リコンビネースを体細胞でノックインする技術

所属（理化学研究所　非対称細胞分裂研究チーム）
氏名　恒川　雄二

RIKEN
Since 1917

従来技術とその問題点（背景）

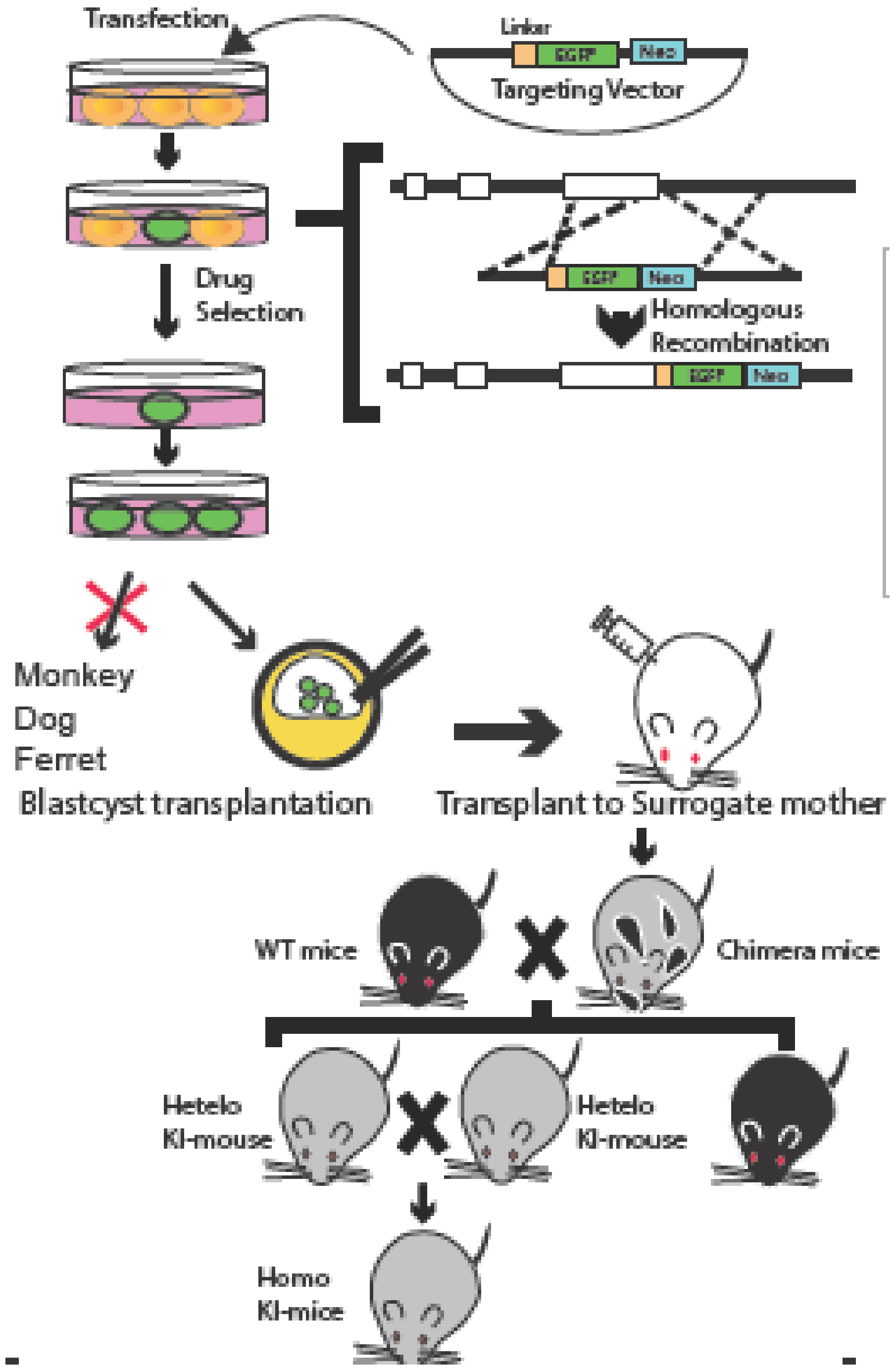
CRISPR/Cas9の登場により、受精卵や体細胞において簡便にゲノム編集（遺伝子のノックアウト、ノックイン）が可能となった。

- 受精卵に対するゲノム編集によりゲノム編集生物個体が簡便に作成可能になった。
- 電気穿孔法やウイルスベクターを用いることにより、発生中および発生後個体の体細胞において遺伝子のノックアウト、ノックインが行えるようになった。

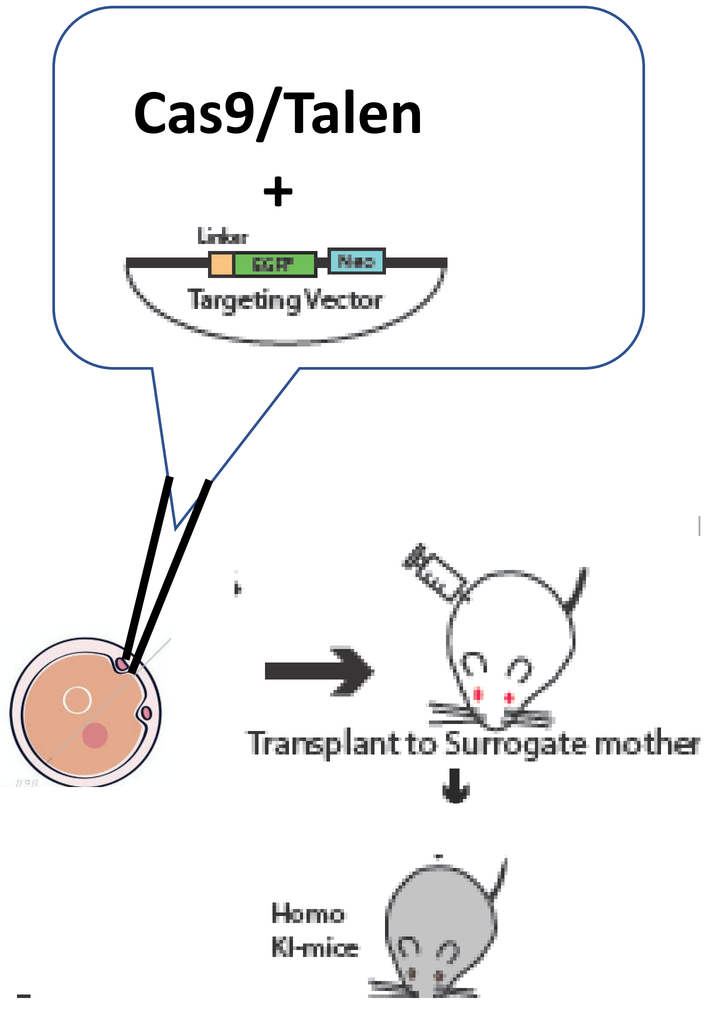
従来技術とその問題点（背景）

新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

従来の遺伝子ノックイン技術



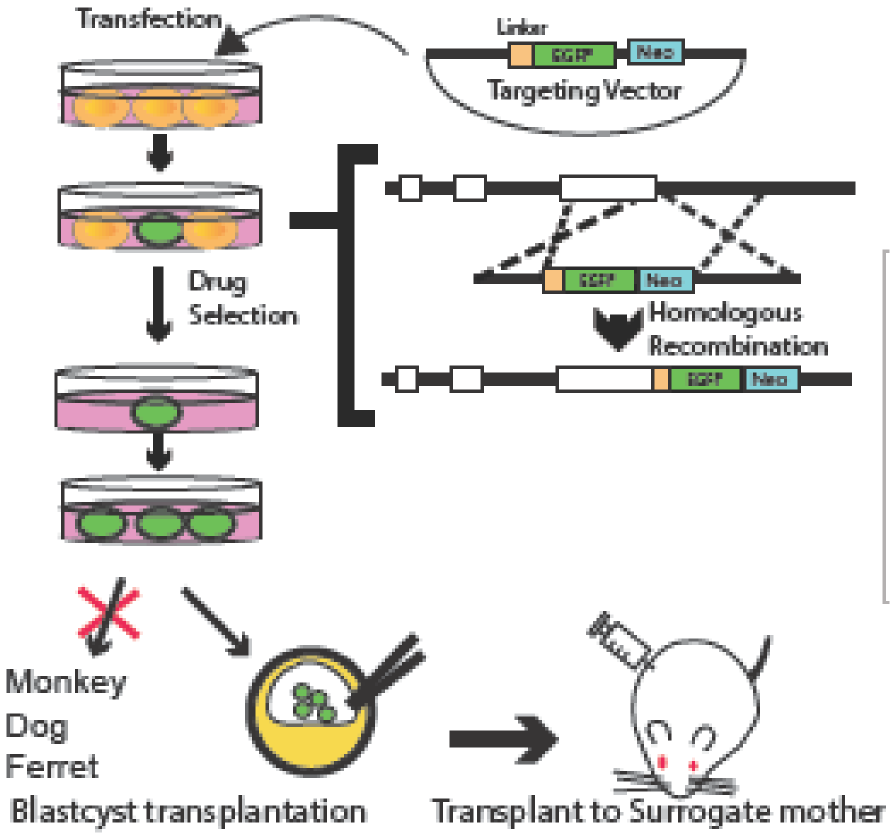
最近の遺伝子ノックイン技術



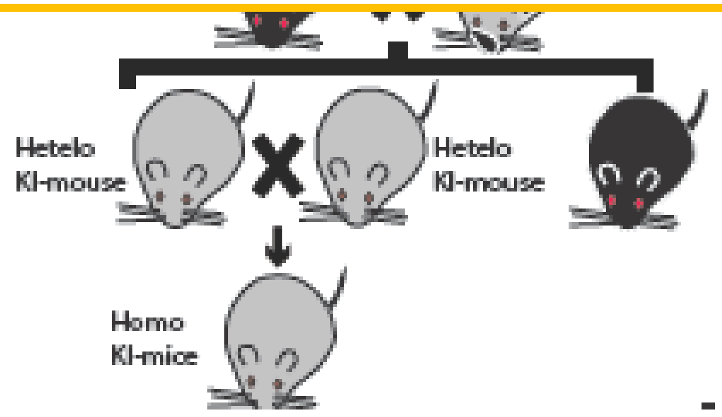
RIKEN
Since 1917

従来技術とその問題点（背景）

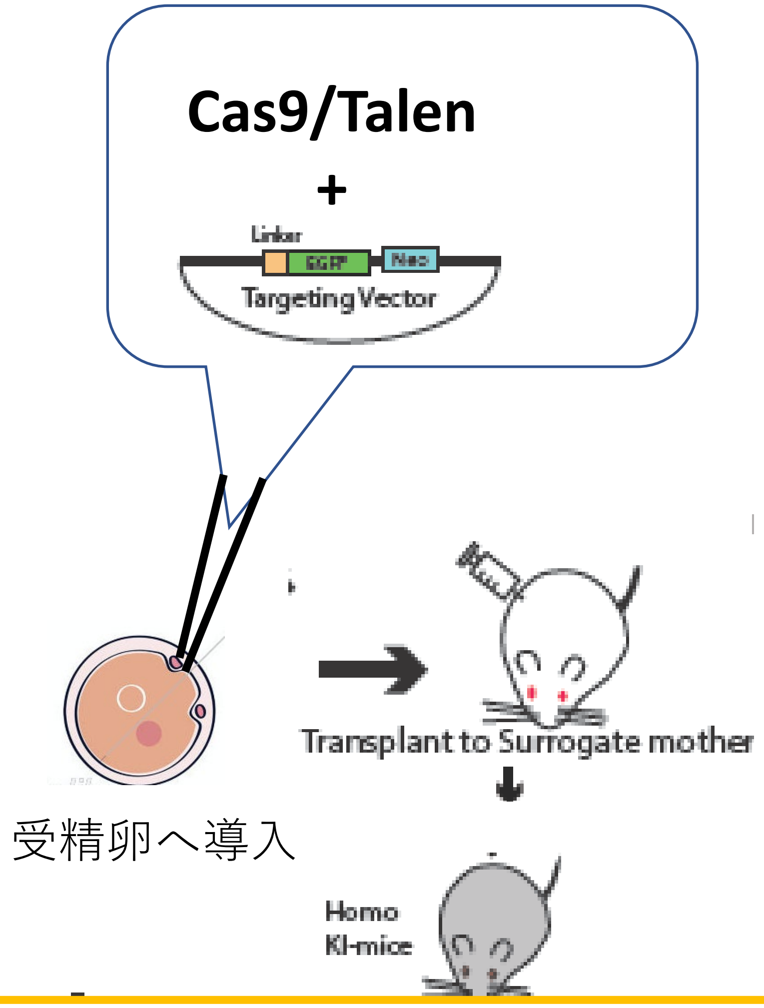
従来の遺伝子ノックイン技術



未分化ES細胞が必要
（マウス、ラットでしか樹立されていない）

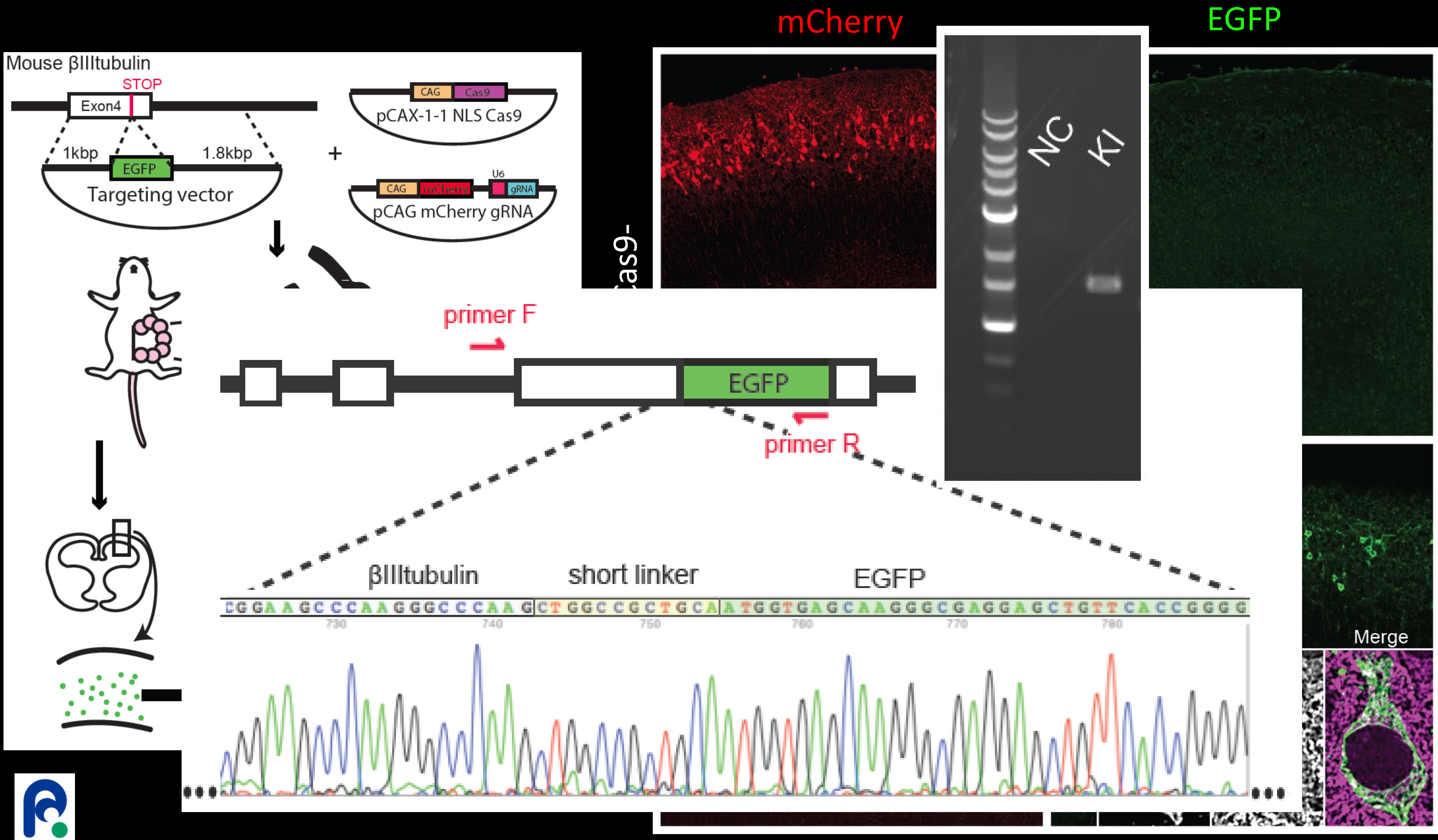


最近の遺伝子ノックイン技術



マウス、ラット以外の哺乳類（豚、牛などの家畜動物）、更にはあらゆる生物種において応用可能（鳥類、魚類、爬虫類　etc.....）

Tubb3 (βIII-tubulin) 遺伝子*de novo*ノックイン



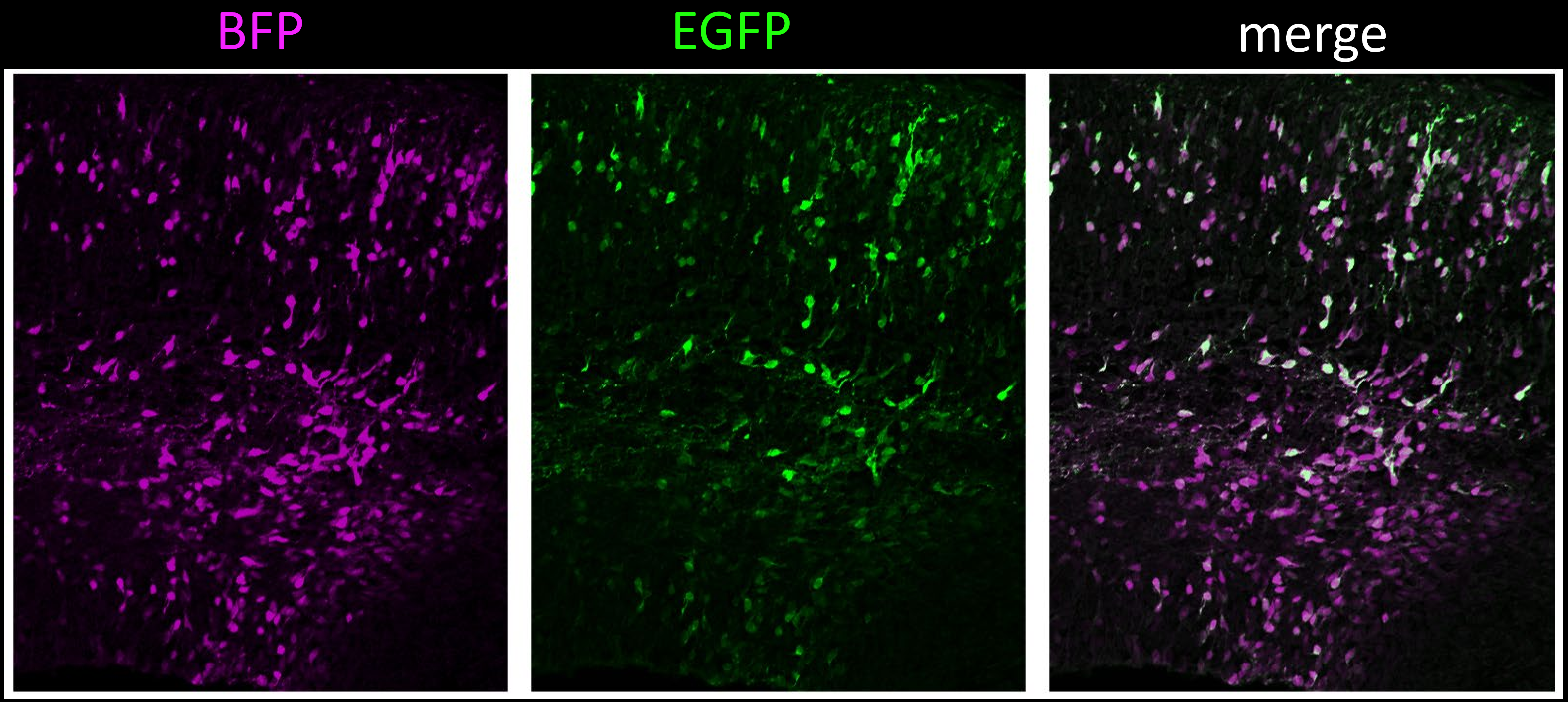
Tsunekawa* & Terhune* et al, *Development* 2016

新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

問題点：
ノックインされないドナーベクターから遺伝子がリークする！

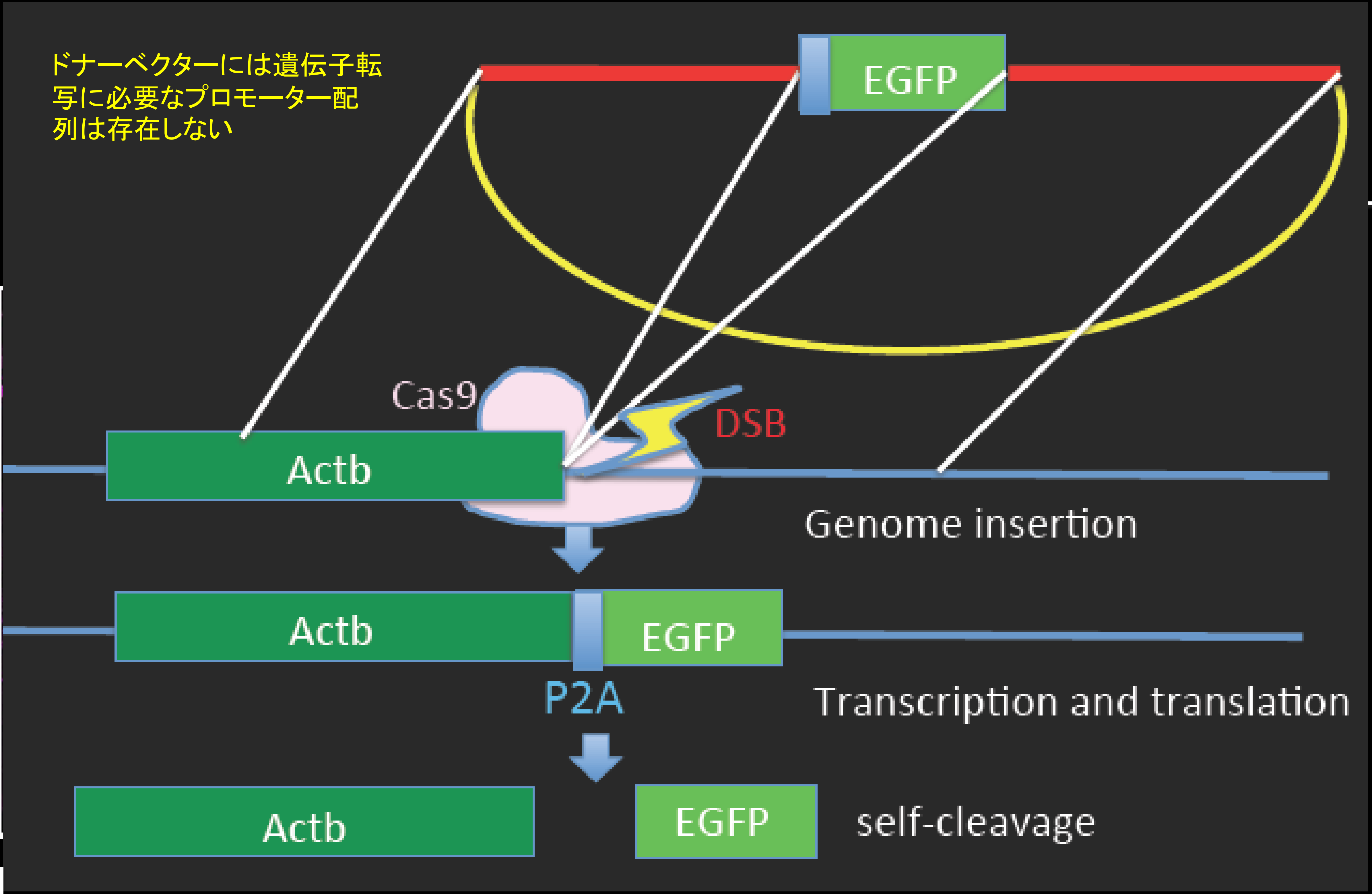
Actb

Cas9-



RIKEN

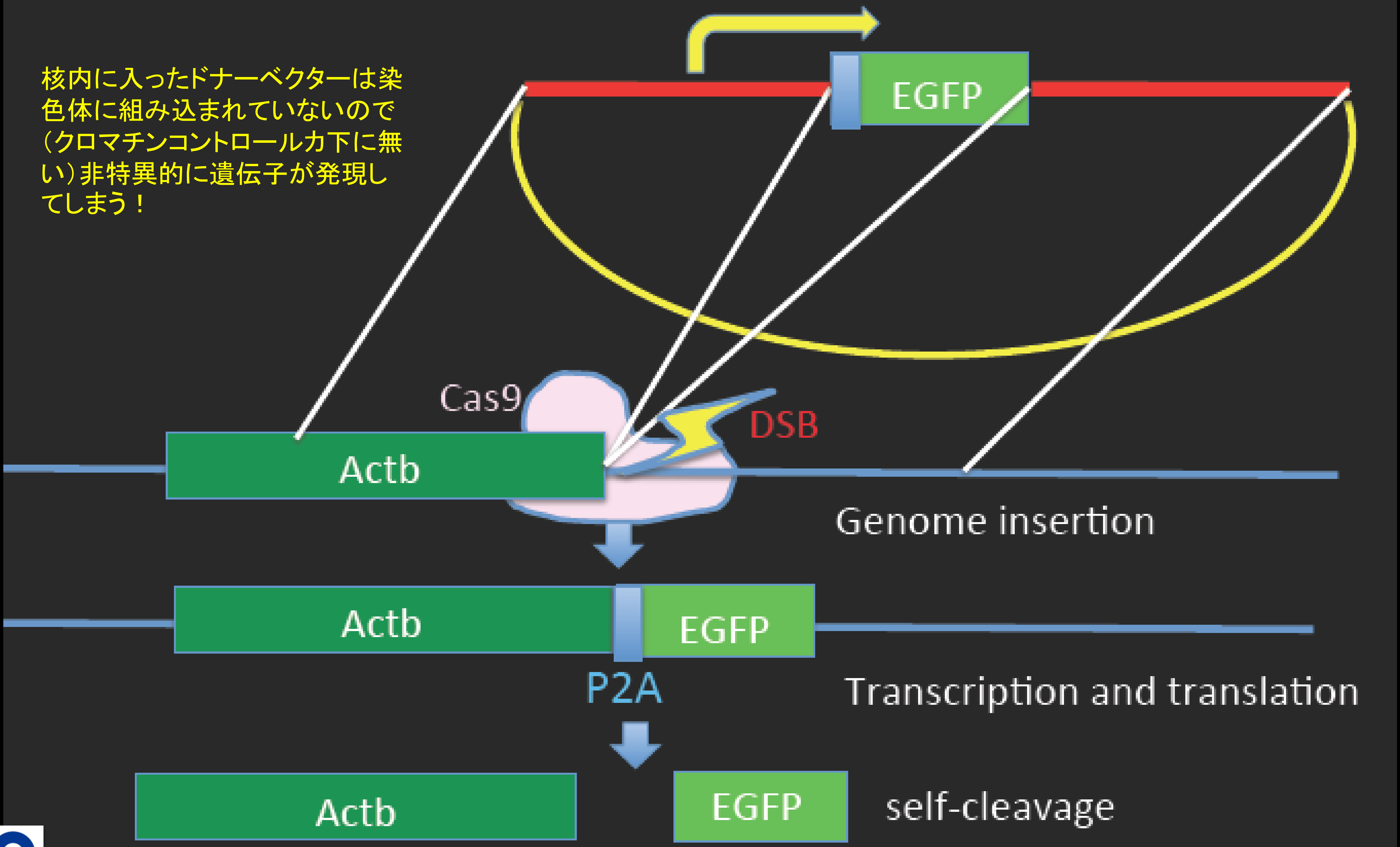
問題点：
ノックインされないドナーベクターから遺伝子がリークする！



問題点：
ノックインされないドナーベクターから遺伝子がリークする！

新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

核内に入ったドナーベクターは染色体に組み込まれていないので（クロマチンコントロール下に無い）非特異的に遺伝子が発現してしまう！



RIKEN

従来技術とその問題点（背景）

CRISPR/Cas9の登場により、受精卵や体細胞において自由自在にゲノム編集（特に遺伝子のノックイン）が可能となった。

しかしながら、遺伝子をノックインするために必要なドナーベクターから細胞内にタンパク質が発現してしまうことがわかった（リーク）。

- 遺伝子ノックイン技術の利点：

  ノックインすることにより、内在性プロモーター活性に則したタンパク質発現が実現可能

  ー組織特異性な遺伝子発現（組織特異的プロモーターの限界）

  ー内在性遺伝子発現量の再現（過剰発現と差別化）

従来技術とその問題点（背景）

CRISPR/Cas9の登場により、受精卵や体細胞において自由自在にゲノム編集（特に遺伝子のノックイン）が可能となった。

しかしながら、遺伝子をノックインするために必要なドナーベクターから細胞内にタンパク質が発現してしまっていた（リーク）。

- 遺伝子ノックイン技術の利点：

ノックインすることにより、内在性プロモーター活性に則したタンパク質発現が実現可能

ー組織特異性な遺伝子発現（組織特異的プロモーターの限界）✗

ー内在性遺伝子発現量の再現（過剰発現と差別化）✗

我々の発明した新技術：ノックインドナーベクターのDNA配列を最適化する技術

技術の概要：

ドナーベクターDNAからタンパク質翻訳に必要な開始コドンになりうるDNA配列を最適化した。

- ATG配列（メチオニン：真核生物で最もよく使われる開始コドン）をロイシンに変換。
- その他ATC、CTG，ATAなどマイナーなコドンもサイレント変異を入れる
- 特にリークに対する感度が非常に高いCreなどのリコンビネース（組み換え酵素）をノックインする際必須になると思われる。

Cre-loxp　システム

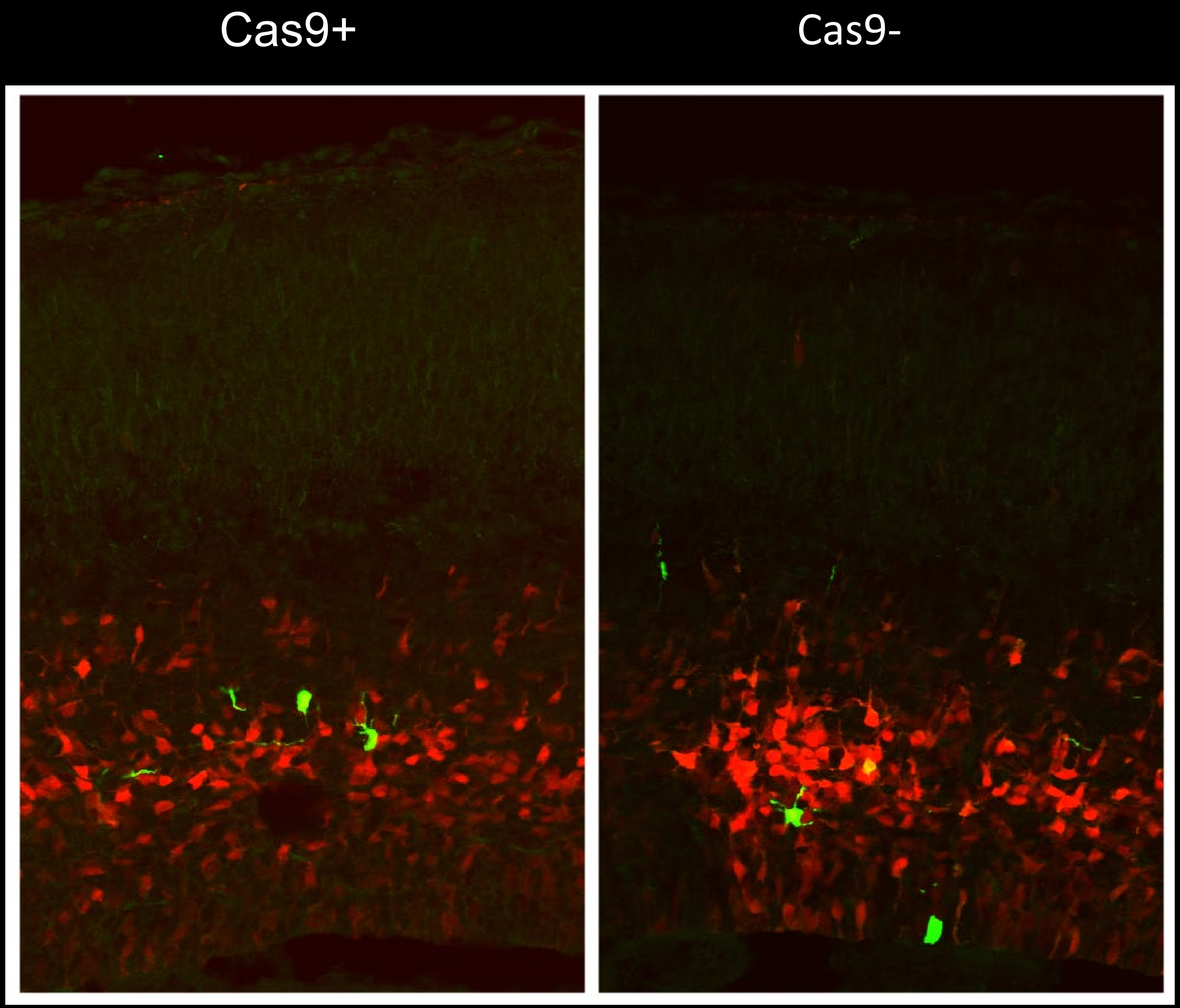
バクテリオファージP1に由来するCre リコンビネースはType I トポイソメラーゼで、34bpからなるloxP配列間でのDNAの部位特異的組換えを行う。

任意の遺伝子座にCreをノックインしたマウスをもちいることにより、

- loxP配列でターゲットする遺伝子を挟んだノックインマウス（floxマウス）と掛け合わせることにより、Creが発現した細胞でのみ遺伝子を欠失させる（**コンディショナルノックアウト**）。
- CAG-floxSTOP-GFPトランスジェニックマウス（CAGプロモーターとGFPの間にloxp配列で挟んだ転写STOP配列が挿入されている）と掛け合わせることにより、Creが発現した事のある細胞系譜が全てGFPでラベルされる（**リニエージトレーシング**）。
- CAG-floxSTOP-geneX(任意の遺伝子)トランスジェニックマウスと掛け合わせることで、Creが発現した細胞のみで任意の遺伝子を過剰発現させる（**細胞特異的遺伝子発現**）

などの技術に必須。
非常に高感度で、ごく少量のCreで組み換えが起こる

Cre ノックインドナーはリークする



Cas9+
pCAX-hCas9
pCAG-mChery-gRNA
pCAG-flox-STOP-GFP
Cre Donor

Cas9-

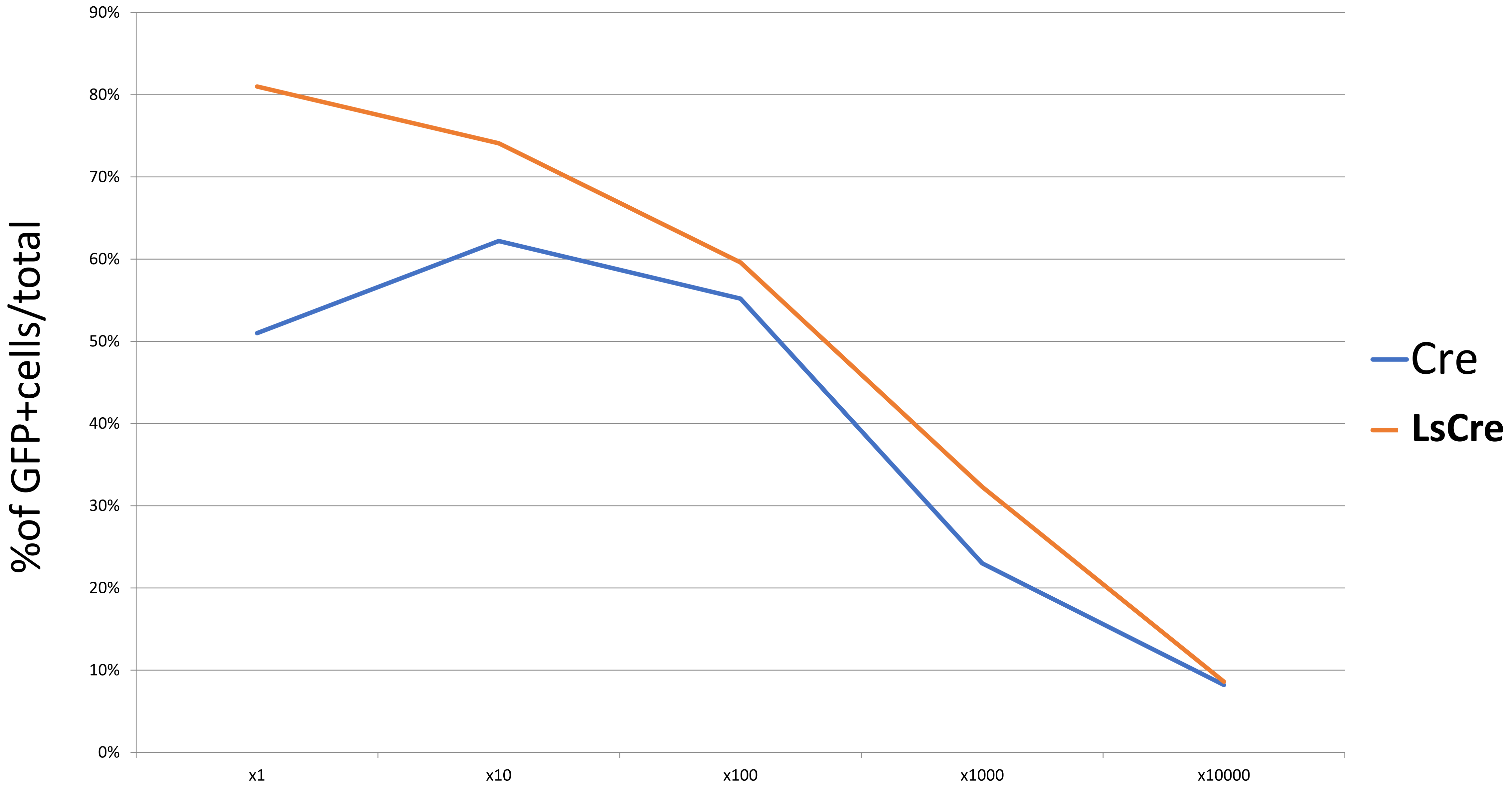
pCAG-mChery-gRNA
pCAG-flox-STOP-GFP
Cre Donor

E14.5: electroporation
Fixation:2 days later

ノックインドナー用コドン最適化：CreをLsCreに

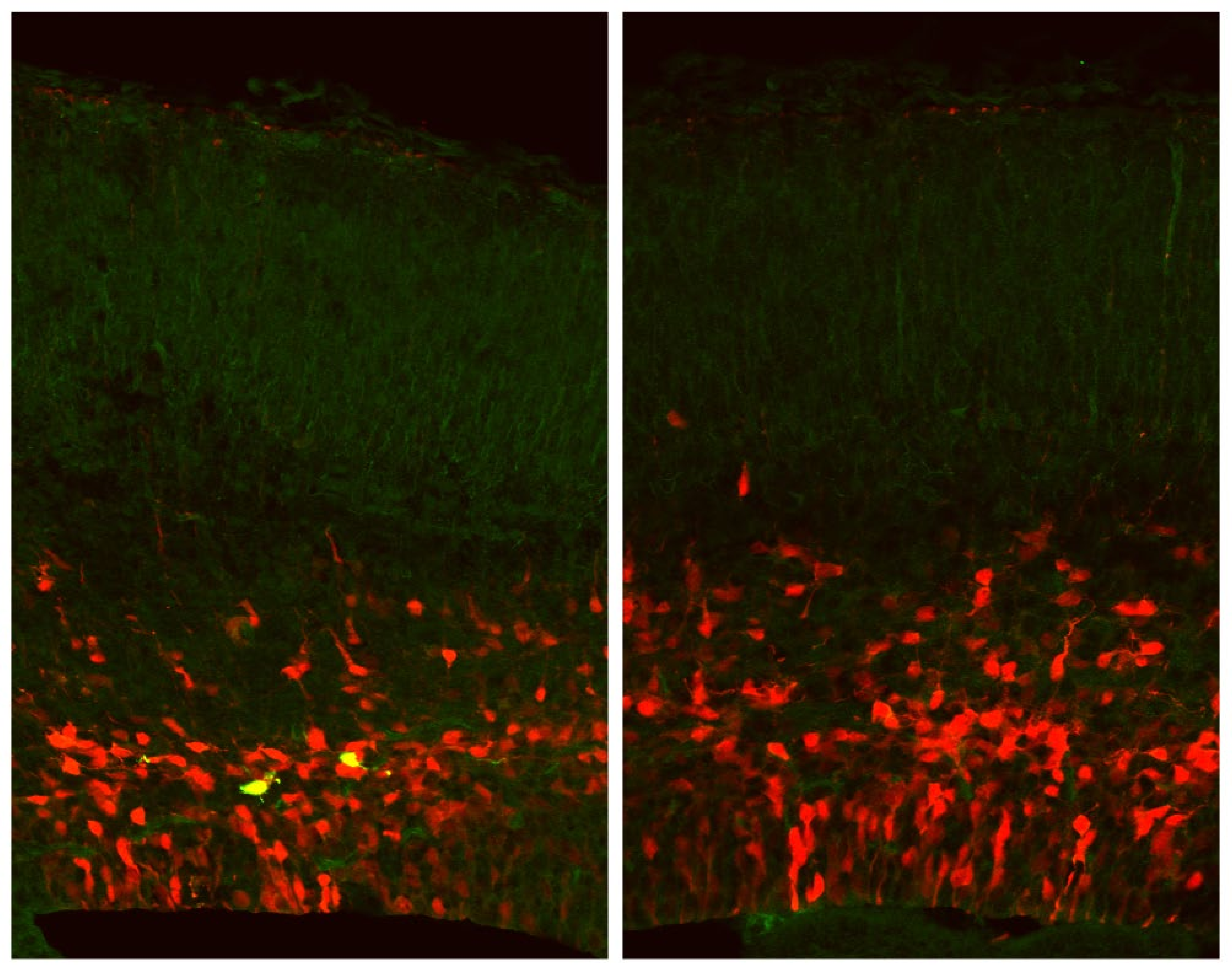
```
          1         10        20        30        40        50        60        70        80        90        100       110       120       130
      Cre TCCAATTTACTGACCGTACACCAAAATTTGCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGAGTGATGAGGTTCGCAAGAACCTGATGGACATGTTCAGGGATCGCCAGGCGTTTTCTGAGCATACCTGGAAAATGC
    LsCre TCCAATTTACTCACCGTACACCAAAATCTCCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGAGTGATGAGGTTCGCAAGAACCTCCTCGACCTCTTCAGGGATCGCCAGGCGTTTTCTGAGCATACCTGGAAACTCC
Consensus TCCAATTTACTcACCGTACACCAAAATcTcCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGAGTGATGAGGTTCGCAAGAACCTcaTcGACaTcTTCAGGGATCGCCAGGCGTTTTCTGAGCATACCTGGAAAaTcC

          131       140       150       160       170       180       190       200       210       220       230       240       250       260
      Cre TTCTGTCCGTTTGCCGGTCGTGGGCGGCATGGTGCAAGTTGAATAACCGGAAATGGTTTCCCGCAGAACCTGAAGATGTTCGCGATTATCTTCTATATCTTCAGGCGCGCGGTCTGGCAGTAAAAACTAT
    LsCre TTCTCTCCGTTTGCCGGTCGTGGGCGGCATGGTGCAAGCTCAATAACCGGAAATGGTTTCCCGCAGAACCTGAAGATGTTCGCGATTATCTTCTATATCTTCAGGCGCGCGGTCTCGCAGTAAAAACTAT
Consensus TTCTcTCCGTTTGCCGGTCGTGGGCGGCATGGTGCAAGcTcAATAACCGGAAATGGTTTCCCGCAGAACCTGAAGATGTTCGCGATTATCTTCTATATCTTCAGGCGCGCGGTCTcGCAGTAAAAACTAT

          261       270       280       290       300       310       320       330       340       350       360       370       380       390
      Cre CCAGCAACATTTGGGCCAGCTAAACATGCTTCATCGTCGGTCCGGGCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATGCTGTTTCACTGGTTGTGCGGCGGATCCGAAAAGAAAACGTTGATGCCGGTGAACGTGCA
    LsCre CCAGCAACATCTCGGCCAGCTAAACCTCCTTCATCGTCGGTCCGGGCTCCCACGACCAAGTGACAGCAATGCTGTTTCACTCGTTCTCCGGCGGATCCGAAAAGAAAACGTTGATGCCGGTGAACGTGCA
Consensus CCAGCAACATcTcGGCCAGCTAAACaTcCTTCATCGTCGGTCCGGGCTcCCACGACCAAGTGACAGCAATGCTGTTTCACTcGTTcTcCGGCGGATCCGAAAAGAAAACGTTGATGCCGGTGAACGTGCA

          391       400       410       420       430       440       450       460       470       480       490       500       510       520
      Cre AAACAGGCTCTAGCGTTCGAACGCACTGATTTCGACCAGGTTCGTTCACTCATGGAAAATAGCGATCGCTGCCAGGATATACGTAATCTGGCATTTCTGGGGATTGCTTATAACACCCTGTTACGTATAG
    LsCre AAACAGGCTCTAGCGTTCGAACGCACTGATTTCGACCAGGTTCGTTCACTCCTCGAAAATAGCGATCGCTGCCAGGATATACGTAATCTCGCATTTCTCGGGATTGCTTATAACACCCTCTTACGTATAG
Consensus AAACAGGCTCTAGCGTTCGAACGCACTGATTTCGACCAGGTTCGTTCACTCaTcGAAAATAGCGATCGCTGCCAGGATATACGTAATCTcGCATTTCTcGGGATTGCTTATAACACCCTcTTACGTATAG

          521       530       540       550       560       570       580       590       600       610       620       630       640       650
      Cre CCGAAATTGCCAGGATCAGGGTTAAAGATATCTCACGTACTGACGGTGGGAGAATGTTAATCCATATTGGCAGAACGAAAACGCTGGTTAGCACCGCAGGTGTAGAGAAGGCACTTAGCCTGGGGGTAAC
    LsCre CCGAAATTGCCAGGATCAGGGTTAAAGATATCTCACGTACTGACGGTGGGAGACTCTTAATCCATATTGGCAGAACGAAAACGCTCGTTAGCACCGCAGGTGTAGAGAAGGCACTTAGCCTGGGGGTAAC
Consensus CCGAAATTGCCAGGATCAGGGTTAAAGATATCTCACGTACTGACGGTGGGAGAaTcTTAATCCATATTGGCAGAACGAAAACGCTcGTTAGCACCGCAGGTGTAGAGAAGGCACTTAGCCTGGGGGTAAC

          651       660       670       680       690       700       710       720       730       740       750       760       770       780
      Cre TAAACTGGTCGAGCGATGGATTTCCGTCTCTGGTGTAGCTGATGATCCGAATAACTACCTGTTTTGCCGGGTCAGAAAAAATGGTGTTGCCGCGCCATCTGCCACCAGCCAGCTATCAACTCGCGCCCTG
    LsCre TAAACTGGTCGAGCGATGGATTTCCGTCTCTGGTGTAGCTGATGATCCGAATAACTACCTGTTTTGCCGGGTCAGAAAAAATGGTGTTGGCGCGCCATCTGCCACCAGCCAGCTATCAACTCGCGCCCTG
Consensus TAAACTGGTCGAGCGATGGATTTCCGTCTCTGGTGTAGCTGATGATCCGAATAACTACCTGTTTTGCCGGGTCAGAAAAAATGGTGTTGcCGCGCCATCTGCCACCAGCCAGCTATCAACTCGCGCCCTG

          781       790       800       810       820       830       840       850       860       870       880       890       900       910
      Cre GAAGGGATTTTTGAAGCAACTCATCGATTGATTTACGGCGCTAAGGATGACTCTGGTCAGAGATACCTGGCCTGGTCTGGACACAGTGCCCGTGTCGGAGCCGCGCGAGATATGGCCCGCGCTGGAGTTT
    LsCre GAAGGGATTTTTGAAGCAACTCATCGATTGATTTACGGCGCTAAGGATGACTCTGGTCAGAGATACCTGGCCTGGTCTGGACACAGTGCCCGTGTCGGAGCCGCGCGAGATATGGCCCGCGCTGGAGTTT
Consensus GAAGGGATTTTTGAAGCAACTCATCGATTGATTTACGGCGCTAAGGATGACTCTGGTCAGAGATACCTGGCCTGGTCTGGACACAGTGCCCGTGTCGGAGCCGCGCGAGATATGGCCCGCGCTGGAGTTT

          911       920       930       940       950       960       970       980       990       1000      1010      1020 1026
      Cre CAATACCGGAGATCATGCAAGCTGGTGGCTGGACCAATGTAAATATTGTCATGAACTATATCCGTAACCTGGATAGTGAAACAGGGGCAATGGTGCGCCTGCTGCAAGATGGCGAT
    LsCre CAATACCGGAGATCATGCAAGCTGGTGGCTGGACCAATGTAAATATTGTCATGAACTATATCCGTAACCTGGATAGTGAAACAGGGGCAATGGTGCGCCTGCTGGAAGATGGCGAT
Consensus CAATACCGGAGATCATGCAAGCTGGTGGCTGGACCAATGTAAATATTGTCATGAACTATATCCGTAACCTGGATAGTGAAACAGGGGCAATGGTGCGCCTGCTGcAAGATGGCGAT
```

ノックインドナー用コドン最適化：CreをLsCreに



LsCre ノックインドナーはリークしない
（マウスTubb3遺伝子座へのノックイン）

Cas9+ Cas9-



Cas9+
pCAX-hCas9
pCAG-mChery-gRNA
pCAG-flox-STOP-GFP
optiCre Donor

Cas9-
pCAG-mChery-gRNA
pCAG-flox-STOP-GFP
optiCre Donor

E14.5: electroporation
Fixation:2 days later

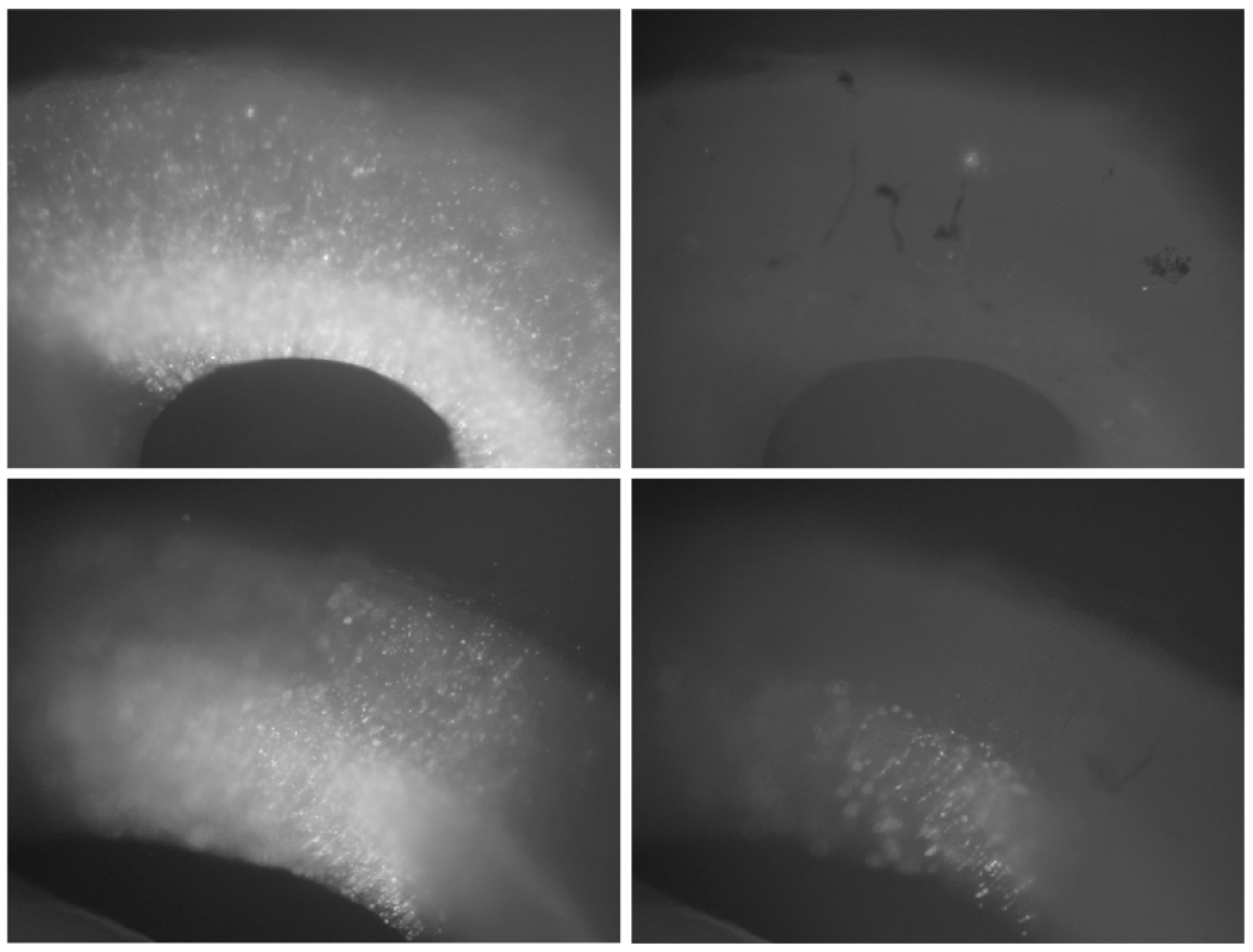
新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

LsCre ノックインドナーはリークしない（フェレットPax6遺伝子座へのノックイン）

mCherry EGFP

-Cas9

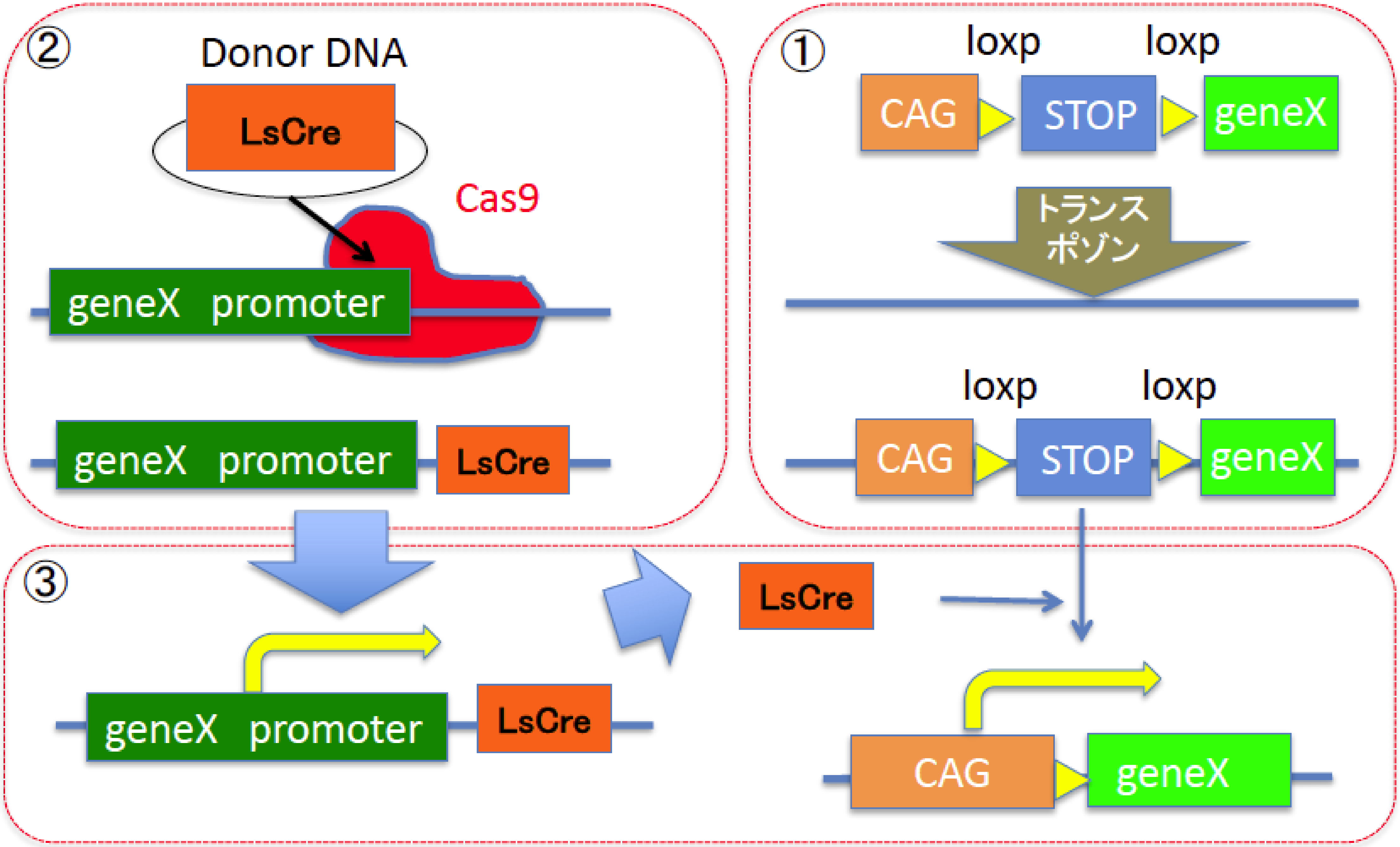
+Cas9



pCAX-hCas9
Pax6 gRNA
pLR5 CAG-mChery
pLR5 CAG-flox-STOP-GFP
pCAG hyper piggybase
optiCre2 Pax6 HDR Donor

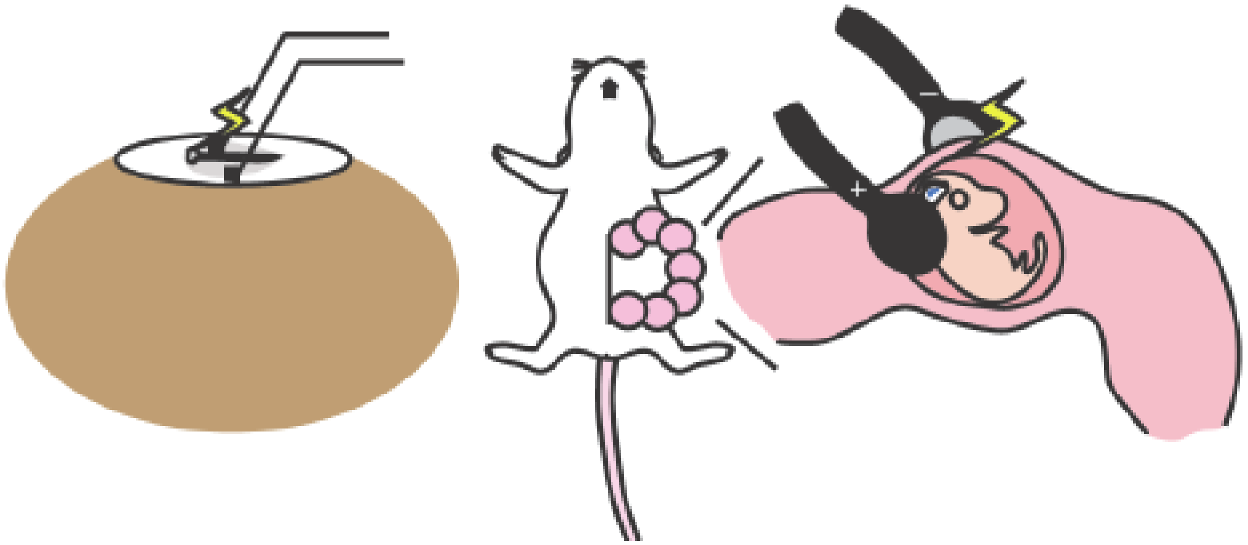
EP@E30-34

想定される用途：超細胞種特異的遺伝子発現システム



想定される用途：超細胞種特異的遺伝子発現システム

電気穿孔法による*de novo* gene targeting



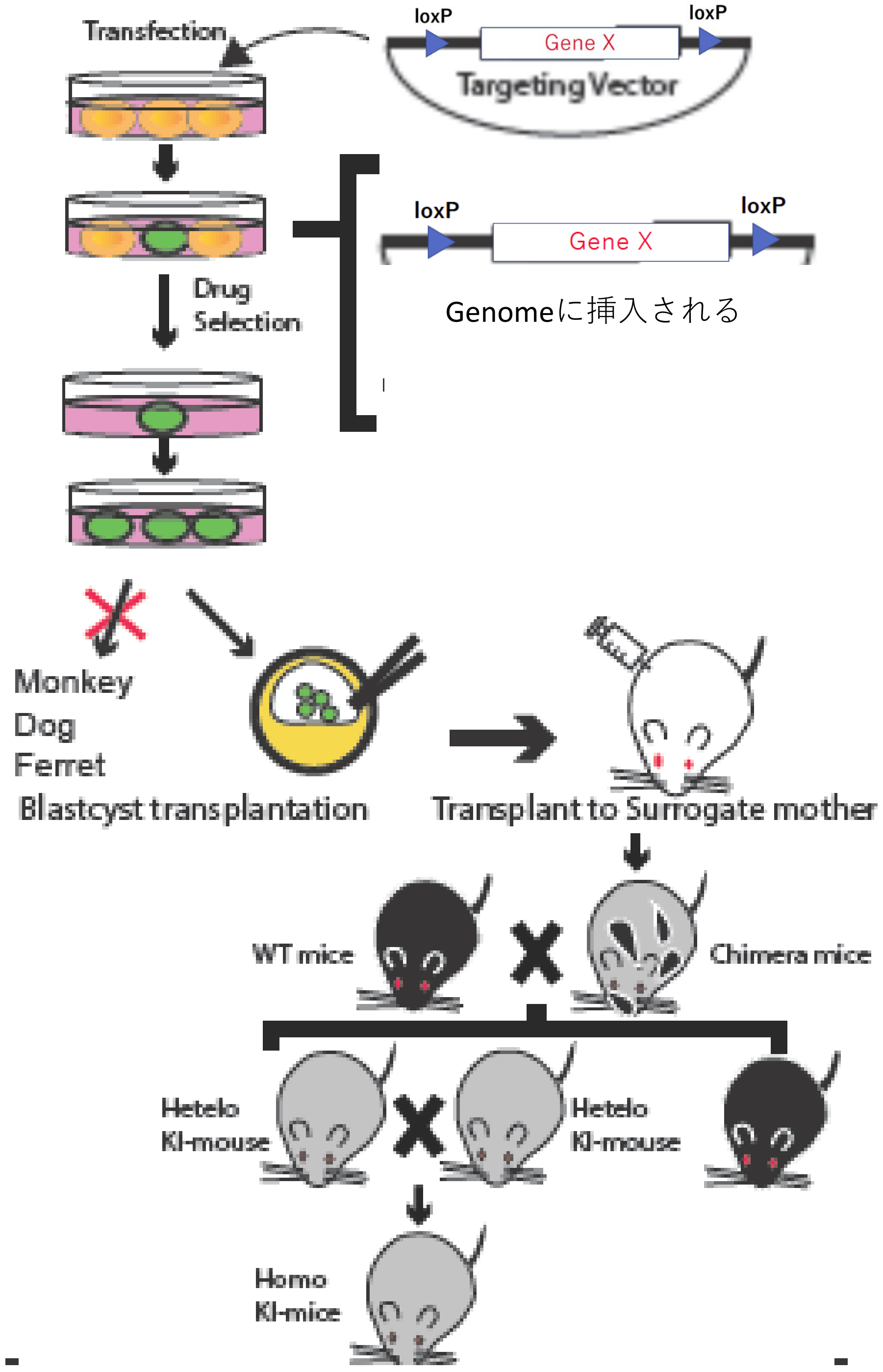
現在開発中

アデノ随伴ウイルス（AAV）によるhomology-independent targeted integration (HITI)

- 増殖中の細胞に対して高効率に遺伝子組み換え可能
- ニワトリ、マウス、フェレット、爬虫類などに適用可能
- 主に発生期の中枢神経系で活用
  - ーコンディショナルノックアウト
  - ーリニエージトレーシング

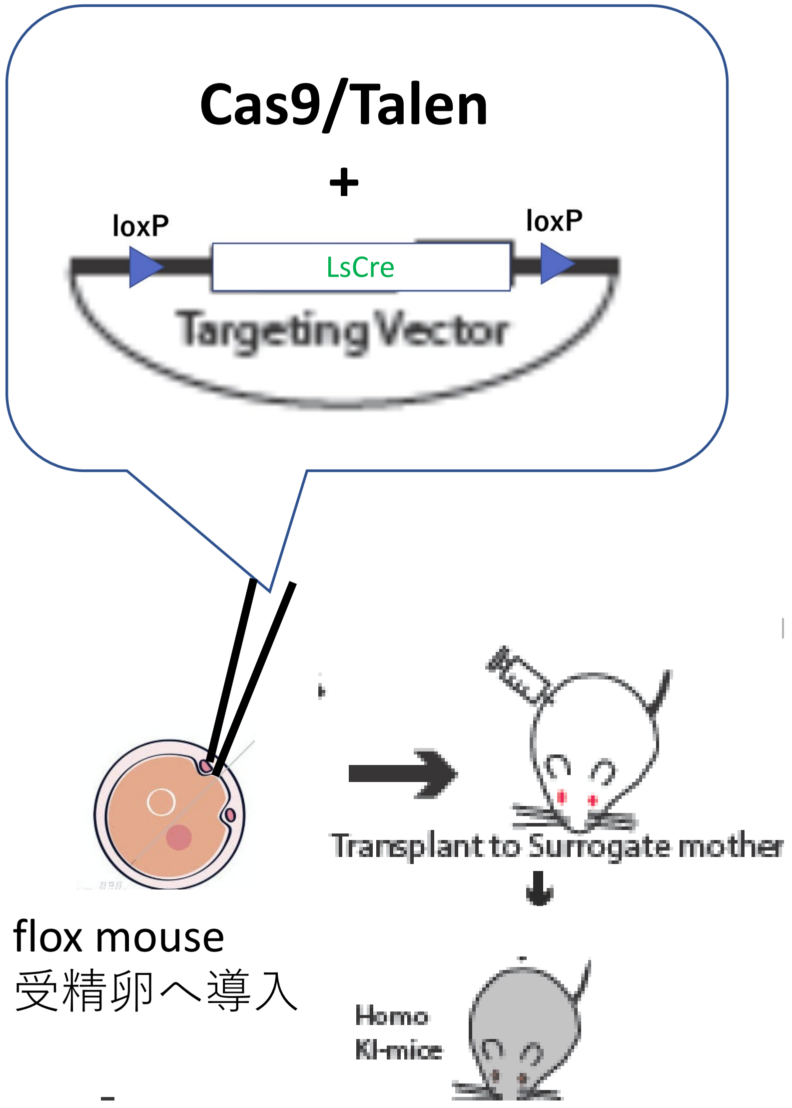
- 非増殖細胞に対しても遺伝子組み換え可能
- 齧歯類、鳥類、霊長類など様々に適用可能
- 生後の動物全身で活用可能
  - ー局所的細胞特異的遺伝子発現（中枢神経系でのコネクトーム）
  - ー全身性の細胞特異的遺伝子発現（オプトジェネティクスによる神経機能解析）

想定される用途：ワンステップコンディショナルノックインマウス

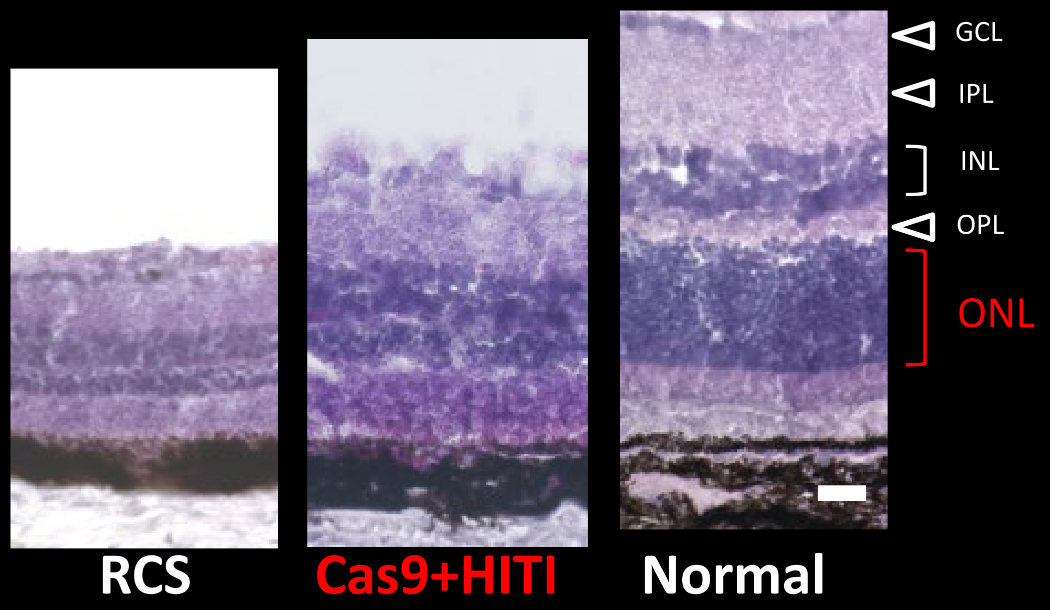


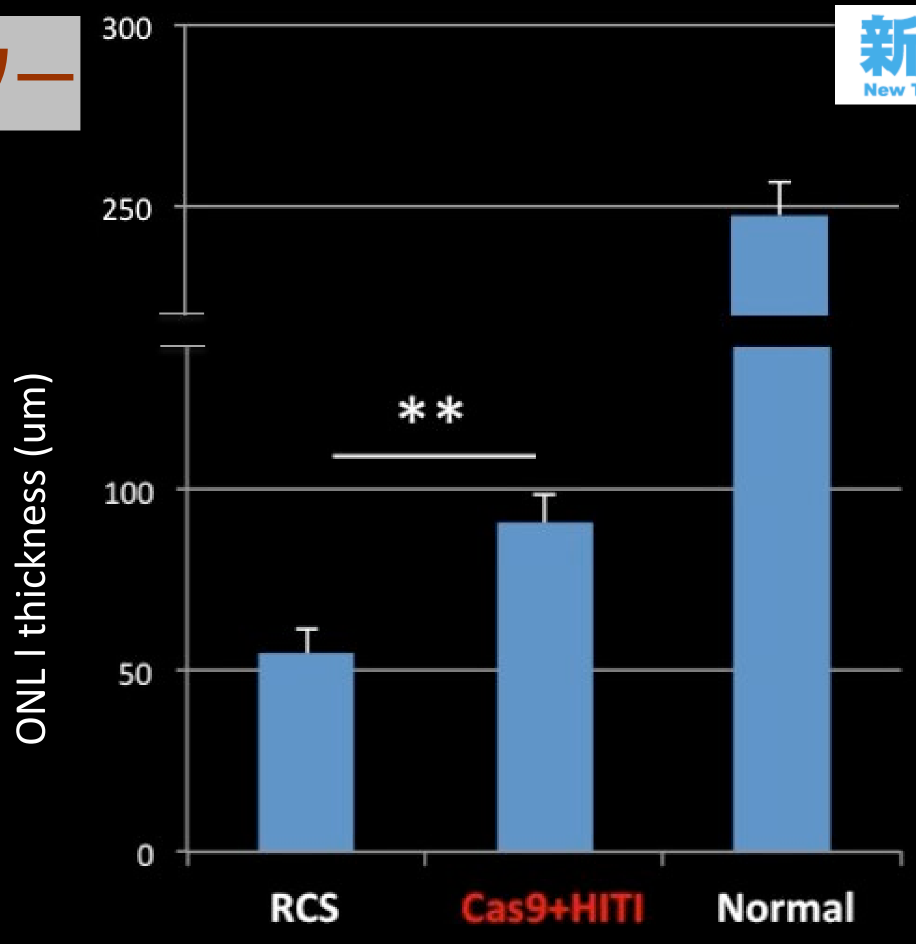
↓

遺伝子特異的にCreを発現するマウスラインと更に掛け合わせが必要

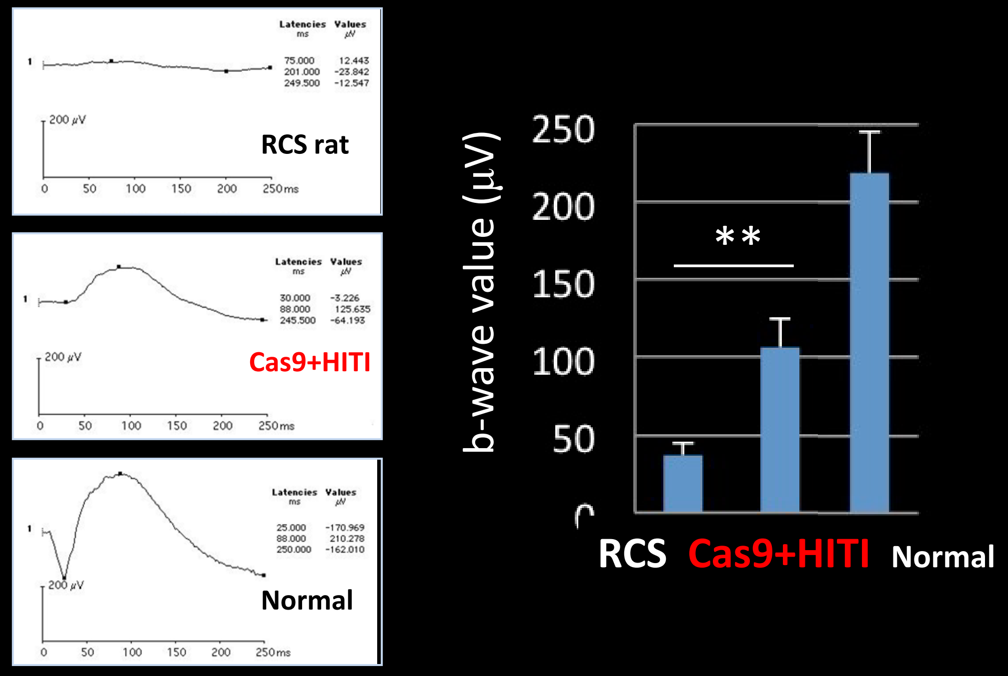


想定される用途：遺伝子治療用ベクター

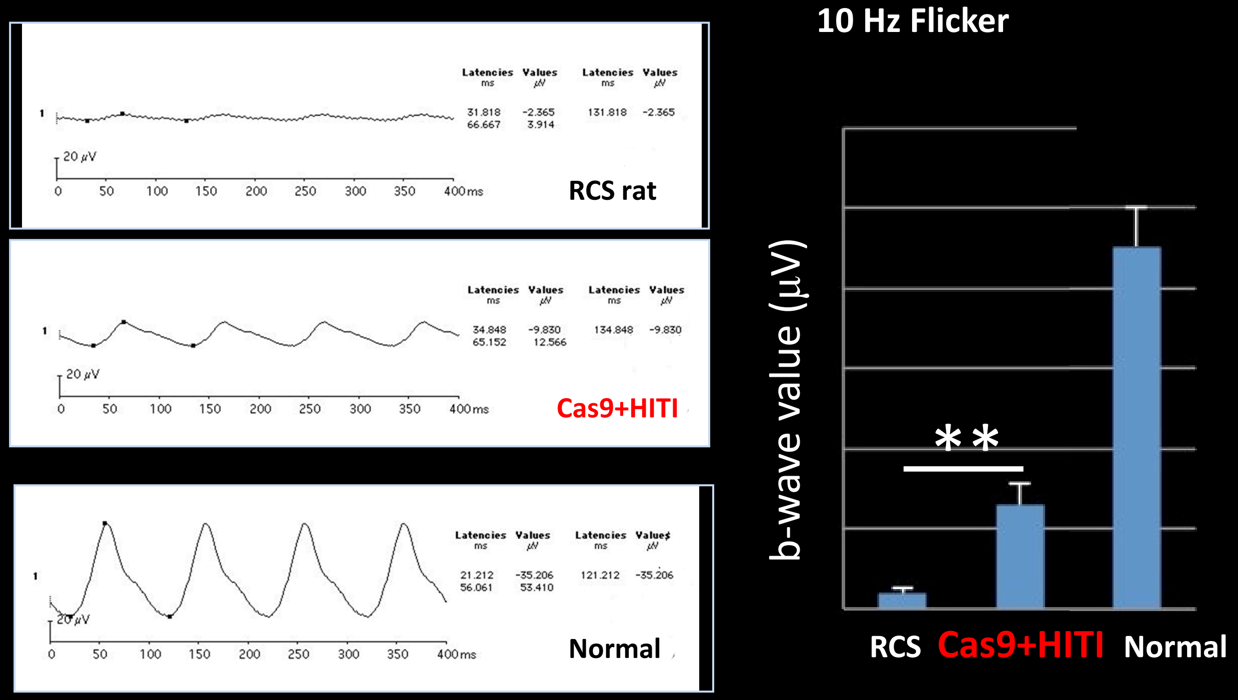




Rod-Cone Response



10 Hz Flicker



Suzuki* Tsunekawa* et al, *Nature* 2016

実用化に向けた課題

- 現段階では、プラスミドベースのノックインではリークの制御が可能なところまで開発済み。現在、AAVなどのウイルスベクターでのリークレス化を開発中。
- ウイルスベクターのリークレス化を開発後、遺伝子治療用ドナーベクターに適用するため研究を行っていく。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称　：ポリヌクレオチドおよびその利用
- 出願番号　　：PCT/JP2020/040738
- 出願人　　　：理化学研究所
- 発明者　　　：恒川　雄二、松崎　文雄

お問い合わせ先

株式会社理研鼎業（りけんていぎょう）
戦略企画部　（理研新技術説明会事務局）
E-mail: senryaku@innovation-riken.jp

※ 連携に関する窓口は、理化学研究所より委託を受けて実施しております。