

ゲノム編集技術の概要と問題点

筑波大学 生命科学動物資源センター

筑波大学 医学医療系 解剖学発生学研究室

WPI-IIIIS 筑波大学 国際睡眠医科学研究機構

筑波大学 生命領域学際研究(TARA)センター

高橋 智

ゲノム編集技術の概要と問題点

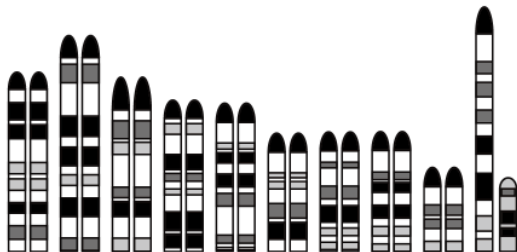
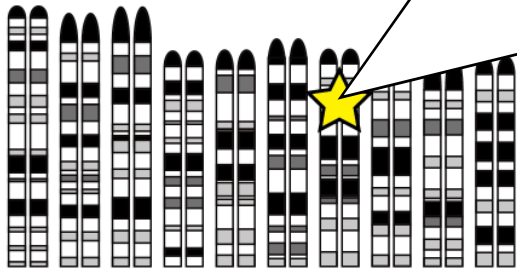
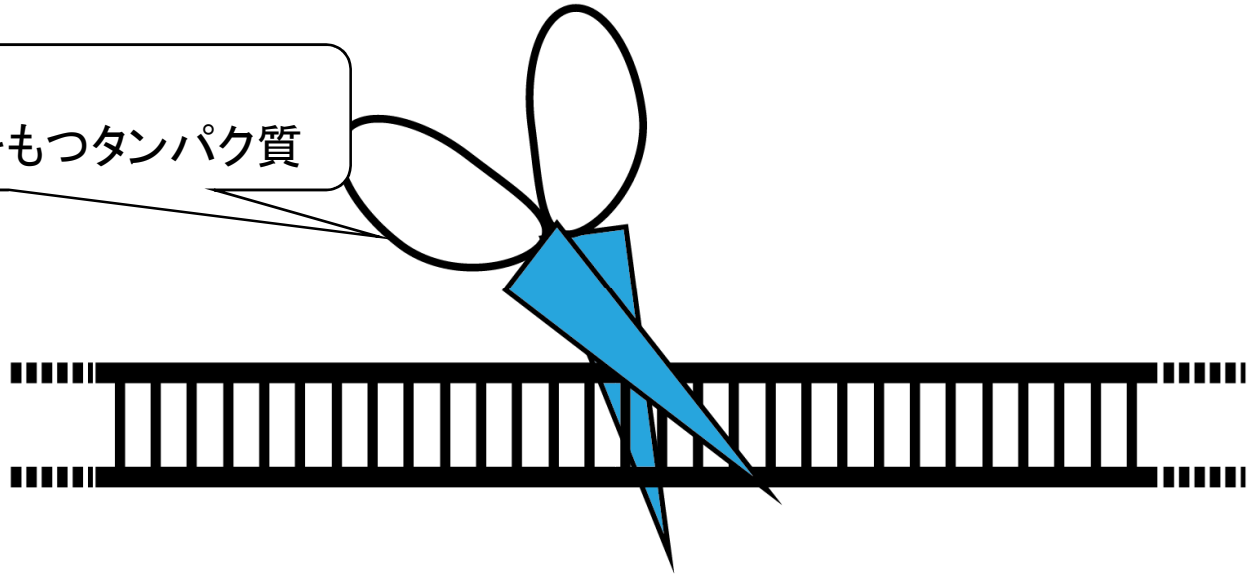
- ゲノム編集とは？ なぜゲノム編集は遺伝子改変に有効？
- 3つの人工制限酵素 (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9)
- CRISPR/Cas9の応用使用例
- ゲノム編集の問題点

ゲノム編集技術の概要と問題点

- ゲノム編集とは？ なぜゲノム編集は遺伝子改変に有効？
- 3つの人工制限酵素 (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9)
- CRISPR/Cas9の応用使用例
- ゲノム編集の問題点

ゲノム編集とは？

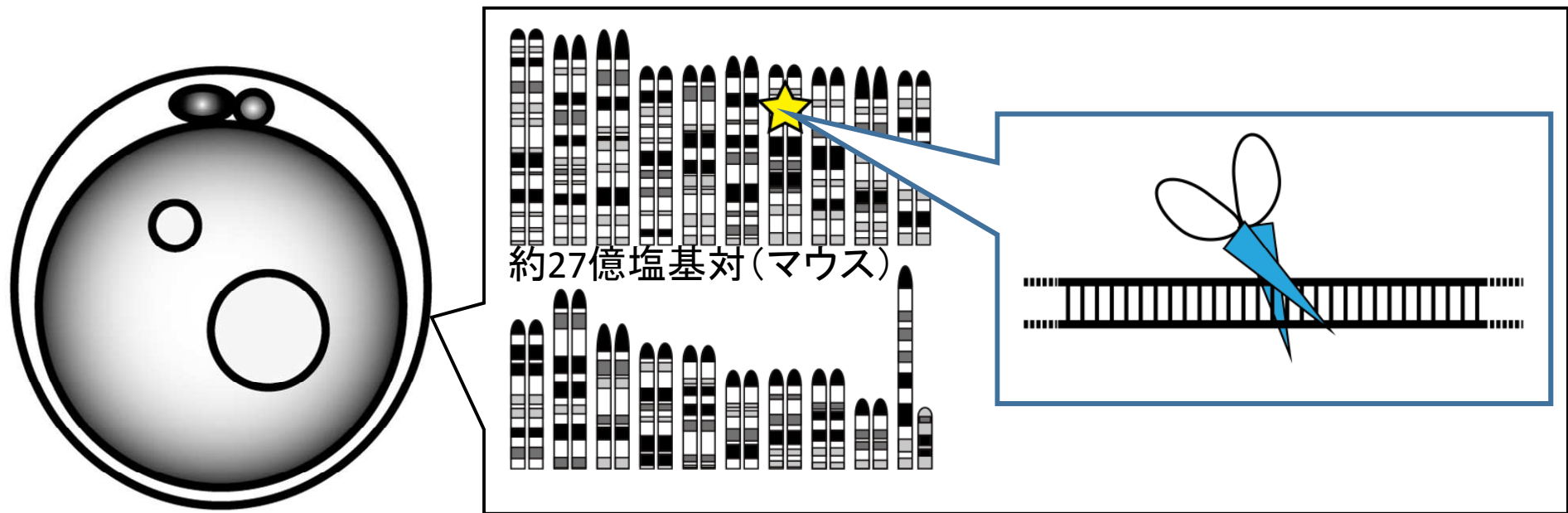
制限酵素:
DNAを切断する機能をもつタンパク質



約27億塩基対(マウス)

ゲノム編集:
任意のゲノムDNA配列を特異的に切断する人工制限酵素
を使用することで、ゲノム上の特定の場所に変異を誘導す
る技術

人工制限酵素への要求



- 特異性:
27億塩基対あるゲノムDNA(マウス)のうち、1箇所だけを切断する。
- 切断活性:
生きている細胞のなかで、ゲノムDNAを切断する。

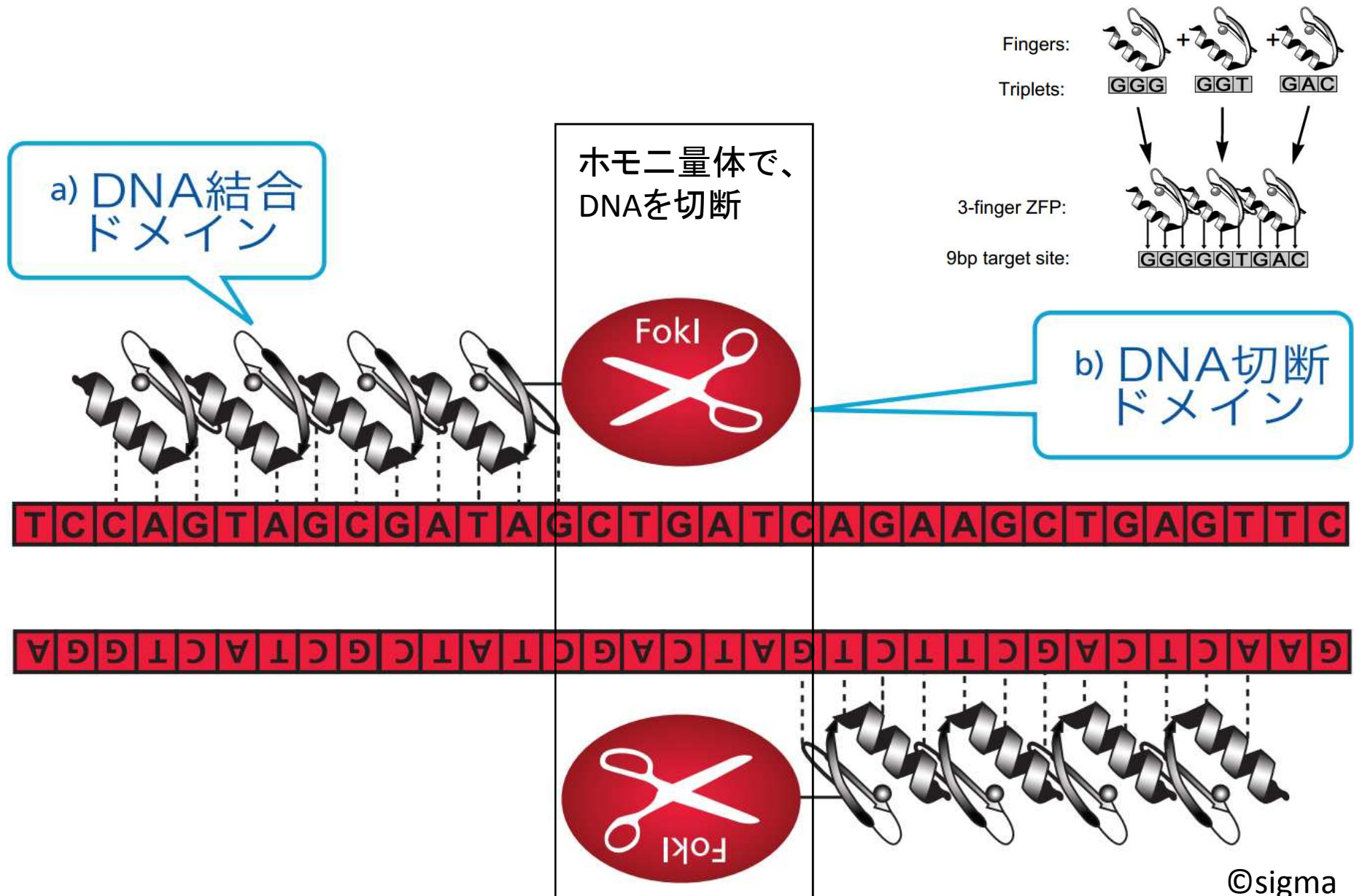
ゲノム編集技術の概要と問題点

- ゲノム編集とは？ なぜゲノム編集は遺伝子改変に有効？
- 3つの人工制限酵素 (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9)
- CRISPR/Cas9の応用使用例
- ゲノム編集の問題点

3つの人工制限酵素

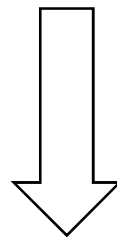
1. Zinc Finger Nuclease (ZFN)
2. Transcription activator-like effector Nuclease (TALEN)
3. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)

ジンクフィンガーヌクレアーゼ Zinc Finger Nuclease (ZFN)

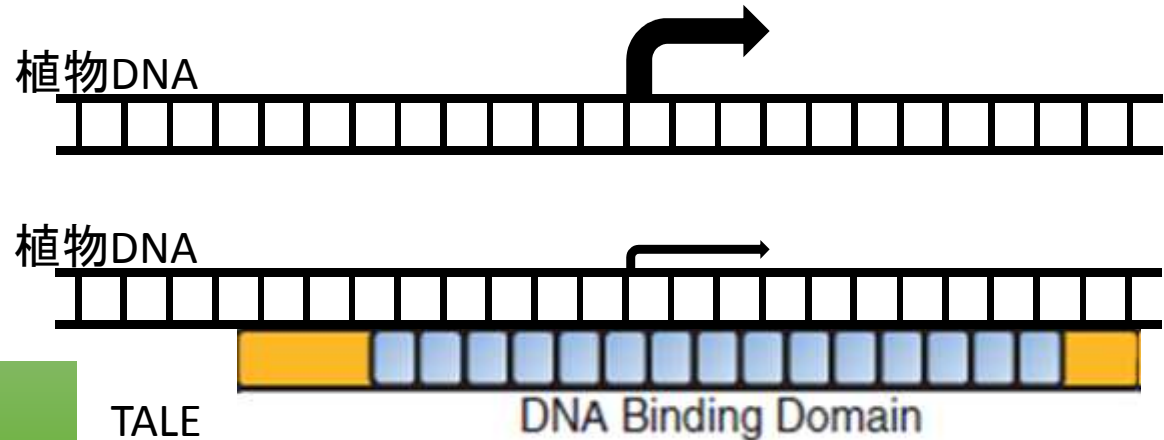


Transcription activator-like effector (TALE)

植物病原菌
キサントモナス属細菌



TALEがゲノムに結合することにより
植物細胞(宿主)の遺伝子発現制御が変わる。



TALE nucleases: tailored genome engineering made easy

Claudio Mussolino and Toni Cathomen

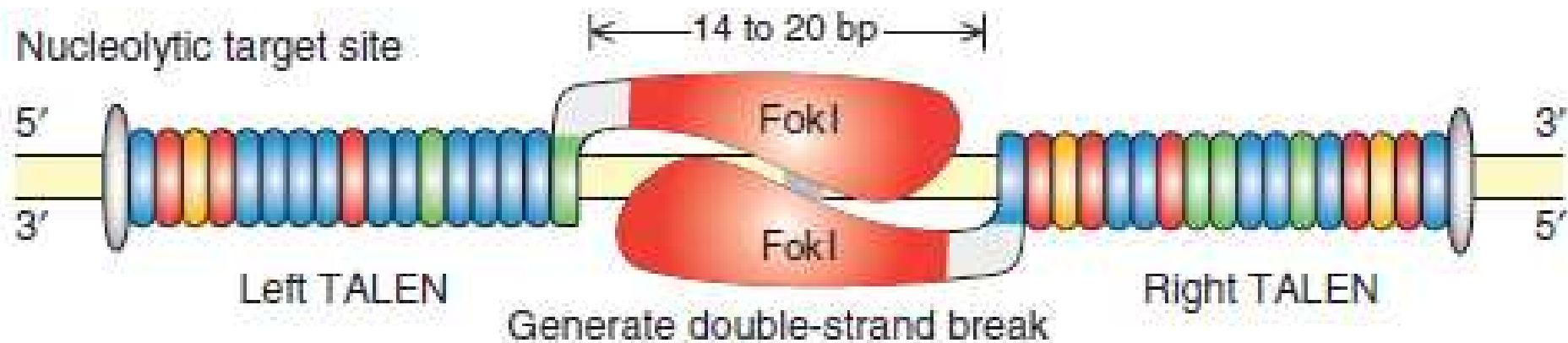
Current Opinion in Biotechnology 2012, 23:1-7

ターレン TALENの構造

A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering

Neville E Sanjana^{1,2,4}, Le Cong¹⁻⁴, Yang Zhou^{1,2,4}, Margaret M Cunniff^{1,2}, Guoping Feng^{1,2} & Feng Zhang^{1,2}

NATURE PROTOCOLS | VOL.7 NO.1 | 2012 | 171



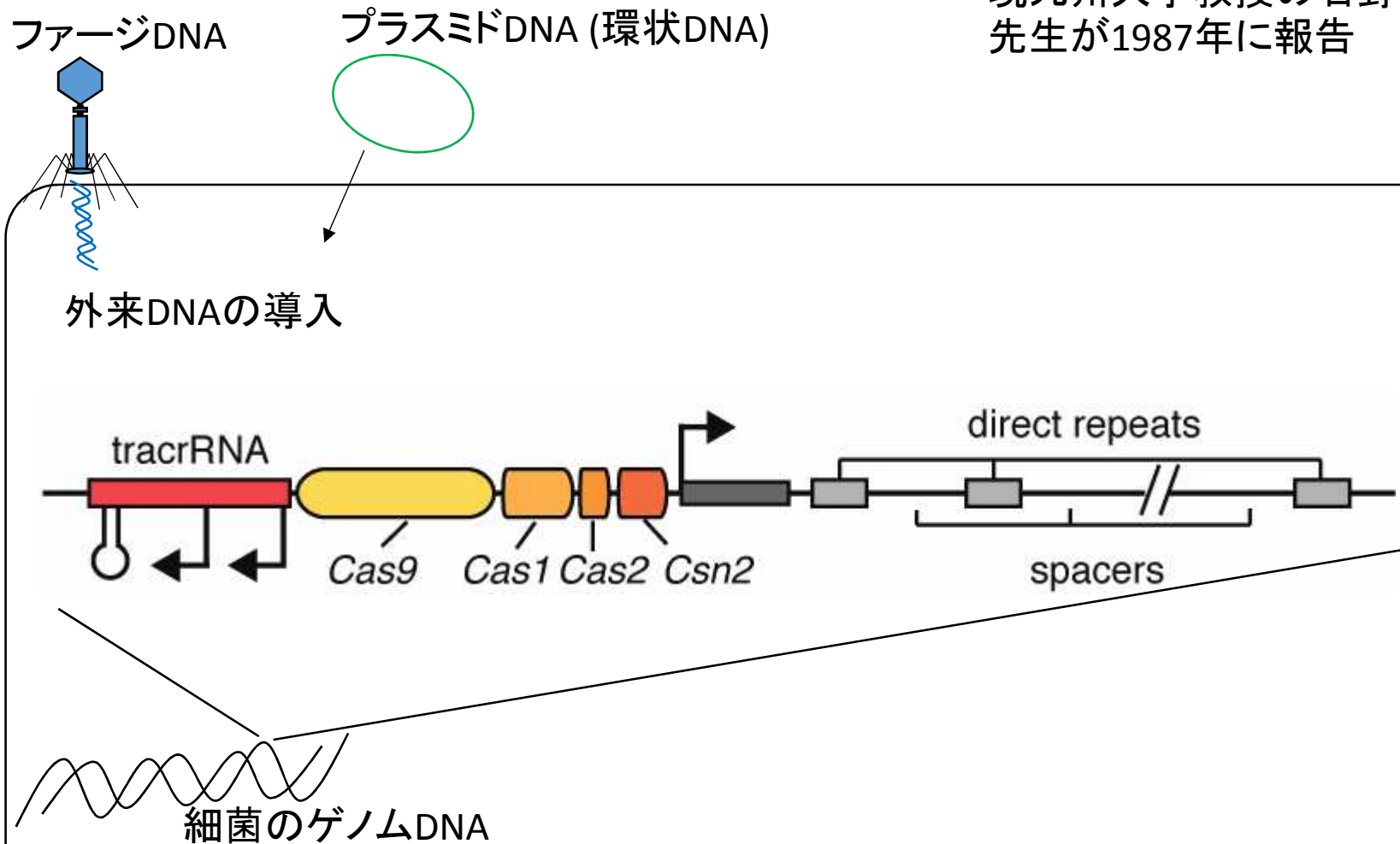
CRISPR/Cas9 システム

clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)

CRISPR associated protein 9 (Cas9)

細菌・古細菌の免疫システム-外来性のDNAを破壊する

現九州大学教授の石野良純
先生が1987年に報告



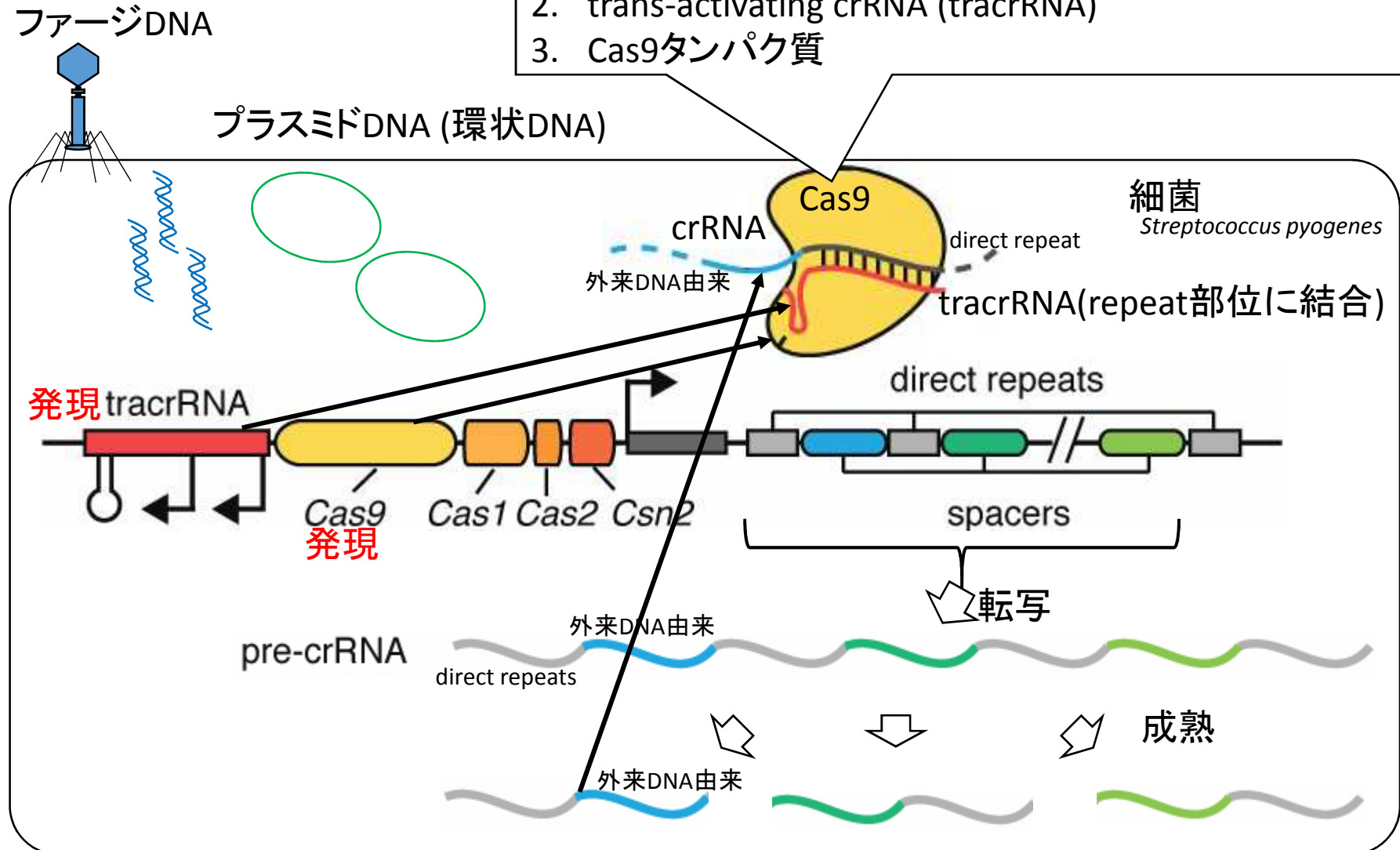
細菌
Streptococcus pyogenes

CRISPR/Cas9 システム

clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) associated protein 9 (Cas9)
細菌・古細菌の免疫システム-外来性

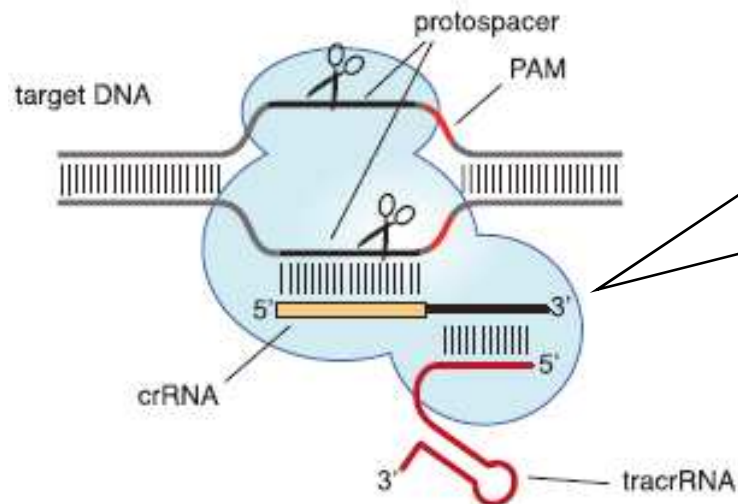
以下の3つの構成要素からなるRNA-タンパク質複合体
CRISPR/Cas9を形成

1. CRISPR RNA (crRNA)
2. trans-activating crRNA (tracrRNA)
3. Cas9タンパク質



CRISPR/Cas9システムの応用開発

Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex



以下の3つの構成要素からなるRNA-タンパク質複合体
CRISPR/Cas9を形成

1. CRISPR RNA (crRNA)
2. trans-activating crRNA (tracrRNA)
3. Cas9タンパク質

} gRNA

Science. 2012 Aug 17;337(6096):816-21.

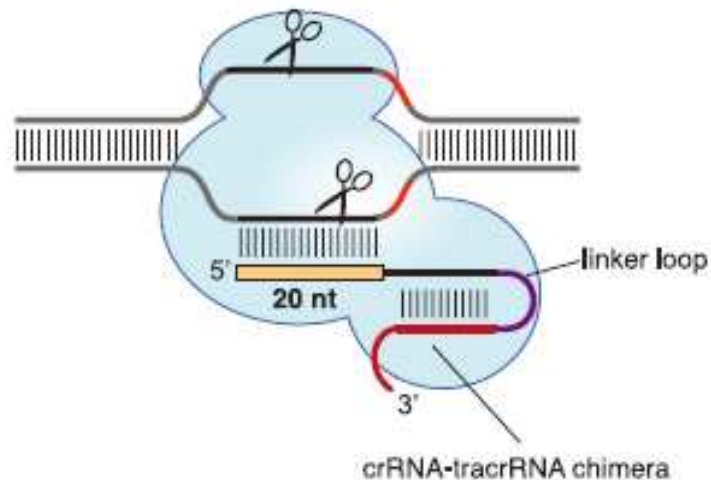


Jennifer A. Doudna



Emmanuelle Charpentier

Cas9 programmed by single chimeric RNA

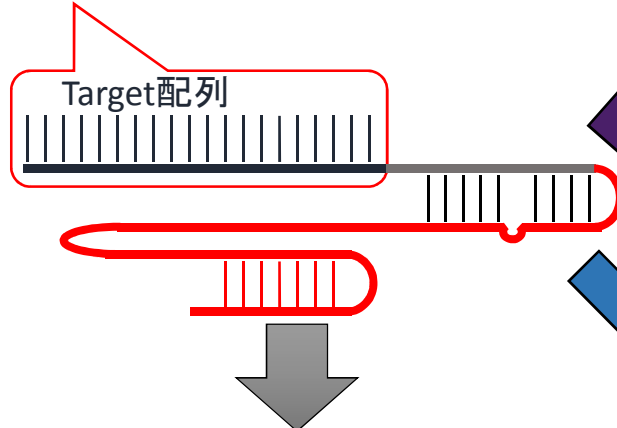


Fuse (by artificial) crRNA + tracrRNA=guide RNA (gRNA)

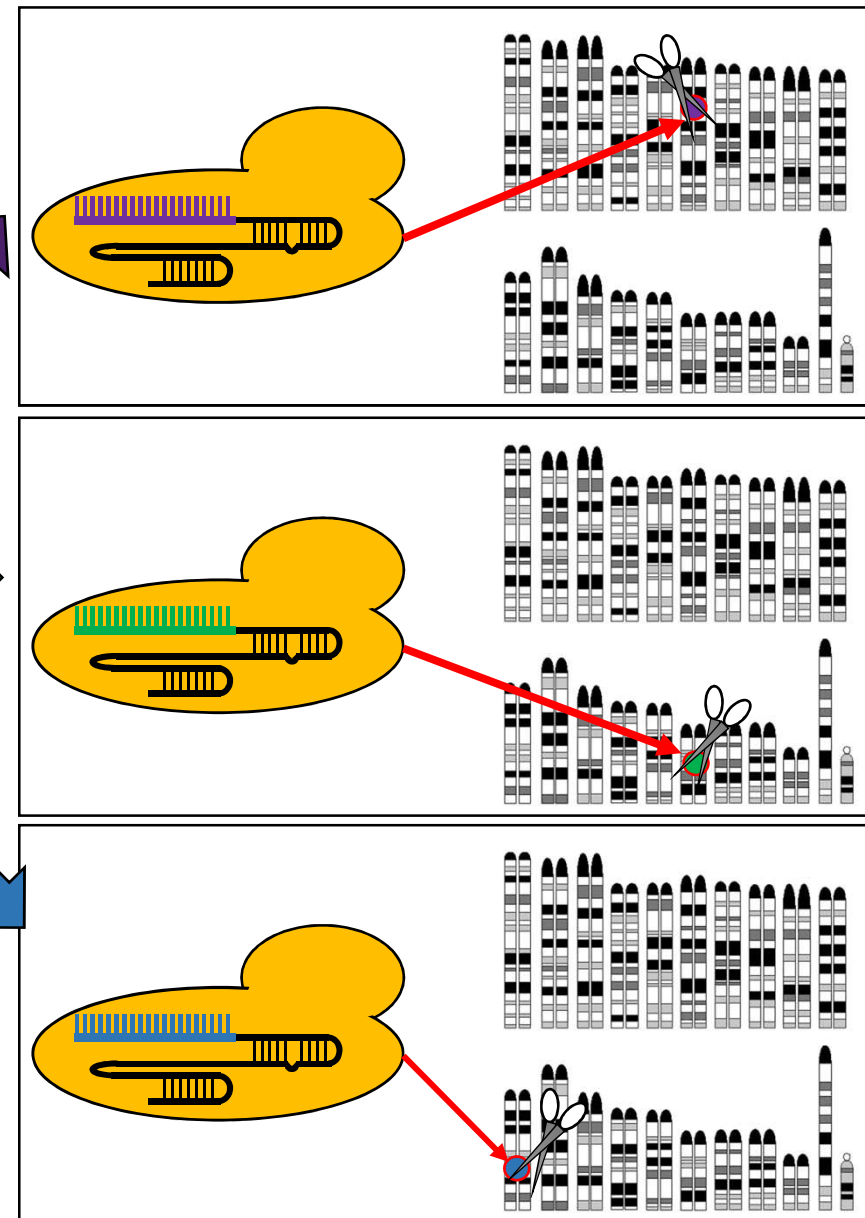
gRNAによるDNA認識部位の指定

gRNAによるDNA認識部位とゲノム切断
箇所の指定

この認識部位を実験室内で自由に変更



ゲノム上の任意の箇所を特異的に、
切断することができる。



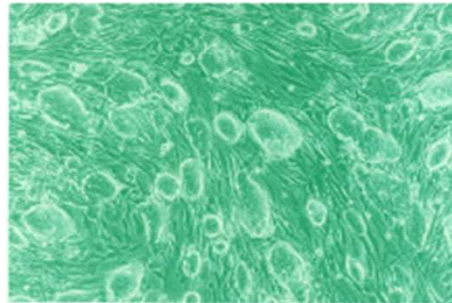
⋮

ゲノム編集技術の概要と問題点

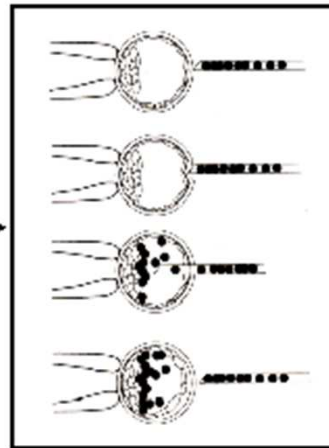
- ゲノム編集とは？ なぜゲノム編集は遺伝子改変に有効？
- 3つの人工制限酵素 (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9)
- CRISPR/Cas9の応用使用例
- ゲノム編集の問題点

これまでの遺伝子改変動物作製

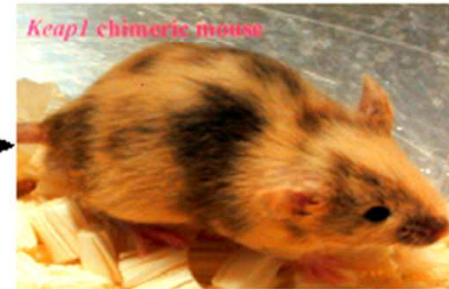
遺伝子欠損マウスの作製方法



1. 胚性幹細胞 (ES細胞) の培養/相同遺伝子組換え体の分離



2. 胚盤胞注入

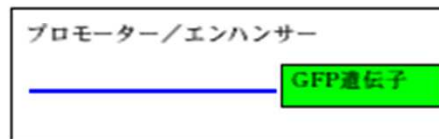


3. キメラマウスの誕生

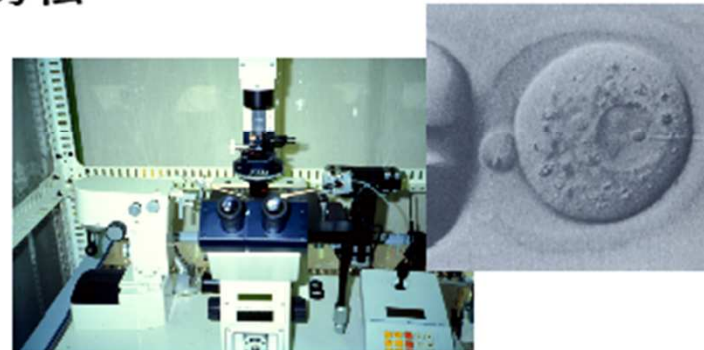


4. ヘテロマウスの誕生

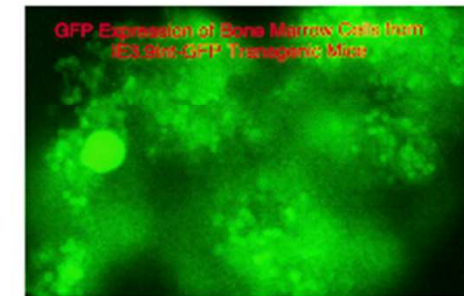
遺伝子導入マウスの作製方法



1. 導入遺伝子の作製

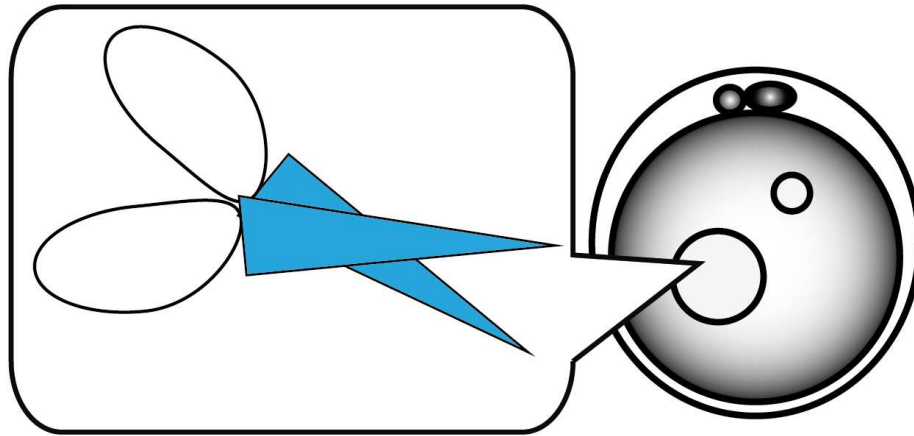


2. 顕微鏡下での遺伝子の注入



3. 導入遺伝子を持っているマウスの決定

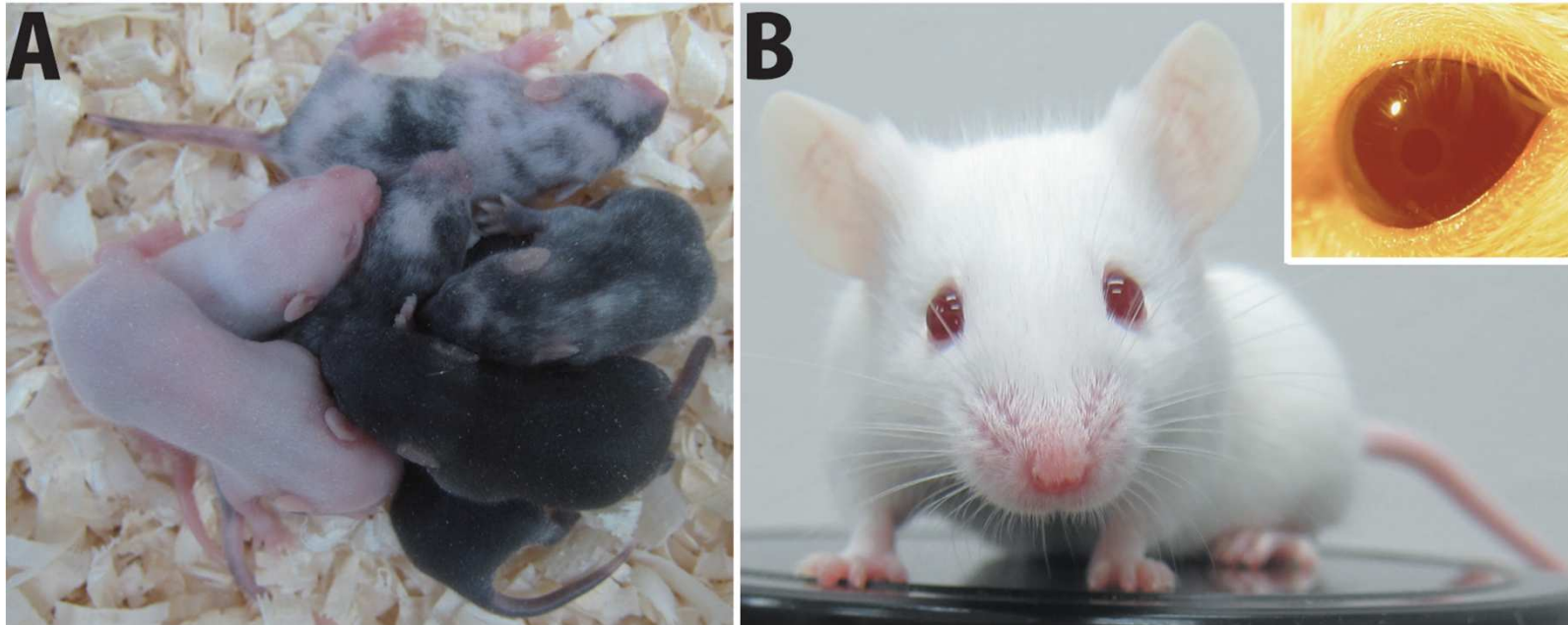
ゲノム編集による遺伝子改変動物作製



人工制限酵素を受精卵に導入するだけで、
遺伝子欠損動物(KO)が作製できる。

	Tg動物	KO動物 (遺伝子ターゲティング)	KO動物 (ゲノム編集)
作出目的	人工外来遺伝子の導入	内在性遺伝子の改変	内在性遺伝子の改変
ゲノム上の 変異部位	ランダム	特異的	特異的
作出方法	受精卵へのDNAの インジェクション	遺伝子ターゲティング (ES細胞での相同組換え→ キメラ動物作製→ 生殖系列への移行)	受精卵へのDNAの インジェクション
作業・時間	簡便・半年	煩雑・1年以上	簡便・半年
動物種	多種 マウス・ラット・ブタ・サル (受精卵が体外培養可能)	限定的 マウス・(ラット) (生殖系列移行可能なES細胞)	多種 マウス・ラット・ブタ・サル

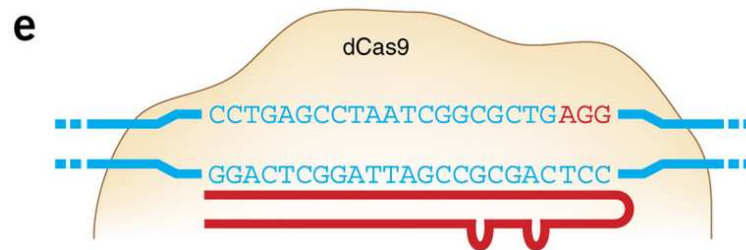
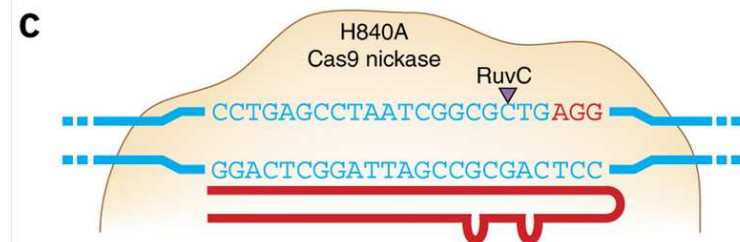
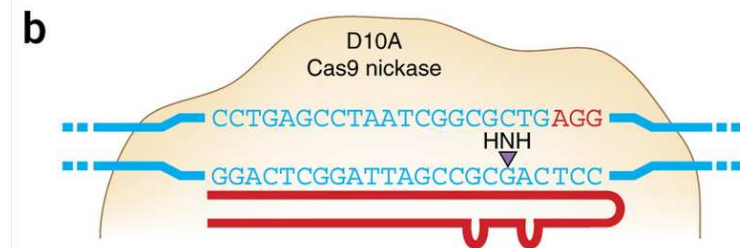
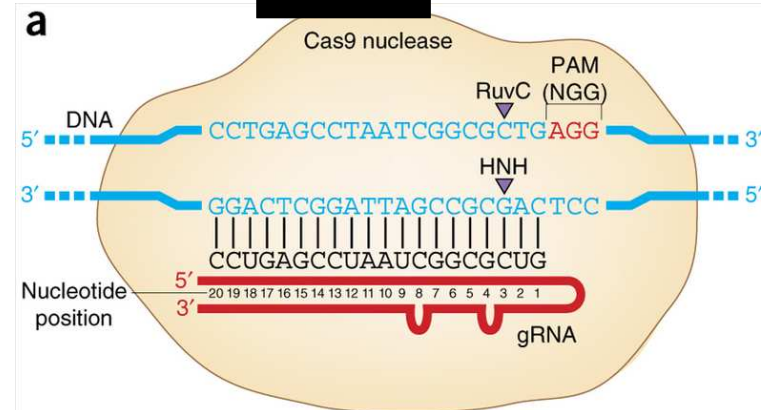
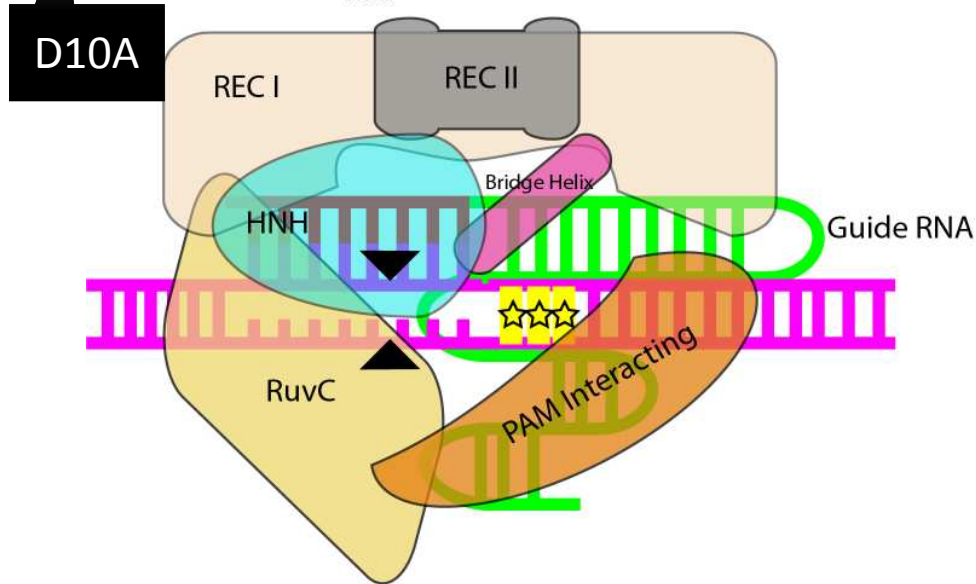
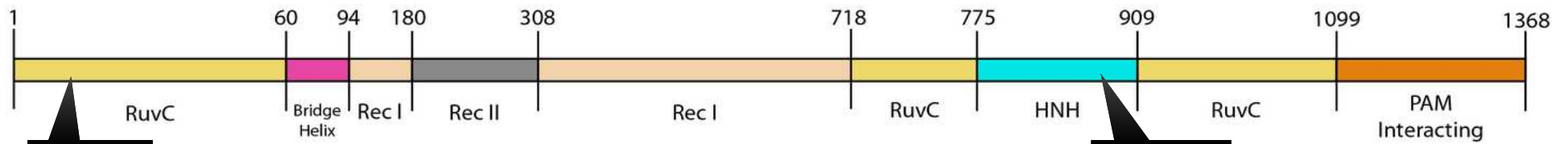
CRISPR/Cas9によるアルビノC57BL/6Jマウスの作製



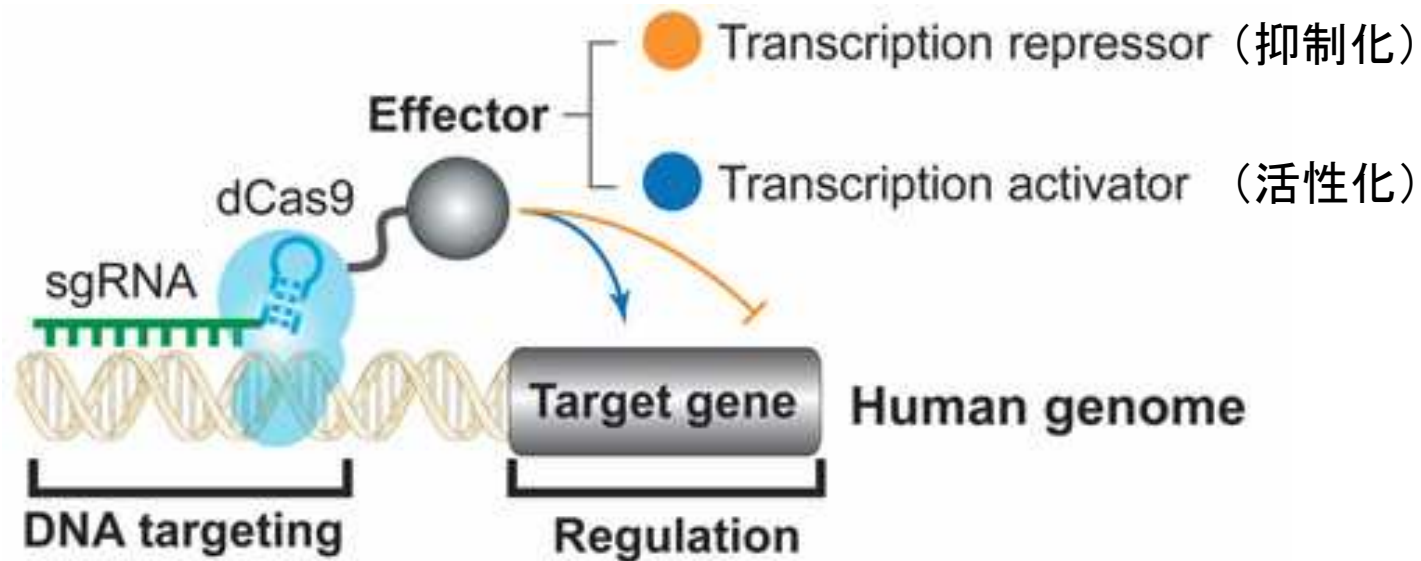
Wild-type ACCTCAGTTCCCCTTCAAAGGGGTGGATGACC**G**TGAGTCCTGGCCCTCTGTGTTTTATAATAG
#1-1 ACCTCAGTTCCCCTTCAAAGGGGTGGATGACC**T**TGAGTCCTGGCCCTCTGTGTTTTATAATAG
#1-2 ACCTCAGTTCCCCTTCAAAGGGGTGGATGACC-----**TCCTGG**CCCTCTGTGTTTTATAATAG
#2-1 ACCTCAGTTCCCCTTCAAAGGGG----- (20 bp) -----CCCTCTGTGTTTTATAATAG
#2-2 ACCTCAGTTCCCCTTCAAAGGGGTGG----- (17 bp) -----CCCTCTGTGTTTTATAATAG

(Mizuno S. and Sugiyama F. et al. Mammalian Genome. 2014)

DNAに結合するが切断しないCas9 (dead Cas9)



ゲノムDNAを変異させずに遺伝子の発現を制御する



Cell. 2013 Jul 18;154(2):442-51.

dCas9に転写活性化因子や転写抑制因子を結合させることで、ゲノムDNAを変異せずに、目的の遺伝子の発現を制御できる。

ゲノム編集の遺伝子治療への応用

- HIV感染治療のため、HIVウイルスがT細胞への感染に使用するCCR5受容体をゲノム編集で欠損させたT細胞を移入し、治療効果が確認された(N. Engl. J. Med. 2014)。
- ゲノム編集によりPD-1を欠損させ、腫瘍治療治験を行なったことが報告されている(News in Nature. 2016)。
- ゲノム編集により造血幹細胞の遺伝子を欠損させて、遺伝性の貧血の治療を行うことが計画されている。
- 現在実施、計画されているゲノム編集による治療は、全て体細胞が対象である。
- 遺伝子の書換えによる治療は、まだ実施されていない。

ゲノム編集のまとめ

- 人工制限酵素 (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9) を細胞に導入することで、任意のゲノムDNAを特異的に変異させることが出来る。
- 人工制限酵素により2重鎖切断されたゲノムDNAは、非相同末端再結合 (NHEJ) か相同組換え修復 (HDR) により修復される。
- 非相同末端再結合 (NHEJ) によるゲノム修復では、予測不能な変異が生じる。
- 相同組換え修復 (HDR) では、任意の変異を誘導することができる。
- 切断活性が無い人工制限酵素でゲノムDNAに変異を導入せずに遺伝子の発現を制御することができる。

ゲノム編集技術の概要と問題点

- ゲノム編集とは？ なぜゲノム編集は遺伝子改変に有効？
- 3つの人工制限酵素 (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9)
- CRISPR/Cas9の応用使用例
- **ゲノム編集の問題点**

ゲノム編集の問題点

- 任意のゲノムDNA部位を特異的に変異させることが出来るが、目的としないゲノムDNA部位に変異が入る可能性がある(オフターゲット)。
- 全ての細胞で目的の変異が導入されない場合がある(モザイク)。
- タンパク質単独、もしくはタンパク質とRNAだけでゲノムDNAを変異できる。
→ DNAを使わなくても変異できるので、これまでの遺伝子治療等臨床指針では対応できない。
- 切断活性がない人工制限酵素を使った場合は、ゲノムDNA配列に変異を入れずに、遺伝子の発現を変えることができる。
→ DNA配列の変化の有無だけでは規定できない可能性がある。