



ニッポン・ジーン

国産ゲノム編集技術 CRISPR-Cas3 ゲノム編集関連製品

CRISPR-Cas3技術は、C4U株式会社の創業メンバーである東京大学医科学研究所 先進動物ゲノム研究分野の真下知士教授、大阪大学微生物病研究所の竹田潤二招へい教授らの研究成果を基に開発された日本発のゲノム編集技術です。当社はC4U株式会社とライセンス契約を締結し研究用途のCas3関連製品を提供しています。



本製品(Cas3 protein NLS および Cascade-crRNA複合体作製サービス)は、東京大学医科学研究所 先進動物ゲノム研究分野の真下知士教授、吉見 一人講師、理化学研究所放射光科学研究センター (生物系ビームライン基盤グループ) の竹下浩平先生の技術支援のもとに開発されました。

新しいゲノム編集技術『CRISPR-Cas3』について

CRISPR-Cas3技術は、東京大学医科学研究所 先進動物ゲノム研究分野の真下知士教授、大阪大学微生物病研究所の竹田潤二招へい教授らの研究成果を基に開発された日本発のゲノム編集技術です。

CRISPR-Cas3は、ガイドRNAにあたるcrRNAと5種類のタンパク質から構成されるCascade (カスケード) が複合体を形成し、標的DNA配列を認識して結合します。そこにCas3タンパク質が結合することでDNAを切断します。CRISPR-Cas3ではCas3タンパク質が標的配列の上流側を連続的に分解することで標的配列を大きく削ることができる性質を持ち、さらにcrRNAの相補配列が32塩基と長いため、従来のゲノム編集技術の課題であったオフターゲットへの影響も極めて低い特長があります。

■ CRISPR-Cas3 の特長

- ゲノムの大規模欠損が可能
- オフターゲット変異のリスクが低く、特異性が高い (安全性の高いゲノム編集技術)
- シンプルなライセンスのため、ゲノム編集技術の実用化にむけた戦略が立て易い

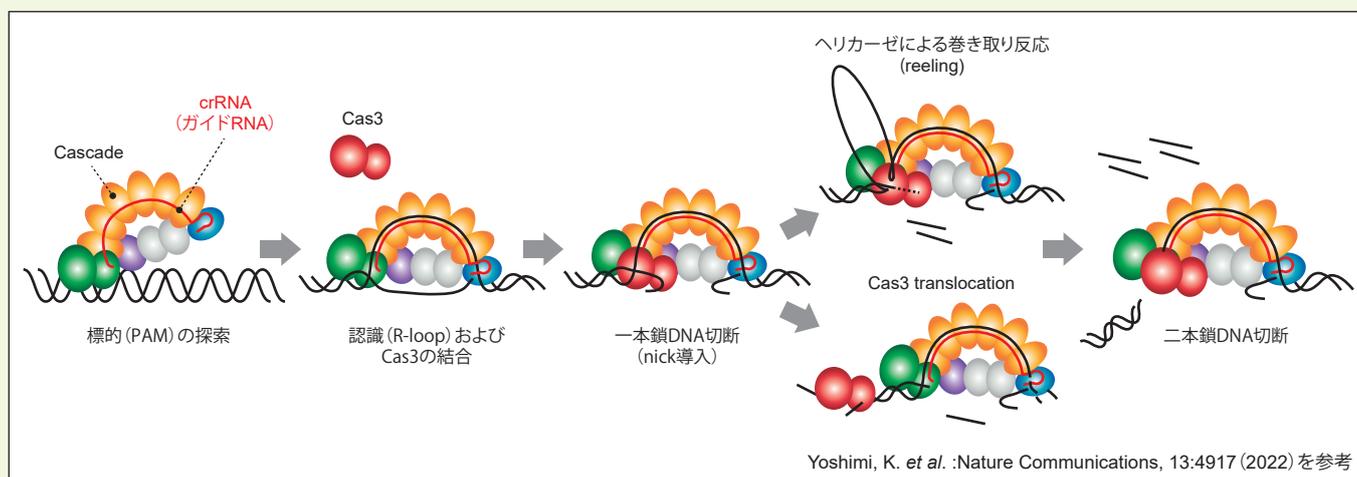


図1. CRISPR-Cas3による二本鎖DNAの切断

5種類のタンパク質から構成されるCascadeとcrRNAの複合体に、Cas3が結合することでDNAを切断。

表1. CRISPR-Cas3の特長 (CRISPR-Cas9との比較)

	CRISPR-Cas3	CRISPR-Cas9
構成要素	Cas3 protein, crRNA, Cascade構成protein	Cas9 protein, gRNA
PAM配列	AAG, (AGG, GAG, TAC, ATG, TAG)	NGG
相補配列の長さ	32塩基	約20塩基
切断機構	Cas3の持つヌクレアーゼドメインとヘリカーゼドメインにより一本鎖DNAの切断が繰り返され、結果的に二本鎖切断が導入される ¹⁾	Cas9の持つ2つのヌクレアーゼドメイン (RuvCとHNH) による二本鎖同時切断
大規模欠損 ²⁾	◎	△
オフターゲット ²⁾	◎	○
編集効率 ²⁾	◎	◎
特長	<ul style="list-style-type: none"> ● crRNAの相補配列が長いため高い特異性を期待できる ● 数百~数千塩基の大規模欠失変異が可能 	<ul style="list-style-type: none"> ● 実験系の構築が非常に簡単 ● 1~数塩基の挿入or欠失

参考文献 1) Yoshimi, K. et al. :Nature Communications, 13:4917 (2022)

2) Morisaka, H. et al. :Nature Communications, 10:5302 (2019)

CRISPR-Cas3システムを用いたゲノム編集

■ 細胞でのゲノム編集評価 (データ提供:C4U株式会社)

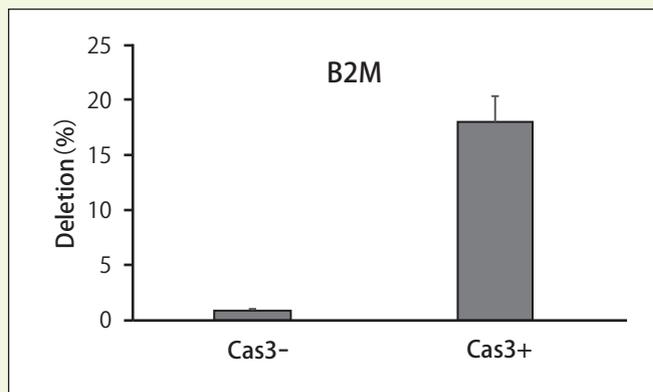
β 2-ミクログロブリンをコードするB2M遺伝子をターゲットとして実験を行った。エレクトロポレーション法でHEK293T細胞へCas3 protein NLS (Code No.311-09441) 及びCascade-crRNA複合体を導入し、培養3日後にFlow CytometryでB2M遺伝子のノックアウトをHLA-A抗体を使って確認した。また、B2M遺伝子がどの程度欠損が起きているか、クローニング及びシーケンス解析により確認した。

<実験方法>

- ① RNP各種を調製
- ↓
- ② 細胞懸濁液を用意 (0.3×10^6 cells / well)
- ↓
- ③ 4D-Nucleofector®でエレクトロポレーション(下記:実験条件)
- ↓
- ④ エレクトロポレーション後、3日目にFlow CytometryでB2M遺伝子の発現を測定
- ↓
- ⑤ KO率を計算

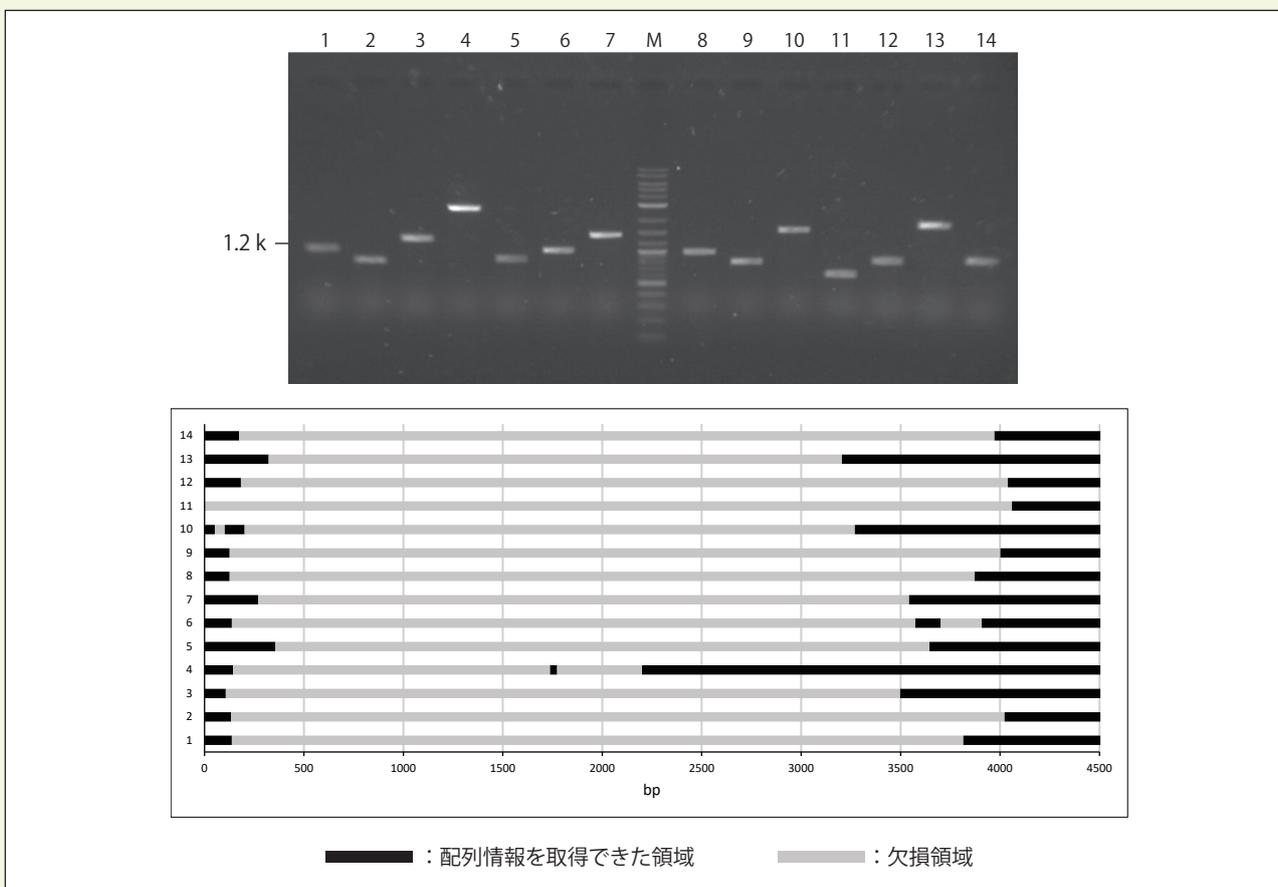
<実験条件>

- 【エレクトロポレーター】: 4D-Nucleofector® (Lonza社)
- 【 Pulse Code 】: DG150
- 【細胞】: Hek293T
- 【細胞数】: 0.3×10^6 cells / well
- 【RNP】: 100 pmol each / well
- 【プレート】: 6 well plate



Flow CytometryによるB2M遺伝子のノックアウト (KO) 率

Cas3 – Cascade-crRNA複合体を導入した試験区では平均して18.1%の細胞にB2M遺伝子が発現していないことを確認した。(n=3)

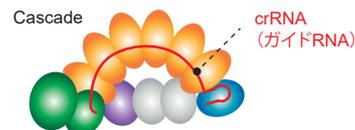


シーケンス解析による欠損領域の確認

B2M遺伝子がどの程度欠損が起きているか、TAクローニングおよびシーケンス解析により確認した。

CRISPR-Cas3システム

Cascade-crRNA複合体作製サービス



本サービスはCRISPR-Cas3ゲノム編集用のcrRNAの設計およびcrRNAとCasタンパク質の複合体(Cas complex for antiviral defence, Cascade-crRNA複合体)を作製するサービスです。Cascadeを構成する5種のタンパク質と1種のcrRNAを共発現し、精製したCascade-crRNA複合体を納品いたします。また、Cascadeを構成するタンパク質(Cas11, Cas7, Cas6)は、核移行シグナル(NLS)を有しています。

crRNA配列設計

お客様よりご提供いただく標的遺伝子周辺の配列情報をもとに、C4U株式会社にて1遺伝子につき1~3箇所のcrRNAの候補配列(32塩基)を設計いたします。

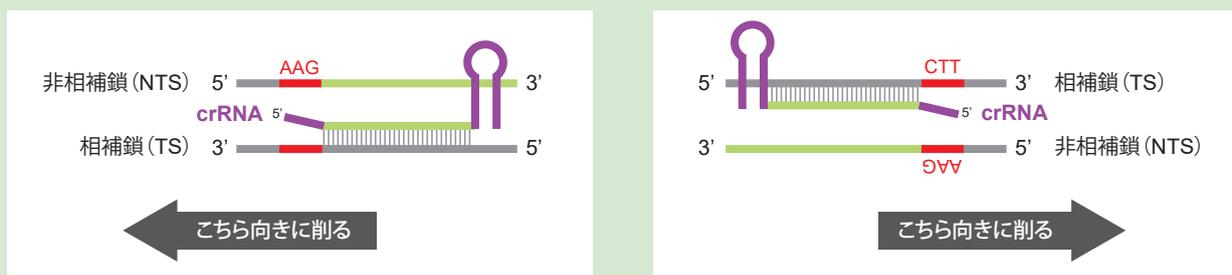


図2. 削りたい方向性 (PAMと切断の方向)

CRISPR-Cas3システムでは、設計したcrRNAの位置からPAM配列の方向にDNAを削ります。設計をご依頼いただく際に、標的DNAに対して削りたい方向性をご選択いただけます。

Cascade-crRNA複合体作製

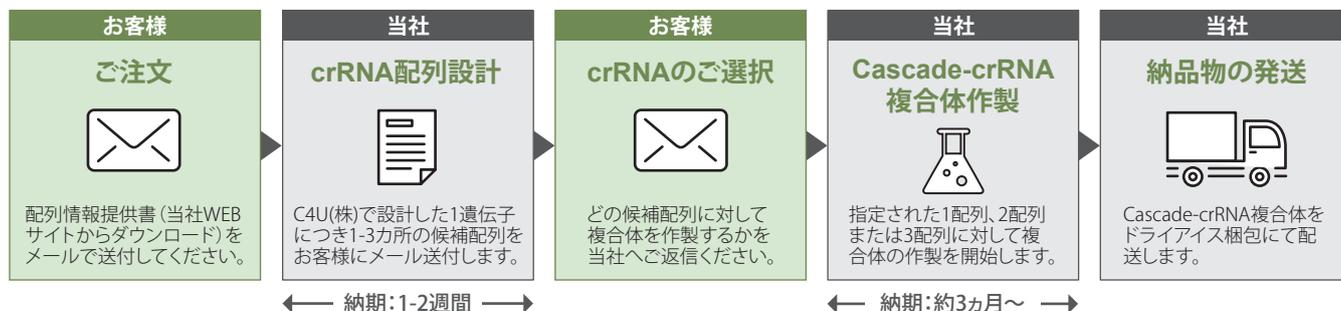
設計した候補配列から複合体を作製するためのcrRNA配列をお選びいただけます。お客様ご自身で設計されたcrRNA配列を使用することもできます。お客様がご選択した1~3配列に対して、Cascade-crRNA複合体を当社にて作製いたします。

起 源	遺伝子組換え大腸菌	保存温度	-80℃
濃 度	25 µg/µL Cascade-crRNA複合体	収量目安	10 µL×1本~出来高分*/1配列あたり
形 状	20mM HEPES-NaOH (pH7.0), 350 mM NaCl, 1 mM DTT		
納 品 物	Cascade-crRNA複合体、基質プラスミド**、検査報告書 (PDFをメール送付)		

* 製造した出来高分を出荷いたします。目安として1配列あたり6~15本程度を見込んでおりますが、保証はいたしかねます。

** 本サービスで作製したCascade-crRNA複合体は、PAMおよび標的配列を含むPlasmidの切断実験で活性を確認します。この *in vitro* 試験に使用したPlasmidを同梱します。

サービスの流れ



製品名	容量	希望納入価格(税別)	納期(目安)
Cascade-crRNA複合体作製サービス	1配列	照会	1-2週間(設計)+3ヵ月(複合体作製)
	2配列	照会	1-2週間(設計)+3.5ヵ月(複合体作製)
	3配列	照会	1-2週間(設計)+4ヵ月(複合体作製)

CRISPR-Cas3システム

Cas3 protein NLS

本品は、*Escherichia coli* 由来のCas3タンパク質です。Cas3遺伝子を有する組換えバキュロウイルスに感染した昆虫細胞を使用して発現・精製を行ったものです。核移行シグナル(NLS)をN末端とC末端に有しており、crRNAとCasタンパク質の複合体 (Cascade-crRNA複合体) と組み合わせることにより、CRISPR-Cas3ゲノム編集に利用することができます。

■ 特長

- 15 µg/µLの高濃度品
- 核移行シグナル(NLS)を付与
- Cascade-crRNA複合体と組み合わせることでゲノムの大規模欠損が可能

起 源	遺伝子組換えバキュロウイルス
濃 度	15 µg/µL
形 状	20mM HEPES-NaOH(pH7.0), 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 50% Glycerol
保存温度	-20℃

■ *in vitro*での基質DNAの切断確認

Cas3 protein NLS および Cascade-crRNA複合体を用いて、PAMと標的配列を含むPlasmid DNAの切断確認を行った。

<反応系>

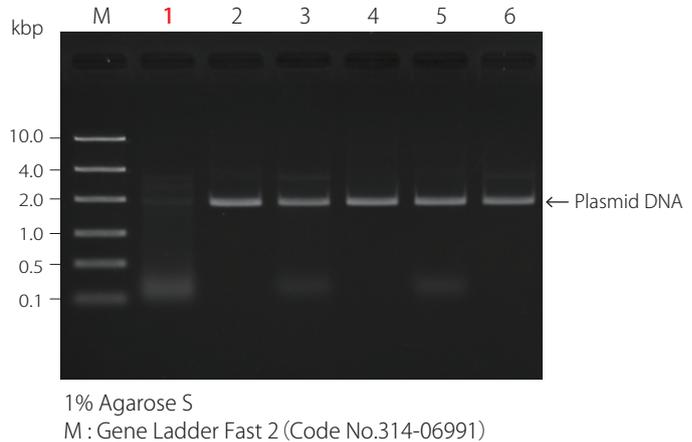
5 mM HEPES-KOH (pH7.5)
60 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 µM CoCl₂
2.5 mM ATP
0.24 µM Cas3 protein NLS (Code No.311-09441)
0.20 µM Cascade-crRNA複合体
100 ng Plasmid DNA

<反応条件>

37℃、5分間反応
↓
アガロースゲル電気泳動

[参考文献] Yoshimi, K. *et al.* : Nature Communications, 13:4917 (2022)

レーン	Cas3 protein	Cascade-crRNA	Plasmid DNA
1	+	+	+(標的配列)
2	-	-	+(標的配列)
3	+	+	+(非標的配列)
4	-	-	+(非標的配列)
5	-	+	+(標的配列)
6	+	-	+(標的配列)



1% Agarose S
M : Gene Ladder Fast 2 (Code No.314-06991)

<結果>

PAM および 標的配列を含むPlasmid DNA (レーン 1) において切断を確認した。一方、非標的配列を含むPlasmid DNA (レーン3) において切断は確認されなかった。

Code No.	製品名	容量	希望納入価格(税別)
311-09441	Cas3 protein NLS	150 µg	90,000円

- 本文に記載しております製品は試験研究用試薬です。医薬品の用途には使用しないでください。
- 表示価格に消費税は含まれておりません。

製造元 **株式会社ニッポンジーン**

〒930-0834 富山市問屋町二丁目7番18号
TEL: 076-451-6548 FAX: 076-451-6547
URL: <https://www.nippongene.com>

販売元 **富士フイルム 和光純薬株式会社**

本 社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 TEL: 06-6203-3741 (代表)
東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号 TEL: 03-3270-8571 (代表)
フリーダイヤル 0120-052-099 フリーファックス 0120-052-806