



CRISPR/Cas9 を活用したエピゲノム編集システムの開発に成功 ～次世代の遺伝子発現制御システムの開発に向けて～

研究成果のポイント

- ・ 標的遺伝子のメチル化プロモーター領域を非メチル化プロモーター領域に変えることで、標的遺伝子の転写を強力に活性化させる、新たなシステム体系の開発に成功。
- ・ ヒト体細胞で神経細胞分化に関わる転写因子 OLIG2 の発現を強力に活性化させることに成功し、ヒト多能性幹細胞から神経細胞へ高効率で誘導することに成功。
- ・ ヒト体細胞で多能性幹細胞因子 NANOG の発現を活性化させることに成功し、メチル化によって抑制されている遺伝子の発現を強力に活性化できることを証明。
- ・ 複雑な転写ネットワークの解明、人工遺伝子回路の作製、細胞工学に応用されることが期待される。

研究成果の概要

近年、DNA 結合能を保持し核酸分解酵素活性を欠損させた Cas9 (dCas9) が、転写活性化因子との結合により標的遺伝子の転写を活性化することが証明されました。しかし、これらシステムの転写活性化能は弱く、細胞運命転換¹の効率は低い(～8%)状態でした。そこで近藤教授等の研究グループは、転写活性化の効果が強く、効率よく細胞運命転換を誘導できる新たな方法として、標的遺伝子の領域のエピゲノム²のみを書き換える CRISPR³システムの開発を試みました。神経細胞分化に関わる転写因子 OLIG2 のプロモーター⁴領域をモデル標的として、そのメチル化プロモーター領域を非メチル化プロモーター領域に変えた結果⁵、ヒト体細胞に OLIG2 発現を強力に誘導することができました。更に、多能性幹細胞を用いた OLIG2 プロモーター変換は高効率(20%)に神経細胞分化を誘導しました。

本研究成果は、化学分野において世界最高峰の学術雑誌「Angewandte Chemie International Edition」のオンライン版に2016年4月15日付で公開されました。

論文発表の概要

研究論文名：A powerful CRISPR/Cas9-based method for targeted transcriptional activation.
(CRISPR/Cas9 を用いた強力な標的遺伝子転写活性化法)

著者：片山 翔太, 森口 徹生, 大津 直樹, 近藤 亨 (北海道大学遺伝子病制御研究所)

公表雑誌：Angewandte Chemie International Edition

公表日：ドイツ時間2016年4月15日(金) (オンライン公開)

研究成果の概要

(背景)

近年、DNA 結合能を保持し核酸分解酵素活性を欠損させた dCas9 が、転写活性化因子との結合により標的遺伝子の転写を活性化することが証明されました。しかし、これらシステムの転写活性化能は弱く、細胞運命転換の効率は低い（～8%）状態でした。そこで近藤教授等の研究グループは、転写活性化の効果が強く、効率よく細胞運命転換が起こせる、標的遺伝子の領域のエピゲノムのみを書き換える CRISPR システムの開発を試みました。

(研究手法)

CRISPR/Cas9 を用いて標的遺伝子のメチル化プロモーター領域を切断し、そこに短鎖相同末端結合 (MMEJ) を利用して非メチル化プロモーター領域を挿入します。これによって、標的遺伝子のプロモーターのメチル化状態が非メチル化状態へと解除され、強力な転写活性化が誘導されます。

(研究成果)

標的遺伝子のメチル化プロモーター領域を非メチル化プロモーター領域に変えることによって、標的遺伝子の転写（発現）を強力に誘導するシステム・技術体系の開発に世界に先駆けて成功しました。このシステム体系を利用することで、ヒト体細胞で OLIG2 の発現を強力に活性化することができ、多能性幹細胞に応用した際に高効率（20%）で神経細胞へ誘導されることが確認されました。驚くべきことに、このシステムで誘導された OLIG2 の発現はヒト体細胞で 21 日間経っても高いままでした。メチル化酵素の発現量に依存すると考えられますが、このシステム体系を利用することで標的遺伝子の長期間の転写活性化状態の維持が期待できます。更に、ヒト体細胞において NANOG の発現を強力に活性化することにも成功し、プロモーター領域のメチル化によって発現抑制を受けている遺伝子の発現を強力に活性化できることが示唆されました。

(今後への期待)

本研究成果は、合成生物学・幹細胞生物学領域において広く利用されることが期待されます。また、本研究成果を個体レベルへと応用することで、エピゲノムの異常による疾患に対する新たな治療法となりうると考えられます。

お問い合わせ先

所属・職・氏名：北海道大学遺伝子病制御研究所 教授 近藤 亨（こんどう とおる）

TEL：011-706-6082 FAX：011-706-7870 E-mail：tkondo@igm.hokudai.ac.jp

ホームページ：<http://www.igm.hokudai.ac.jp/stemcell/>

(用語解説)

1. 細胞運命転換

細胞固有の性質を変えること。例えば、皮膚細胞から神経細胞、血液細胞、筋細胞を生み出すことを意味する。

2. エピゲノム

ゲノム上の DNA のメチル化やヒストン修飾の状態を指す。細胞運命転換に関与する転写因子は DNA のメチル化によって発現抑制を受けていることが多い。

3. CRISPR/Cas9

RNA とタンパク質 (Cas9) からなる複合体で, RNA を人工的にデザインすることでゲノム上の狙った領域を改変することができる。

4. プロモーター

各遺伝子の発現を制御している領域で, この領域の状態で遺伝子の発現量が決まってくる。

5. メチル化・非メチル化

ゲノムDNA内の特定のシトシン・グアニン (CG) 配列は, DNAメチル化酵素によるメチル化により転写抑制される。メチル化CG (CpG) の非メチル化は転写活性化に関わる。

(参考図)

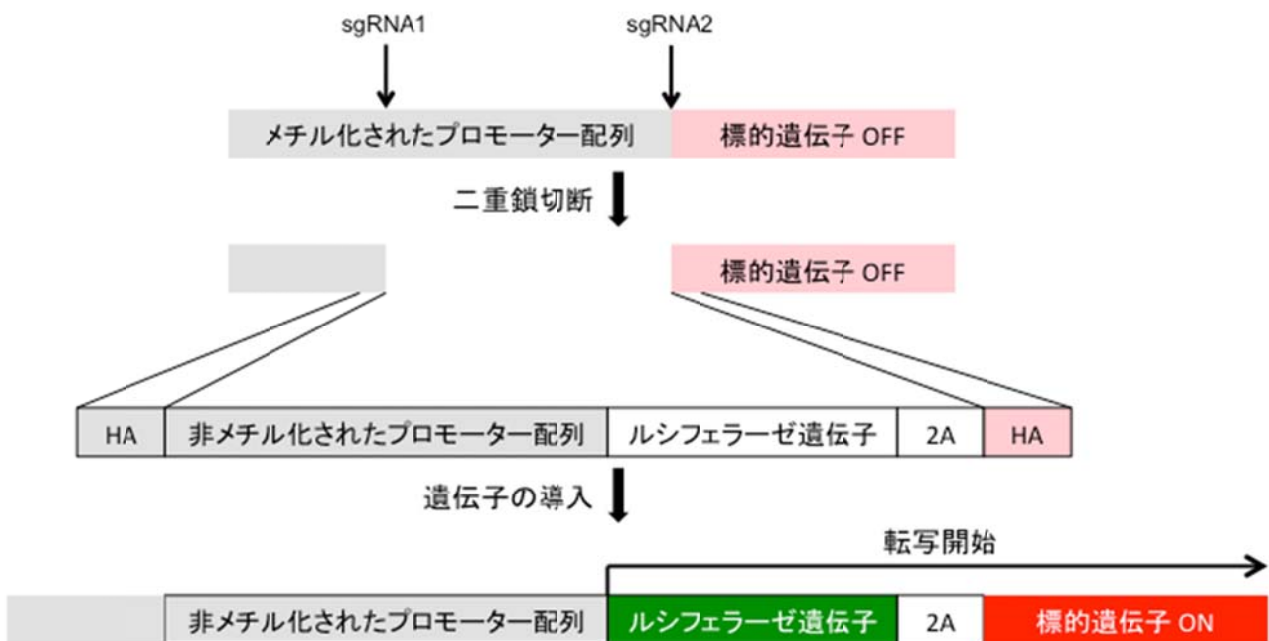


図 : CRISPR/Cas9 を活用したエピゲノム編集システム

CRISPR/Cas9 にてメチル化プロモーター領域を切り出し, 微小相同末端結合 (microhomology-mediated end joining) を利用して非メチル化プロモーター領域を導入する。このシステム体系によって標的遺伝子の転写 (発現) を強力に活性化できる。ルシフェラーゼ遺伝子は, プロモーターの活性化を評価するために導入した。

2A : 自己切断配列。2A 配列の前後に挿入された 2 つの遺伝子産物は, 2A の自己分解を経て 2 つのタンパク質として機能する。

HA (homology arm) : 相同組み換えに働く切断隣接配列。