (参考論文 2)、それぞれ発表しました。本研究にて開発された MhAX 法では、PITCh システムでの MMEJ 依存的な修復を誘導するノウハウが活かされています。

参考論文 1

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

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

Nat Commun. 2014 Nov 20;5:5560. doi: 10.1038/ncomms6560.

ニュースリリース :

<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/smg/documents/Natcommun2014.pdf>

参考論文 2

MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems.

Sakuma T, Nakade S, Sakane Y, Suzuki KT, Yamamoto T.

Nat Protoc. 2016 Jan;11(1):118-33. doi: 10.1038/nprot.2015.140.

ニュースリリース :

<https://www.hiroshima-u.ac.jp/news/35628>

【研究手法と成果】

PITCh システムは、DNA 二本鎖切断の修復機構の一つである MMEJ を利用して外来遺伝子を挿入する方法で、20~40 塩基対ほどの短い相同配列 (マイクロホモロジー) を利用した簡便・正確・高効率な遺伝子挿入法です (図 1 左)。本研究では、一旦挿入した薬剤耐性遺伝子を抜き取る際に、PITCh システムと同様のマイクロホモロジーに依存した修復機構を利用しました (図 1 右)。修復後には、目的の一塩基置換と (遺伝子の機能に影響を及ぼさない) 目印となる一塩基置換が導入されるように設計されています。本手法は、その原理から Microhomology-assisted excision (MhAX) 法と名付けられました。

MhAX 法を利用することにより、ヒト iPS 細胞において、先天性プリン代謝異常症でみられる *HPRT1* 遺伝子の一塩基多型 ($HPRT_{Munich}$) を再現することに成功しました。また、同じくプリン代謝疾患の原因変異の一つとして知られる *APRT* 遺伝子の一塩基多型 ($APRT^*J$) については、左右のマイクロホモロジー領域に正常型塩基と変異型塩基をそれぞれ配置することにより、修復細胞に正常型塩基と変異型塩基が確率的に生じるように工夫しました (図 2)。その結果、正常型塩基を二つもつ細胞と、変異型塩基を二つもつ細胞、正常型塩基と変異型塩基を一つずつもつ細胞を、同時に樹立することに成功しました (図 3)。

これにより、同じ遺伝的背景を有しながら目的の一塩基多型のみが異なる細胞を並列に作製することが可能となり、厳密な対照実験に基づいて当該の一塩基多型と疾患との関連性を精査することのできる手法が確立されました。

【期待される波及効果と今後の展開】

ヒト iPS 細胞での一塩基置換の導入技術は、遺伝性疾患のモデル細胞の作製に役立てられ、疾患の本態性解明や医薬品開発に資することが期待されます。また、疾患患者由来の体細胞から iPS 細胞を作製し、本技術を用いて疾患の原因変異を修復した後に、目的の細胞に分化させて自家移植を行う *ex vivo* の遺伝子治療への応用も見込まれます。

また本技術は、ヒト iPS 細胞以外の細胞株や生物個体にも適用できる可能性があり、今後これらの実施例が蓄積されることにより、基礎生物学研究や各種産業における利用価値が高まることが予想されます。

【用語説明】

※ 1 人工 DNA 切断酵素

DNA に結合する部分と DNA を切断する部分を人工的に融合させたタンパク質（Transcription activator-like effector nuclease, TALEN）や標的配列に結合するガイド RNA と複合体を形成して DNA を切断するタンパク質（Clustered regularly interspaced short palindromic repeats- CRISPR associated protein 9, CRISPR-Cas9）がある。どちらも、ゲノム DNA の特定の遺伝子配列のみを切断することが可能である。

※ 2 一塩基多型

ゲノム DNA の中の特定の単一塩基が異なる塩基に置き換わったもの。ゲノムワイド関連解析から、疾患への関与が疑われる一塩基多型が多数同定されているものの、その多くは実験的な証明が追いついていない状況にある。

※ 3 ゲノム編集技術

人工 DNA 切断酵素によってゲノム DNA に DNA 二本鎖切断を誘導し、その修復過程において、標的遺伝子への欠失や挿入変異を導入（遺伝子ノックアウト）したり、ドナーベクターのゲノム DNA への組み込みを促進することで遺伝子を挿入（遺伝子ノックイン）したりする最先端の遺伝子改変技術。

※ 4 マイクロホモロジー媒介末端結合

Microhomology-mediated end-joining (MMEJ)。真核生物が持つ DNA 修復機構の一つ。二本鎖切断の際に生じた切断両末端間で、相補的な配列同士が結合し、修復される機構。

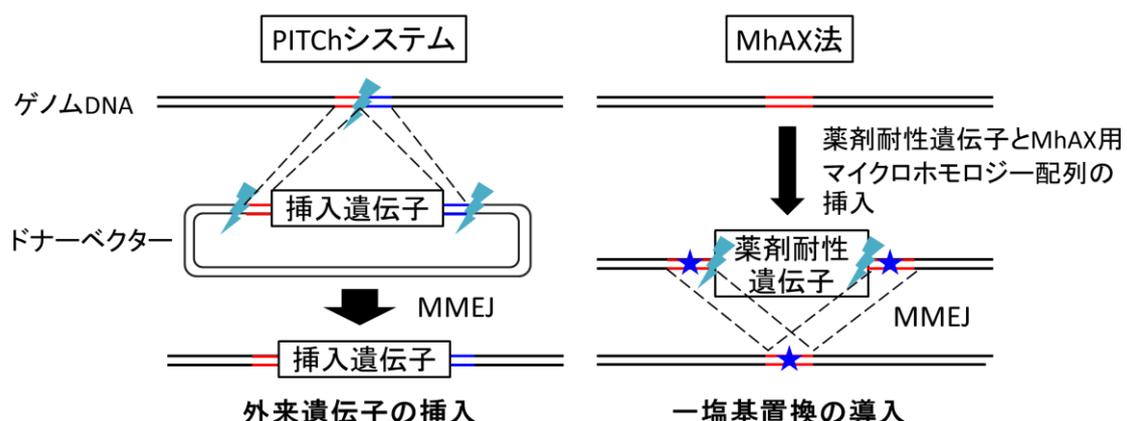


図1 PITCh システムと MhAX 法

PITCh システムが MMEJ 依存的な手法により外来遺伝子を挿入するのに対し、MhAX 法では、同様の機構により薬剤耐性遺伝子を除去し、一塩基置換を導入することを目的としている。

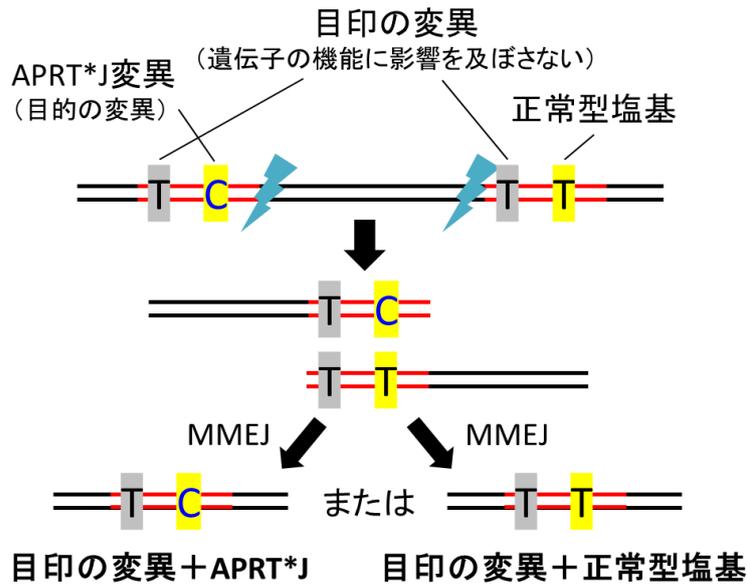


図2 正常型塩基と変異型塩基 (APRT*J) の確率的な生成

MhAX 法で用いる左右のマイクロホモロジー配列に、予め正常型塩基と変異型変異を配置しておくことで、修復の過程でいずれかの塩基が確率的に選択される。

	目的外の変異	目印の変異 + 正常型塩基	目印の変異 + APRT*J
目的外の変異	133		
目印の変異 + 正常型塩基	3	2	
目印の変異 + APRT*J	15	1	6

(全160クローン中)

図3 正常型/正常型、正常型/変異型、変異型/変異型の細胞の同時取得

解析した全 160 クローン中、正常型/正常型の細胞が 2 つ、正常型/変異型の細胞が 1 つ、変異型/変異型の細胞が 6 つ存在したことから、これらを同時に取得する技術が確立された。

【お問い合わせ先】

<研究に関すること>

広島大学大学院 理学研究科 数理分子生命理学専攻

教授 山本 卓（やまもと たかし）

TEL: 082-424-7446 Fax: 082-424-7498

E-mail: tybig@hiroshima-u.ac.jp

京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)

准教授 Knut Woltjen (まずは CiRA 国際広報室へ)

TEL: 075-366-7005 Fax: 075-366-7185

E-mail: media@cira.kyoto-u.ac.jp

<報道に関すること>

広島大学 財務・総務室広報部

広報グループ 坂本 晃一

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

京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)

国際広報室 和田濱 裕之

TEL: 075-366-7005 Fax: 075-366-7185

発信枚数：A4版 5枚（本票含む）