

簡便・高効率なノックインを実現するゲノム編集技術を開発

徳島大学先端酵素学研究所の沢津橋俊特任講師ら、および立命館大学 R-GIRO (JST さきがけ研究員兼任) の菅野茂夫助教の研究グループは、遺伝子導入が可能な細胞において簡便に高効率なノックインを行う技術として VIKING (Versatile non-homologous end joining-based knock-in module for genome editing) 法を開発しました。この技術はゲノム編集による遺伝子破壊や遺伝子挿入をより簡便化し、生命科学における有用なツールと資することが期待されます。本成果は、1月12日付けで英国科学雑誌『Scientific Reports』オンライン版に掲載されます。また、VIKING 法の詳細なプロトコルは <https://sites.google.com/site/vikingknockin/> で公開します。

(報道概要)

(研究の背景と成果)

生物のゲノムの狙った位置を、意図した形に改変する技術を総称して、ゲノム編集^{*1}技術と呼びます。近年、動植物・菌類など様々な生物においてゲノム編集技術の開発が進められています。動物の培養細胞においては、ゲノム編集による遺伝子破壊がいち早くから報告されました。しかしながら、外来遺伝子を標的のゲノム領域内へ選択的に導入する手段(ノックイン^{*2})の効率化はされていませんでした。今回、我々は非相同末端結合修復^{*3}を利用してノックインを行う手法に改良を加え、ノックインのためのドナーベクター^{*4}の作製の手間を減らし、「ランダム挿入^{*5}」なく、高効率にノックインを行う方法 (Versatile non-homologous end joining-based knock-in module for genome editing, VIKING 法) を開発しました。

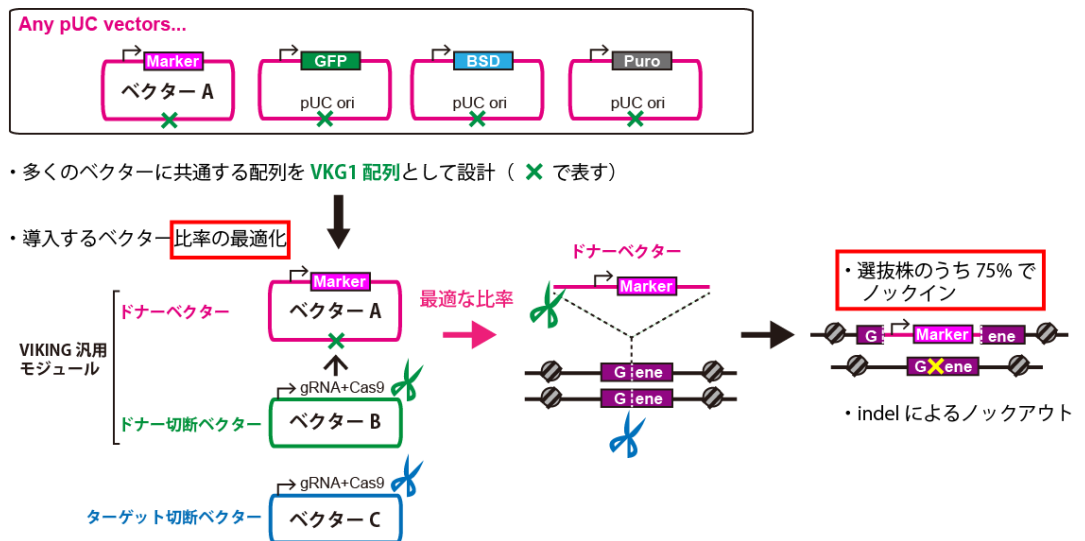


図: VIKING 法の概要

一般に、細胞の中でゲノム DNA に切断が生じた場合、非相同末端結合修復または相同組換え修復が起こりますが、非相同末端結合修復は相同組換え修復に比べて高頻度でおこります。そこで、非相同末端結合修復を利用して、遺伝子をノックインする手法が注目を集めています。非相同末端結合修復を利用したノックインでは、三つのベクター（ドナーベクター(A)、ドナー切断用ベクター(B)、ターゲット切断ベクター(C)）を同時に細胞に導入します（図）。三つのベクターを導入するとまず、ドナー切断用ベクターから生じる人工 DNA 切断酵素が細胞内でドナーベクターを切断します（図：緑色のハサミ）。さらに、ターゲット切断ベクターがゲノムの狙った位置を切断します（図：青色のハサミ）。切断されたドナーベクターの末端とゲノムの断片の末端が、非相同末端結合修復により結合してノックインが起こります。本方法は、さまざまな研究で用いられているものの、効率的なノックインを行うにはいくつかの問題があります。

先行研究の問題点の一つに、ドナーベクターがゲノム上の意図しない場所にも挿入されてしまう現象「ランダム挿入」があります。ノックインが起こった細胞でも、ランダム挿入がおこると、正しいノックイン細胞を取得する効率は下がります。また、ランダム挿入は細胞に意図しない悪影響を及ぼす可能性があります。そこで本研究では、ランダム挿入が起らないような、最適な条件を探索しました。条件検討の結果、ドナーベクター、ドナー切断ベクター、ターゲット切断ベクターの三つを特定の量比にした場合に、ランダム挿入が起こりにくく、かつ選抜した細胞の 75%のクローン*6 で、ノックインが起こるような条件を発見しました（図、赤枠）。遺伝子導入細胞を数クローン調べれば、ノックイン株が取得できるため、極めて高い効率と言えます。

さらに、我々はノックインによく利用されるベクターの配列に着目し、ドナーベクターを毎回作成しなくてもよい汎用的なモジュールを開発しました。VIKING 法では、ドナーの切断のために「VKG1 配列」という配列を利用します（図：緑「×」部）。VKG1 配列は一般的に広く用いられるベクターに共通して存在しているので、VKG1 配列を持つベクターをドナーとして利用する限り、ドナーベクターとドナー切断用ベクターのいずれも改変する必要がありません（図：VIKING 汎用モジュール）。

本成果では、ランダムな挿入ができる限り少なく、ノックイン効率が高い条件を明らかとしました。また、ベクター構築の手間をできるだけ無くし、さまざまなベクターをドナーとして利用できるようになりました。非相同末端結合修復依存のノックインは既に多くの報告がなされており、最適化も進んでいます。改良版である VIKING 法も、幅広い細胞種・生物種に適用可能であると考えており、より多くの研究者に活用されることが期待されます。

本技術は、下記のウェブサイトで利用方法を公開しています。より詳細なプロトコルなどについて知りたい方は下記のサイトをご覧ください。

- VIKING-Knock-in

<https://sites.google.com/site/vikingknockin/jp>

なお本成果は、徳島大学と立命館大学との共同研究によるもので、以下の掲載予定です。

掲載誌名 : Scientific Reports

論文題目 : Development of versatile non-homologous end joining-based knock-in module for genome editing

論文著者 : Shun Sawatsubashi*, Yudai Joko, Seiji Fukumoto, Toshio Matsumoto, Shigeo S. Sugano*

(下線 : 徳島大学、*責任著者)

お問い合わせ先

部局名 徳島大学先端酵素学研究所 分子内分泌学研究分野
担当者 沢津橋 俊
電話番号 088-634-6417
メールアドレス shun-sawa2@tokushima-u.ac.jp

部局名 立命館大学 R-GIRO
責任者 菅野 茂夫
電話番号 077-561-4879
メールアドレス sugano@fc.ritsumeii.ac.jp

【用語解説】

*1 ゲノム編集

生物のゲノムの狙った位置を、意図した配列に改変する技術の総称。近年では、CRISPR-Cas9などの部位特異的ヌクレアーゼを用いて標的のDNA配列に切断を導入することで、効率よくその改変を行うことができる。

*2 ノックイン

ドナーベクターや短鎖DNAといった外来遺伝子や任意の遺伝子配列を、標的とするゲノム領域へ選択的に導入する手段。興味のある遺伝子の配列を改変し、その機能を解明する目的や、新たな機能を持たせる為に利用される。

*3 非相同末端結合

ゲノムの切断部位の相同配列に依存せずに、切断末端を直接に結合する二本鎖DNA修復。これに対して相同な配列を鋳型とする相同組換え修復は、エラーの少ない二本鎖DNA修復である。二本鎖DNAの切断が起きた場合、一般的に非相同末端修復は相同組換え修復に比べ高頻度に起こる。

*4 ドナーベクター

細胞外から導入される外来遺伝子を有するDNA配列。本研究では特に、抗生剤耐性遺伝子や蛍光タンパク質遺伝子をマーカーとして有する環状DNA（プラスミドベクター）を指し、ゲノムへの挿入の有無を選別するために用いられる。

*5 ランダム挿入

上記のドナーベクターなどが標的とするゲノム領域以外へ無作為に挿入される現象。一般にドナーベクターには、生存に必須とする抗生剤耐性遺伝子などのマーカーが存在するため、マーカーのみの選別では、ノックインとランダム挿入を判別することは困難である。

*6 クローン

ここでは1個の細胞を起源に増殖した細胞集団、株を指す。ゲノム編集によるDNA配列の改変は1細胞ごとに異なる可能性があるため、クローン化の作業が必要となる。