

2023年11月30日

報道解禁制限あり【11月30日15時解禁】

国立研究開発法人 産業技術総合研究所／TOPPAN 株式会社／株式会社インプラントイノベーションズ

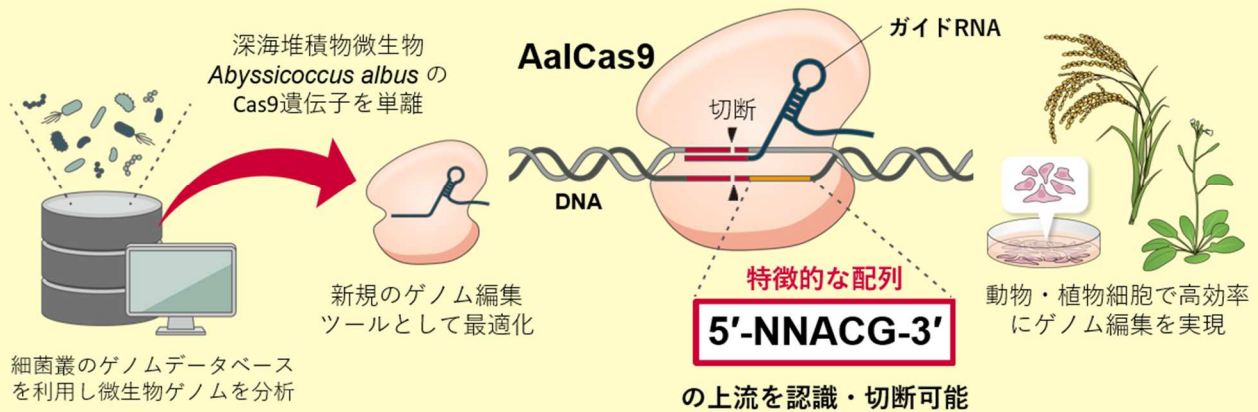
## 特徴的な配列を認識してゲノムを切断！

動物・植物においてゲノム編集を高効率に実現する新しいツール

### ポイント

- 新しいゲノム編集ツールとなりうる遺伝子「Aa1Cas9」を単離
- ゲノム配列上の特徴的な配列「5'-NNACG-3'」をターゲットにしていることを発見
- 動物細胞・植物においてゲノム編集を実用に足る効率で実施できることを確認

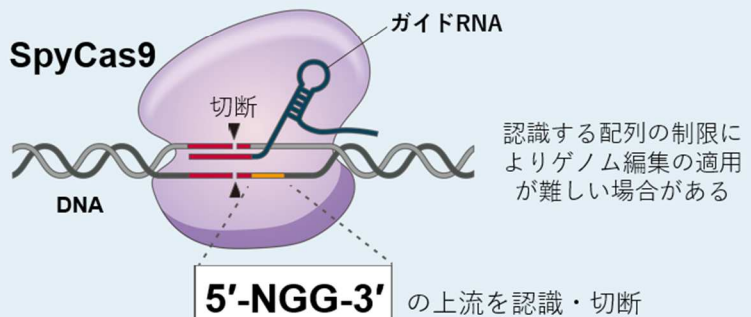
### 新技术：既存技術では認識できない配列を切断するゲノム編集ツール



### 既存技術

腸内細菌  
*Streptococcus pyogenes*  
由来のゲノム編集ツール

権利者が多数



本研究による発見の概要：特徴的な配列(5'-NNACG-3')を PAM 配列として認識し、切断可能（上段）

既存技術（下段）では当該配列は PAM 配列として認識できない

※N は A, G, C, T のいずれでも良い場合の表記

### 概要

国立研究開発法人 産業技術総合研究所（以下「産総研」という）生物プロセス研究部門 植物機能制御研究グループ 中村 彰良 主任研究員、菅野 茂夫 主任研究員らは、TOPPAN ホールディングスのグループ会社である TOPPAN

株式会社（以下「TOPPAN」という）、株式会社インプラントイノベーションズ（以下「インプラント」という）と共同で、新しいゲノム編集ツール「AaCas9」を発見・開発し、特許登録を受けました。深海堆積物から単離された微生物のゲノムにコードされている「AaCas9」は、PAM 配列を認識し、ガイド RNAにより、ターゲット DNA 配列を切断する酵素です。

産総研と TOPPAN、インプラントは、本ゲノム編集ツール「AaCas9」がゲノム配列上の「5'-NNACG-3'（N は A, G, C, T のいずれでも良い場合の表記）」という配列を PAM 配列として認識すること、ゲノムにコードされた野生型よりも短い配列にした人工型のガイド RNA が高活性であることを見だし、ゲノム編集ツールとして利用可能な技術にしました（図・上段）。特に、「5'-NNACG-3'」という PAM 配列は、既存のゲノム編集ツールの PAM 配列とは異なり、「AaCas9」によって特異的にゲノム編集できる遺伝子が動植物を問わず存在します。また、産総研と TOPPAN、インプラントが行った植物（シロイヌナズナ）の細胞を用いた実験において、「AaCas9」が既存のゲノム編集ツールよりも高いゲノム編集活性を示す条件がありました。産総研と TOPPAN、インプラントは、「AaCas9」をゲノム編集の基盤的技術として、生命科学や医学だけでなく、農業や工業など広く事業に展開していきます。

なお、この技術の詳細は、特許 7353602 として公開されているほか、2023 年 12 月 7 日 16:00-18:15（日本時間）に開催される第 46 回分子生物学会年会のシンポジウム「“ポスト Cas9”ゲノム編集の新潮流」にて発表されます。

**下線部は【用語解説】参照**

## 開発の社会的背景

ゲノム編集は、生物の設計図であるゲノムの中の狙った DNA 配列のみ改変する技術であり、医療・農業・ものづくりなど、さまざま市場において、大きな恩恵をもたらしつつあります。特に、ガイド RNA とよばれる RNA を用いてゲノム中の位置を指定する「CRISPR-Cas9 システム」は、広く使われています。一般に Cas9 タンパク質は PAM 配列と呼ばれる塩基を認識し、その近傍を編集対象とします。既存の広く用いられているゲノム編集ツール「SpyCas9」の PAM 配列は、「5'-NGG-3'」です（図・下段）。この「5'-NGG-3'」という配列はゲノム中に多く存在するものの、編集したい領域に必ずあるとは限りません。そのため、「5'-NGG-3'」と別の配列を認識してゲノム編集する技術の開発が期待されています。「SpyCas9」を改変する試みは、PAM 配列の制約をなくすためには有効であり、すでに様々な報告がされています。一方で、それらの改変型 SpyCas9 では、相応の副作用（例えば、自分自身の gRNA 配列をコードする配列を切断してしまうなど）も報告されています。

このような課題に対し、産総研と TOPPAN、インプラントは、「SpyCas9」を改変するのではなく、別の生物の「Cas9」を同定することで、「5'-NGG-3'」以外の別の PAM 配列を用いて、ゲノム編集可能なツールの開発に取り組みました。

## 研究の経緯

産総研の生物プロセス研究部門では、主に細胞への分子導入の観点からゲノム編集技術の開発を積極的に実施しています。例えば、電気機械的穿孔という新原理に基づく分子導入装置（[2022 年 10 月 21 日 プレス発表](#)）、針状結晶を用いた植物ゲノム編集のための分子導入法であるウイスキー超音波 RNP 法（[2023 年 9 月 7 日 プレス発表](#)）などを開発してきました。一方、ゲノム編集には、細胞への分子の導入技術だけでなく、ゲノム DNA に結合して編集を実施するゲノム編集ツールそのものの開発も欠かせません。ゲノム編集ツール「SpyCas9」は、ヒト腸内細菌由来

で、世の中で最もよく使われています。産総研は独自の細菌叢コレクションを持っており、微生物ゲノムの分析には強みを有しています。そこで、特有の PAM 配列を認識するゲノム編集ツールをバクテリアから新しく同定することを目指しました。

## 研究の内容

産総研と TOPPAN、インプラントは、新しいゲノム編集ツールの開発を目指し、さまざまな微生物由来の「CRISPR-Cas9 システム」を調べました。産総研が所有するタンパク質合成および RNA の合成技術により、難培養性の微生物に由来する遺伝子も含め、複数種類の「CRISPR-Cas9」遺伝子座から推定される「Cas9 タンパク質」およびガイド RNA を作製し、それらの機能を調査しました。その際、TOPPAN 所有の DNA 情報分析技術を利用することで、「PAM 配列」を同定しました。PAM 配列は「Cas9 タンパク質」の種類によって異なることが知られています。複数の Cas9 の調査の結果、深海堆積物から単離された微生物 *Abyssicoccus albus* の「Cas9 (AalCas9)」が「5'-NNACG-3'」という特徴的な配列を PAM 配列として認識することを見いだしました(図・上段)。また、「AalCas9」のガイド RNA のターゲット DNA と相補的な配列の長さおよび ステムループ配列 を短くした場合に、DNA 切断の効率が向上することも発見しました。*in vitro* 実験およびモデル植物シロイヌナズナの プロトプラスト において、「AalCas9」の活性がオリジナルと比べて 2 倍程度まで上昇し、「SpyCas9」と同等のゲノム編集活性を示す条件を見出しました。さらに、インプラントの植物培養技術で、シロイヌナズナ・イネのゲノム編集株を取得できること、ならびに産総研の実験では、ヒト培養細胞でのゲノム編集効率は、特定の gRNA では 70%に達することが明らかになりました。この効率は、従来の「SpyCas9」を用いた場合と同程度となります。本研究で条件を最適化した「AalCas9」は、実際のゲノム編集実験での使用を満足する効率を備えているだけでなく、特徴的な配列「5'-NNACG-3'」を認識して編集する新しいゲノム編集ツールと言えます。

## 今後の予定

「AalCas9」は、「5'-NNACG-3'」という配列を認識する特徴を持つため、ゲノム編集ツールを拡張します。TOPPAN・産総研・インプラントは共同で、本ツールをゲノム編集の基盤的技術として、事業に展開させることを企図しています。医療・農業・ものづくりなど、ゲノム編集を基盤としたさまざまな産業の拡大・発展に貢献します。

## 特許情報

特許番号：特許第 7353602 号

発明の名称：ゲノム編集方法およびゲノム編集用組成物

発明者：寺川輝彦<sup>3</sup> 矢野翼<sup>3</sup> 光田展隆<sup>1</sup> 中村彰良<sup>1</sup> 菅野茂夫<sup>1</sup> 伊藤誠一郎<sup>2</sup> 牧野洋一<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 国立研究開発法人 産業技術総合研究所、<sup>2</sup> TOPPAN 株式会社、<sup>3</sup> 株式会社インプラントイノベーションズ

## 学会発表の予定

学会名：第 46 回分子生物学会年会シンポジウム「“ポスト Cas9”ゲノム編集の新潮流」

開催日時：2023年12月6日（水）から8日（金）

開催場所：神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）

備考：<https://www2.aeplan.co.jp/mbsj2023/>

発表日時：12月7日（木）16:00-18:15

発表のタイトル：「ユニークな PAM 配列を認識する Cas9 オートログ：AaI Cas9 によるゲノム編集」

発表者：中村彰良<sup>1</sup> 菅野茂夫<sup>1</sup> 長谷川玲花<sup>3</sup> 山本宏<sup>1</sup> 矢野翼<sup>3</sup> 牧野洋一<sup>2</sup> 寺川輝彦<sup>3</sup> 伊藤誠一郎<sup>2</sup> 光田展隆<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 国立研究開発法人 産業技術総合研究所、<sup>2</sup> TOPPAN 株式会社、<sup>3</sup> 株式会社インプラントイノベーションズ

## 用語解説

### PAM 配列

Cas9 タンパク質がガイド RNA によらずに必ず認識する DNA 配列。Protospacer Adjacent Motif を略して PAM と呼ばれる。

Cas9 の種類ごとに異なることが知られている。

### ガイド RNA

CRISPR-Cas9 システムにおいて、ターゲットとなるゲノムを指定する RNA。RNA の配列を変更することで、ゲノム上のさまざまな場所を指定して編集することが可能となる。

### CRISPR-Cas9（クリスパーキャスナイン）システム

細菌に存在する免疫システム CRISPR-Cas9 を活用したゲノム編集ツールの総称。ゲノム編集因子の中で最もよく用いられている。ゲノムを切断する Cas9 タンパク質と、切断箇所を指定するガイド RNA が複合体を形成して機能する。

### ステムループ配列

RNA 鎖の一部が自分自身と結合して、ループ状の構造を形成する部分

### プロトプラスト

細胞壁を取り除いた状態の植物細胞。植物細胞は固い構造である細胞壁をもつため、遺伝子などを導入しにくい。そのため、一過的な遺伝子導入実験ではプロトプラストを利用することがある。

### ゲノム編集因子

ゲノム DNA を改変するため、ゲノム編集に用いられる、実行因子。細胞内に導入して狙った領域を改変する。

## 本件に関する問い合わせ先

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

生物プロセス研究部門 植物機能制御研究グループ

主任研究員 中村 彰良

[akiyoshi.nakamura@aist.go.jp](mailto:akiyoshi.nakamura@aist.go.jp)

主任研究員 菅野 茂夫

[shigeo.sugano@aist.go.jp](mailto:shigeo.sugano@aist.go.jp)

〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6

029-861-2641

TOPPAN ホールディングス株式会社

〒112-8531 東京都文京区水道 1-3-3

広報部 [kouhou@toppan.co.jp](mailto:kouhou@toppan.co.jp)

株式会社インプラントイノベーションズ

代表取締役社長 寺川 輝彦

〒230-0052 神奈川県横浜市鶴見区生麦 4-5-11

045-500-0538 [terakawa@inplanta.jp](mailto:terakawa@inplanta.jp)

## 機関情報

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

<https://www.aist.go.jp/>

ブランディング・広報部 報道室 [hodo-ml@aist.go.jp](mailto:hodo-ml@aist.go.jp)

TOPPAN ホールディングス株式会社

<https://www.holdings.toppan.com/ja/>

広報部 [kouhou@toppan.co.jp](mailto:kouhou@toppan.co.jp)

株式会社インプラントイノベーションズ

<https://inplanta.jp/index.html>

管理部 [in3@inplanta.jp](mailto:in3@inplanta.jp)

## 配布先

経済産業記者会 | 経済産業省ベンクラブ | 中小企業庁ベンクラブ | 資源記者クラブ | 文部科学記者会 | 科学記者会 | 筑波研究学園都市記者会 | PR TIMES