



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

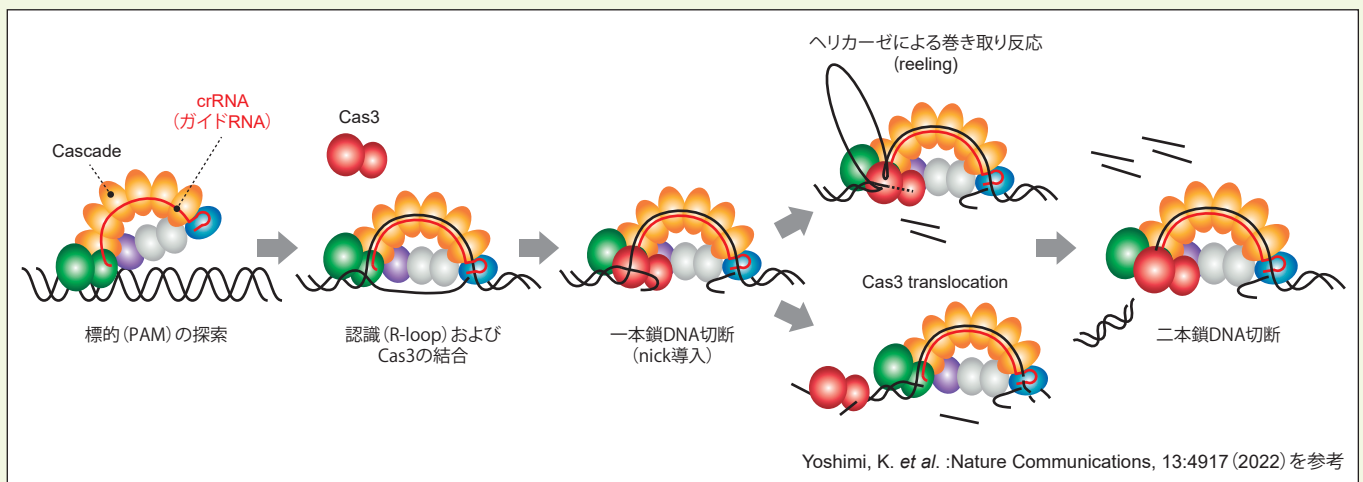


図1. CRISPR-Cas3による二本鎖DNAの切断

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)

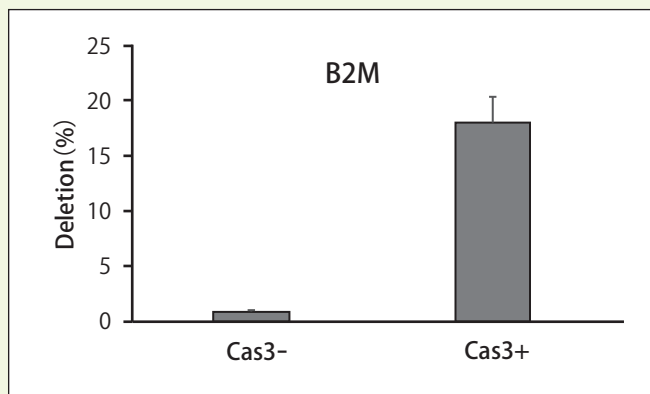
β 2-ミクログロブリンをコードするB2M遺伝子をターゲットとして実験を行った。エレクトロポレーション法でHEK293T細胞へCas3 protein NLS (Code No.311-09441) 及びCascade-crRNA複合体を導入し、培養3日後にFlow CytometryでB2M遺伝子のノックアウトをHLA-A抗体を使って確認した。また、B2M遺伝子がどの程度欠損が起きているか、クローニング及びシーケンス解析により確認した。

<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

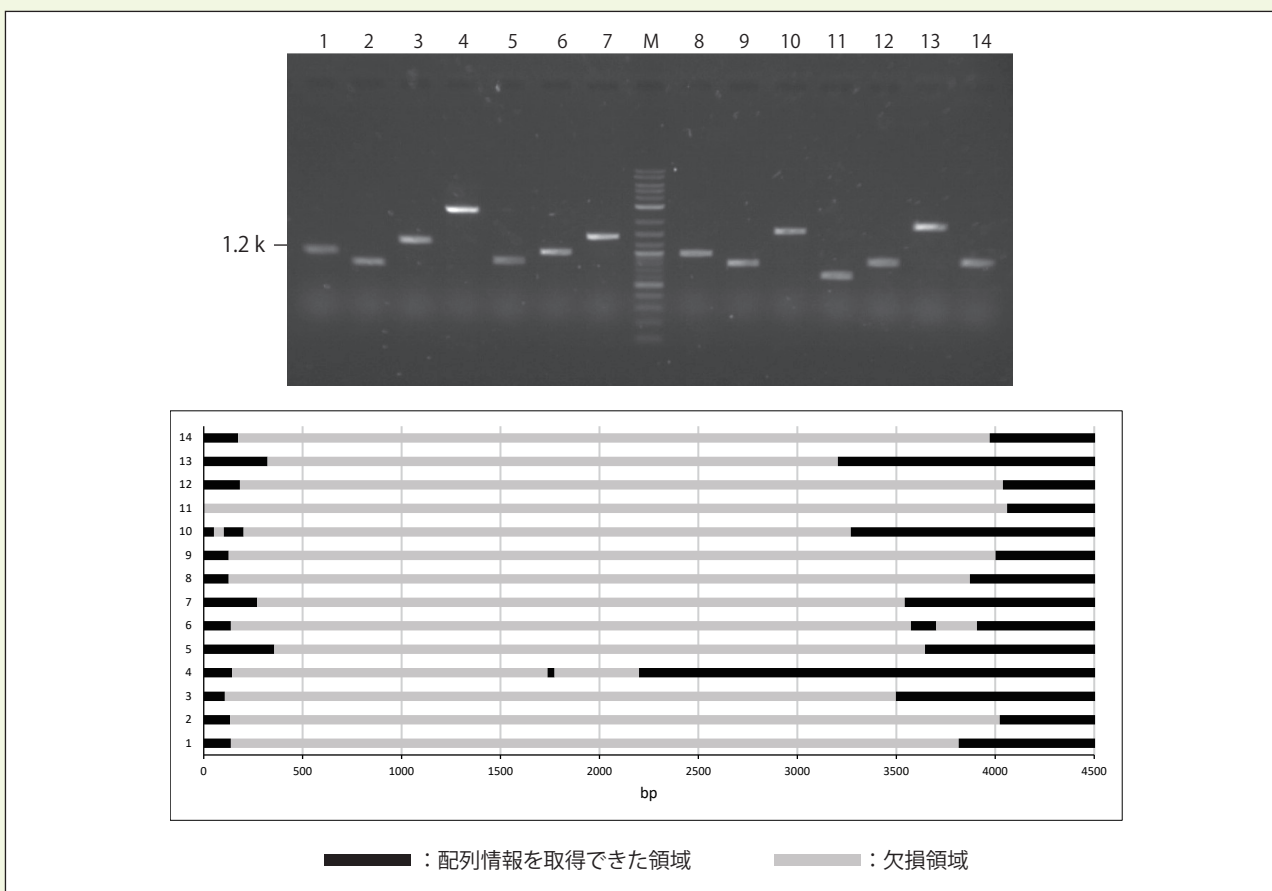
<実験条件>

- 【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)

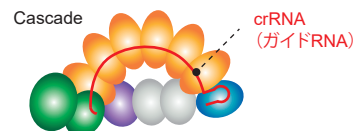


シーケンス解析による欠損領域の確認

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。

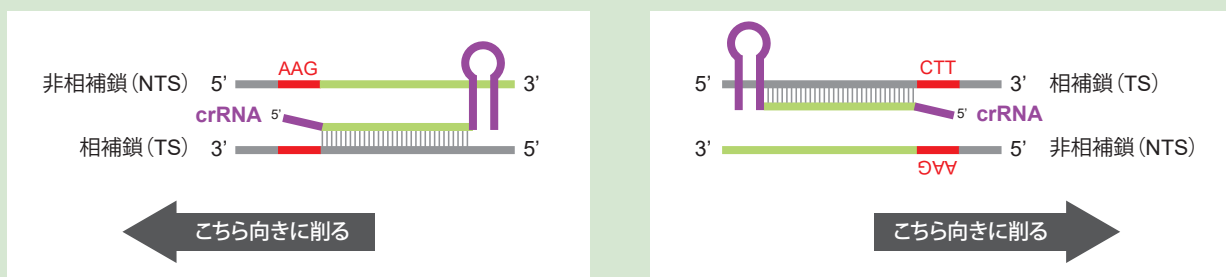


図2. 削りたい方向性 (PAMと切断の方向)

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

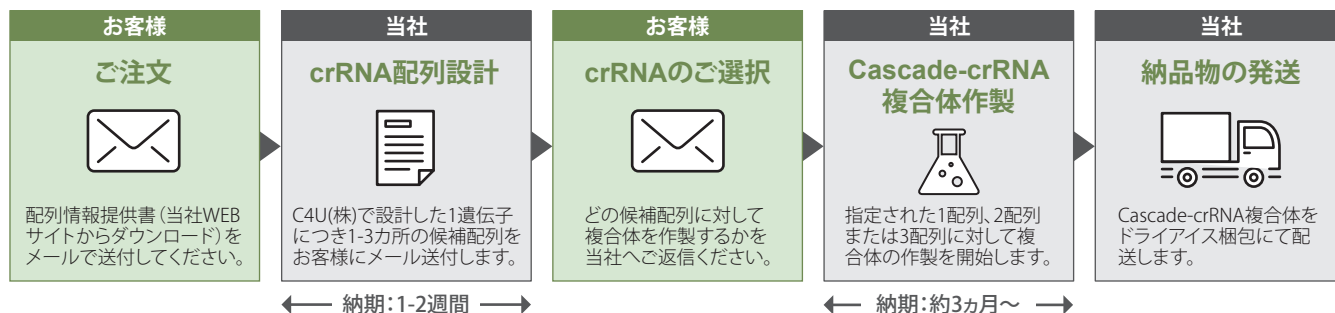
設計した候補配列から複合体を作製するためのcrRNA配列をお選びいただけます。お客様ご自身で設計されたcrRNA配列を使用することもできます。お客様がご選択した1~3配列に対して、Cascade-crRNA複合体を当社にて作製いたします。

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* / 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 Cascade-crRNA複合体作製サービス
配列情報提供書

- 保存した入力済みExcelファイル(.xlsx)をメール添付しニッポンジーン(info@nippongene.com)までお送りください。
- ご注文の際は、ニッポンジーンへ本提供書のご提出と、販売代理店へご注文手続きをお願いいたします。

1. お客様情報

ご依頼年月日	2023年9月29日
フリガナ	イノ ゲンタロウ
ご依頼者氏名	磯 源太郎
施設名	株式会社ニッポンジーン
部署名	研究試薬部
郵便番号	930-0834
ご依頼者施設所在地	富山市間屋町二丁目7番18号
ご依頼者施設TEL	076-451-6548
ご依頼者E-mail	〇〇〇〇@nippongene.com
販売店会社名・支店名	〇〇〇〇株式会社 本社
販売店所在 都道府県	富山県
販売店担当者名	立山 連峰
販売店TEL	〇〇〇-〇〇〇-〇〇〇〇
配達先	ご依頼者へ直送
コメント	

* 直送の場合、お届け先となります。番地、部屋番号までご記入ください。

* 直送の場合、送り状伝票に記載されます。

* 配列情報および検査報告書の報告先となります。

* 請求先となります。

* ブルダウンから選択してください。

* お届け先やご注文内容について補足がある場合はご記入ください。

2. 標的遺伝子情報

遺伝子名 ^{*1)}	B2M
由来生物種 ^{*1)}	Homo sapiens
Accession No. ^{*1)}	NC_00015.10 (44,711,5107..44,718,145)
候補領域 (5'→3')	<p>CCCCCGACAAATCAACAGAAAGAAATACCTAAACAGCAAGGACATGGGAACTCTTGGCACA GAACTTCCAACACTTTTTCTGAAGGGATACAAGAAGCAAGAAAGGTAAGCTCTTCTACTAGGACCTCTCTGA GCTGCTCCTCAGGATCTTTGGGACTATTTTCTTACCCAGAGAATGGAGAAACCTGCAGGGAATCCCAAAG CTGTAGTTATAACAAGAAGTCTCTCTCTGTAGGTAGCATTCAAAGATCTTAATCTCTGGGTTTCGGTTTTCTC GAATGAAAAATCAGAGTCCGAGCAGTAACTGCTGGTGGGGCCACCATTAGCAAGTCACTAGCATCTCTGGGGCC AGTCTGCAAAAGCGAGGGGCGAGCCTTAATGTGCTCCAGCCTGAAGTCCTAGAATGAGCCCGGTGTCCCA AGTGGGGGCGCACCAGATCGGAGGGGCGCGGATGTACAGACAGCAAACTCACCAGTCTAGTGCATGCGC</p> <p>150 bp程度空ける (この欄に入力しない)</p> <p>Exon (この欄に入力しない)</p>
削りたい方向性 ^{*2)}	候補領域から下流向き
ご注文数 ^{*3)}	3 配列分のCascade-crRNA複合体作製を依頼
コメント	

*この欄には候補領域のみ
をご入力ください。

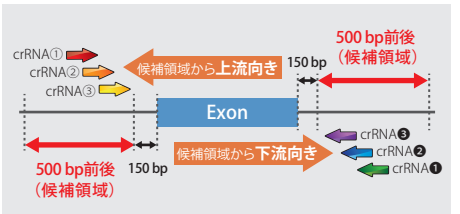
150 bp程度空ける (この欄に入力しない)

Exon (この欄に入力しない)

*1) ニッポンジーン 遺伝子組換え実験安全委員会への申請に必要な情報となります。

* crRNA配列を抽出するため、候補配列の情報をご入力ください。Cas3の特性としてPAMから約150 base先から欠損が開始されるため、標的の周辺配列から150 baseほど空けた500 base前後が望ましいです。基本的にExonを狙うようにターゲットを選択します。

*2) 500 base前後の候補領域と削りたい方向性(参考: 下図)をブルダウンから選択してください。



* ブルダウンから選択してください。

*3) 1遺伝子につき3箇所のcrRNA候補配列をご報告予定ですが、候補領域中に含まれるPAM配列数に依存します。設計の結果、候補配列の数が少ない場合や全く得られない場合がございます。その場合はあるものだけ提示します。ご注文数に対して、候補配列の数が少ない場合は、ご対応についてご相談させていただきます。

*4) 下記 [注意事項] 参照

* ブルダウンから選択してください。

3. 注意事項のご確認

注意事項 ^{*4)}	<ul style="list-style-type: none"> 本サービスは、成果保証型の受託作業ではありません。本サービスは、納品するCascade-crRNA複合体についてゲノム編集実験の成功を保証するものではありません。 標的遺伝子の配列によっては、crRNA配列をデザインできない場合があります。その際は手数料のみいただく場合がございます。本サービスについて途中で作業中止となった場合は、実施した作業工程までの費用を申し受ける場合がございます。 注意事項につきまして、詳細はリンク先の弊社Webサイトより事前にご確認ください。
ご確認 (必須)	✓ 上記について確認し、理解したうえで提供書を提出します。

[注意事項] ※2023.9.29版

<カスケード複合体の設計・作製について>

- 本サービスは、専門のスタッフが最善を尽くして設計・作製を行います。ゲノム編集実験の成功を保証するものではありません。
- 標的配列にリピート配列が含まれる場合など、標的部やその配列によっては複合体の切断活性が著しく低くなったり、作製効率に大きく影響が出る可能性があります。

<サービスについて>

- 本サービスは研究目的のみ利用することができます。それ以外の目的で利用することはできません。
- 納品物のカスケード複合体は、ご注文されたお客様もしくは共同研究先(特定の第三者)が使用できます。
- 実施の際は、当社 組換えDNA安全委員会の審査が必要となります。本サービス提供書に必要事項を漏れなく記入して下さい。
- 提供書の内容や記入漏れにより、組換えDNA安全委員会の承認を得られない場合は、サービスが行えませんのでご了承下さい。
- ご依頼数が多い場合、あるいはご依頼が集中している場合は、通常の納期では終了しない場合もありますのでご了承下さい。
- お客様からお預かりした遺伝子情報や設計結果は、契約書の有無に関わらず秘密保持に万全を期し、お客様の同意があった場合、また法律等によって要求された場合を除き、弊社およびC4U株式会社以外の第三者に対して情報を提供することは一切ありません。
- お客様の個人情報は、弊社、C4U株式会社、富士フィルム和光純薬株式会社ならびに販売代理店からの事務連絡等に使用させていただく場合があります。

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>

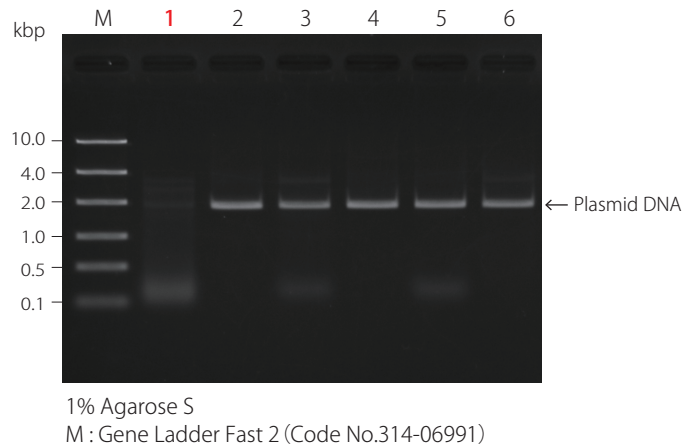
5 mM HEPES-KOH (pH7.5)
60 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 µM CoCl₂
2.5 mM ATP
0.24 µM Cas3 protein NLS (Code No.311-09441)
0.20 µM Cascade-crRNA複合体
100 ng Plasmid DNA

<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