人工損傷DNAを用いた新規ゲノム編集技術の開発

鈴 木　啓 一 郎*

Development of Novel Genome-editing Method Using a Customized Damaged-DNA Template

Keiichiro SUZUKI*

Genome editing is powerful tool for revolutionizing biological research and holds tremendous potential for clinical applications. Despite rapid advances in the field, an efficient and universal method is still lacking. Here, by activating cellular DNA repair machinery using a customized damaged-DNA template, we have achieved the efficient homology-directed repair mediated genome editing. This method can easily edit the target gene in mammalian cells.

1.　背景

近年, ゲノムの標的配列のみを特異的に切断・改変するタンパク質『人工 DNA 切断酵素（ヌクレアーゼ)』が登場し, 標的遺伝子の破壊（遺伝子ノックアウト）や, 外からの遺伝子挿入（遺伝子ノックイン）など, 様々な細胞種・生物種でゲノム配列をデザイン・改変する新規遺伝子工学技術『ゲノム編集』が開発された. 特に最新の人工ヌクレアーゼである Cas9 タンパク質を用いた CRISPR-Cas9（クリスパー・キャスナイン）はゲノム編集に必要不可欠なツールであり, 特別な技術や設備がなくても作製可能なため, 様々な分野の研究者がこの技術を活用するようになり, 生命科学研究全般に多大な影響を及ぼした. 今後更なる周辺技術の発達により, 健康医療研究やグリーンバイオ研究などへの応用を通して, 健康・食料・エネルギー等様々な分野に多大なる利益をもたらす技術としても期待されている.

ゲノム編集技術は, 細胞が持つ主として 2 通りの DNA 二本鎖切断修復機構（相同組換えと非相同末端結合）を利用する事で, 標的配列の改変する技術である（図 1). 数塩基の欠失や挿入などのエラーが起こりやすい非相同末端結合経路（NHEJ）による修復を利用する事で, 標的遺伝子の破壊『遺伝子ノックアウト』が可能となるが, その変異パターンはランダムである. 一方, ゲノムの標的部位に相同性をもつ外来 DNA を人為的に細胞核内に導入しておくと相同組換え経路によりゲノムに取り込まれることがあり, これを利用して標的配列を自由自在に任意の配列に改変する『遺伝子ノックイン』が可能となる. しかしながら, 相同組換えは細胞の分裂に伴っておきる DNA 修復機構であるため, 分裂の盛んな細胞にしか用いることができず, 更に効率が低いという欠点がある.

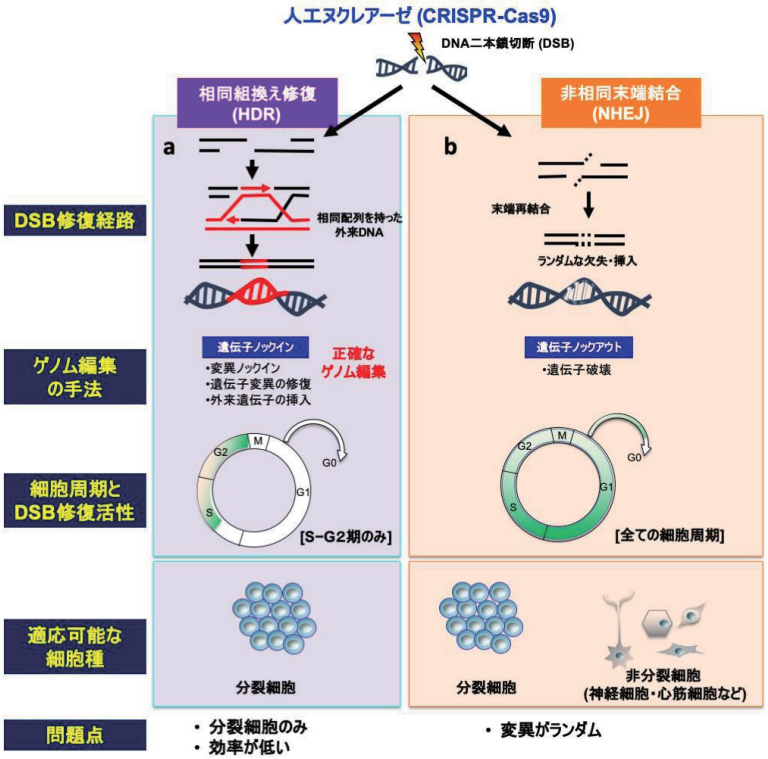

図 1　ゲノム編集技術とその原理

2020年3月5日 受理
* 豊田理研スカラー
大阪大学大学院基礎工学研究科物質創成専攻機能物質化学領域

2. 人工損傷DNAを用いた高効率なゲノム編集技術の開発

筆者は以前, ゲノム編集技術の分子機構が DNA 二本鎖切断を修復する DNA 二本鎖切断修復機構を利用した機構である事を明らかにした[1]. この知見を基に, 挿入したい外来 DNA に DNA 二本鎖切断を人工的に加えることで, 細胞内在性の DNA 二本鎖切断修復機構が活性化されることを発見し, これを応用し, 分裂・非分裂細胞に関わらず様々な細胞種で高効率にゲノム改変可能な HITI 法の開発に成功した実績がある[2].

本研究では, これらの知見を基にし, ゲノム編集を司る細胞内在性の DNA 修復機構を人為的に活性化させる方法を探索し, ゲノム編集の効率化を目指した（図 2A). 具体的には, ゲノムの標的部位と置換したい外来 DNA（ドナーDNA） を, 予め DNA 損傷として細胞に認識されやすい DNA として加工した. この結果, ある種の DNA 損傷剤処理で人工的に損傷を与えた外来 DNA をヒト培養細胞内に導入すると, 相同組換えによるゲノム編集効率が顕著に上昇（〜15 倍)することが判明した（図 2B).

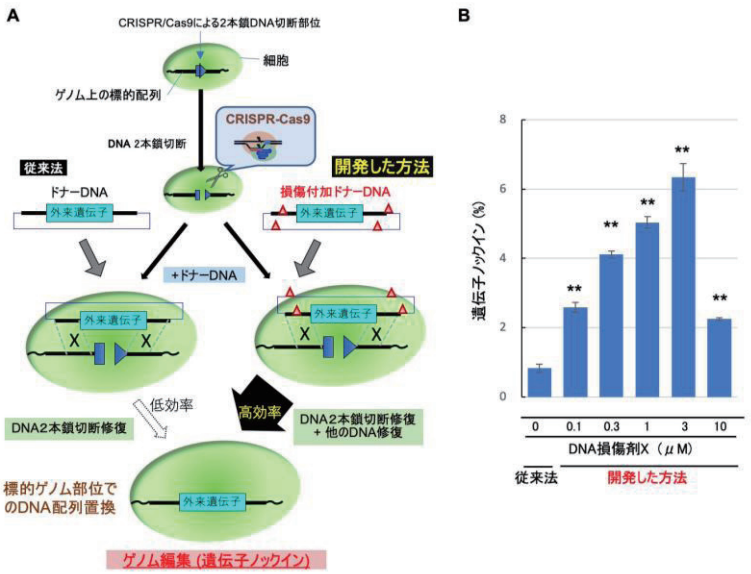

図２ 人工損傷付加ドナーDNA を用いた新規ゲノム編集技術の開発

3. まとめ

本研究では, DNA 損傷剤を用いて人工的に損傷を与えた外来 DNA を用いることで, 相同組換え修復経路を活性化し, ゲノム編集効率を上昇させることに成功した. 今後は, 人工損傷ドナーDNA がどのように細胞内の DNA 修復機構を活性化しゲノム編集効率を上昇されるか, その分子機構を詳細に解析することで, 更に効率の高いゲノム編集技術の開発を目指す.

4. 謝辞

本研究は公益財団法人豊田理化学研究所の豊田理研スカラー助成によって遂行されました. この場を借りて感謝申し上げます.

REFERENCES

1) K. Ishibashi, K. Suzuki, Y. Ando, C. Takakura and H. Inoue, Nonhomologous chromosomal integration of foreign DNA is completely dependent on MUS-53 (human Lig4 homolog) in Neurospora, *Proc Natl Acad Sci U S A,* **103** (2006) 14871-14876.

2) K. Suzuki, Y. Tsunekawa, R. Hernandez-Benitez, J. Wu, J. Zhu, J. E. Kim, F. Hatanaka, M. Yamamoto, T. Araoka, Z. Li, M. Kurita, T. Hishida, M. Li, E. Aizawa, S. Guo, S. Chen, A. Goebl, R. D. Soligalla, J. Qu, T. Jiang, X. Fu, M. Jafari, C. R. Esteban, T. Berggren, J. Lajara, E. Nuñez, P. Guillen, J. M. Campistol, F. Matsuzaki, G. H. Liu, P. Magistretti, K. Zhang, E. M. Callaway, K. Zhang and J. C. Izpisua Belmonte, *In vivo* genome editing via CRISPR-Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, **540** (2016) 144-149.