

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) ステルス型 RNA ベクターを利用した All-in-One 型ゲノム編集ツールの  
開発  
(英語) Development of All-in-One type genome editing tool based on Stealth  
RNA Vector

研究開発担当者 (日本語) 創薬基盤研究部門 ヒト細胞医工学研究ラボ長 中西 真人  
所属 役職 氏名： (英語) Mahito Nakanishi, Ph.D.  
Laboratory for Research Laboratory for Human Cell Engineering  
Biotechnology Research Institute for Drug Discovery

分担研究 (日本語) All-in-One 型ゲノム編集ベクターの設計と作製・機能解析  
開発課題名： (英語) Design, construction and function analysis of All-in-one type  
genome editing vector

研究開発分担者 (日本語) 創薬基盤研究部門 ヒト細胞医工学研究ラボ長 中西 真人  
所属 役職 氏名： (英語) Mahito Nakanishi, Ph.D.  
Laboratory for Research Laboratory for Human Cell Engineering  
Biotechnology Research Institute for Drug Discovery

分担研究 (日本語) gRNA 構造の設計と遺伝子破壊の確認  
開発課題名： (英語) Design of gRNA and analysis of gene dysfunction

研究開発分担者 (日本語) 創薬基盤研究部門 主任研究員 佐野将之  
所属 役職 氏名： (英語) Masayuki Sano Senior Researcher  
Biotechnology Research Institute for Drug Discovery

実施期間： 平成28年11月28日 ～ 平成29年3月31日

## II. 成果の概要（総括研究報告）

Cas9 Nuclease を使ったゲノム編集においては、この酵素を高いレベルで発現すると、非特異的なゲノム DNA の切断が起こる。また、Cas9 Nuclease が細胞内で発現し続けても、同様に非特異的なゲノム DNA の切断が起こる。これらのことから、Cas9 Nuclease をゲノム編集に必要な十分なレベルで低発現させると共に、ゲノム切断が進行した段階で効果的に除去できるような遺伝子発現系が必要である。All-in-one 型ベクターとは、ゲノム編集に必要なすべての要素を搭載し、非特異的なゲノム DNA の切断が起こらない程度の低レベルで発現すると共に、ゲノム編集終了後に完全に除去可能な遺伝子発現系である。本年度は、All-in-one 型ベクターの素材として、発現レベルが 100 倍以上異なる 10 種類のステルス型 RNA ベクター (SRV) の作製を行った。さらに、このベクターを、siRNA を使って除去する系も確立した。次に、作製非特異的なゲノム切断の活性が低いことが報告されている Cas9 Nuclease 変異体コードする遺伝子を合成し、このベクターへの搭載を進めた。また、新規に設計した EGFP 遺伝子破壊用 gRNA を使って、EGFP の発現を 50%以下に低下できることを確認した。

In Cas9-mediated genome editing, excess expression of Cas9 leads to undesired non-specific break of host genome DNA. Prolonged expression of Cas9 also leads to undesired non-specific break of host genome DNA. In order to avoid these side effects, Cas9 enzyme should be expressed at minimum level for minimum period sufficient for genome editing. In this project, we plan to develop "all-in-one type genome editing tool", installing all the components for genome editing on a single vector and expressing these components at minimum level for minimum period sufficient for genome editing. In order to realize "all-in-one type genome editing tool", we developed "Stealth RNA Vector (SRV)" using synthetic RNA. SRV can express exogenous genes and RNA in the cytoplasm stably at various level. Furthermore, SRV can be eliminated from the cells using siRNA. This year, we constructed ten SRVs with different expression level, and installed improved Cas9 variant. Using newly designed guide RNA, we can reduce the expression of model gene (EGFP) under 50%.

## III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

1. Ken Nishimura, Shiho Aizawa, Fransiska Liliani Nugroho, Emi Shiomitsu, Tran Thi Hai Yen, Bui Phuong Linh, Borisova Dmitrievna Evgeniia, Yuta Sakuragi, Hitomi Takada, Akira Kurisaki, Yohei Hayashi, Aya Fukuda, Mahito Nakanishi, Koji Hisatake (2016). *Stem Cell Reports*, 8, 787-801. A role for KLF4 in promoting the metabolic shift via CL1 during induced pluripotent stem cell generation.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ステルス型 RNA ベクターの開発と応用、口頭、中西真人、第 6 回ナノカーボンバイオシンポジウム、2017 年 2 月 28 日、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし