



本件は、平成 26 年 11 月 20 日（日本時間 11 月 21 日午前 6 時）に、英科学誌 **Bioinformatics** オンライン版に掲載されました。情報公開済のため本資料配布と同時に解禁とします。

平成 26 年 11 月 21 日

大学共同利用機関法人情報・システム研究機構
ライフサイエンス統合データベースセンター

【報道発表資料】

東京大学大学院理学系研究科

ゲノム編集のためのガイド RNA 設計ソフトウェア CRISPRdirect を公開

- ▶ ゲノム編集（注1）において有力な手法として注目されている CRISPR/Cas9 システム（注2）に用いるガイド RNA（注3）を設計するソフトウェアとして「CRISPRdirect」を開発した。
- ▶ CRISPRdirect を用いることにより、目的以外の部位で誤ってゲノム編集の起こる「オフターゲット効果」の少ないガイド RNA を効率よく設計できるようになった。
- ▶ 優れたガイド RNA の設計がきわめて容易になることから、ゲノム編集のための強力なツールとして生命科学および医学研究への幅広い貢献が期待される。

発表概要

ゲノム編集（注1）は、生命の設計図であるゲノム DNA の任意の部位を切断することにより、その位置の配列を削除したり、あるいは逆に、任意の配列を挿入したりする手法であり、遺伝子の機能を解析するのに有効な手法としてさまざまな場面で利用され、医療分野への応用も期待されています。近年、新しいゲノム編集の手法として急速に普及している CRISPR/Cas9 システム（注2）は、ゲノム編集を行う部位を見つける役割を担うガイド RNA（注3）と、その部位を切断するはさみの役割をもつ Cas9 ヌクレアーゼとを組み合わせることによりゲノム編集を行います。この方法は、ガイド RNA の塩基配列を変えることによりゲノム編集を行う部位を自在に決めることができるという特徴があります。

ところが、ガイド RNA の塩基配列によっては、ゲノム編集を行いたい部位以外の位置で意図せずゲノム編集が起ってしまうことが知られています。この現象はオフターゲット効果とよばれ、ゲノム編集を行ううえで大きな課題となっています。オフターゲット効果を防ぎ、目的とする部位だけでゲノム編集を行うためには、ガイド RNA の設計が重要な鍵となります。

このたび、情報・システム研究機構 ライフサイエンス統合データベースセンター（DBCLS）の内藤雄樹特任助教、坊農秀雅特任准教授、東京大学大学院理学系研究科の日野小洋助教、程久美子准教授の研究グループは、CRISPR/Cas9 システムのために最適なガイド RNA を効率よく設計することのできるソフトウェア「CRISPRdirect」（<http://crispr.dbcls.jp/>）を開発しました。このソフトウェアにより、オフターゲット効果の少ない優れたガイド RNA をきわめて容易に設計することが可能となり、ゲノム編集のための強力なツールとして生命科学および医学研究に幅広く貢献することが期待されます。

発表内容

1. 研究の背景

生命の設計図であるゲノム DNA の任意の部位に配列の削除や挿入を起こすゲノム編集は、遺伝子の機能を解明するうえで強力な技術であり、これまでも Zinc finger nuclease や TALEN とよばれる人工のヌクレアーゼ (DNA 切断酵素) が用いられてきました。最近では、原核生物のもつ獲得免疫機構である CRISPR/Cas9 システムを利用した新しいゲノム編集の手法が開発され、急速に普及しています。この手法では、ガイド RNA がその塩基配列と相補的なゲノム DNA の部位を認識し、ヌクレアーゼである Cas9 がガイド RNA と共同してこの部位を切断します。このため、ガイド RNA の塩基配列を変えるだけで、ゲノム DNA の任意の部位を切断することができるという特徴があります。その結果、従来の手法と比較して簡便に任意の部位におけるゲノム編集を行うことが可能になりました。

ところが、ここで用いられるガイド RNA が認識するゲノム DNA の長さは約 20 塩基と短いため、標的とする部位以外のゲノム DNA を誤って認識してしまう場合のあることが明らかになってきました。この現象はオフターゲット効果とよばれ、ゲノム編集を行ううえで大きな課題となっています。オフターゲット効果を防ぎ、ゲノム DNA において目的とする部位だけでゲノム編集を行うためには、標的とする部位に対する特異性の高いガイド RNA を設計することが重要であると考えられます。

2. 研究の成果

情報・システム研究機構 ライフサイエンス統合データベースセンター (DBCLS) の内藤雄樹特任助教、坊農秀雅特任准教授、東京大学大学院理学系研究科の日野公洋助教、程久美子准教授の研究グループは、オフターゲット効果に関する最新の知見を反映し、最適なガイド RNA を効率よく設計することのできるソフトウェア「CRISPRdirect」 (<http://crispr.dbcls.jp/>) を開発しました (図 1)。

トップページ

CRISPRdirect - Rational design of CRISPR/Cas target.

Enter an accession number (e.g. NM_006299) or genome location (e.g. hg19:chr7:900000-901000):

or Paste a nucleotide sequence:

>sample sequence
atgcccgcgctgctgcccgcagaggaagcagcttcgagacgaggaag
ctgagccgagagtgagatgaagtcacagagcttcagagacgagcc
cagagcagctccagagcctcgcgcgagccgctcgaagatcgtc
ggaaacactctgtctctccagctttttccgagcagctggcagagga
cctagcagagatgtgctgacctagagagagagcagcagcagctat
atgattctgaatgagagctggttctcggagagcgggtggtgctc
ggtatgagctgctgagagttgagagagcagccagcagagagatg
cagcctttgagagagctcggagagagcagcagcagcagcagcagc
cagagagagagagcagagagagcagcagcagcagcagcagcagc
ggatgagcctcaactctgtaa

or upload sequence file: Choose File no file selected

PAM sequence requirement: NGG (e.g. NGG, NRG)

Specificity check: Human genome, GRCh37/hg19 (Feb, 2009)

design

設計結果

show highly specific target only

Show 20 entries

position	target sequence	sequence information	number of target sites
start - end	20mer+PAM (total 23mer)	GC% of 20mer Tm of 20mer TTTT in 20mer	20mer+PAM 12mer+PAM 8mer+PAM
4 - 26	ccgacgctgctgcccagccagag	75.00 % 82.34 °C -	1 (detail) 3 (detail) 103 (detail)
16 - 38	cccagccagagagcaagttcga	50.00 % 71.17 °C -	1 (detail) 26 (detail) 4354 (detail)
17 - 39	cccagccagagagcaagttcga	50.00 % 71.53 °C -	1 (detail) 32 (detail) 5910 (detail)
21 - 43	cccagagagcaagttcagagacg	50.00 % 69.25 °C -	1 (detail) 24 (detail) 8744 (detail)
24 - 46	gagagcaagttcagagacgag	50.00 % 69.25 °C -	1 (detail) 2 (detail) 306 (detail)
35 - 57	tcagagcagagagttttttcag	40.00 % 66.48 °C +	1 (detail) 25 (detail) 9901 (detail)
66 - 88	-	-	0 (detail) 3 (detail) 1097 (detail)
69 - 91	-	-	0 (detail) 26 (detail) 3790 (detail)
70 - 92	-	-	0 (detail) 3 (detail) 3604 (detail)
77 - 99	-	-	1 (detail) 6 (detail) 1306 (detail)
78 - 100	-	-	1 (detail) 9 (detail) 6616 (detail)
83 - 105	-	-	1 (detail) 63 (detail) 6397 (detail)
93 - 115	-	-	1 (detail) 7 (detail) 2568 (detail)
102 - 124	ccagcccccagagagcagcaga	80.00 % 86.67 °C -	1 (detail) 1244 (detail)
102 - 124	cccagcccccagagagcagcaga	75.00 % 84.31 °C -	1 (detail) 19 (detail) 3777 (detail)
106 - 128	cccagagagagcagcagcagcag	70.00 % 80.55 °C -	1 (detail) 1098 (detail)
107 - 129	cccagagagagcagcagcagcag	70.00 % 82.51 °C -	1 (detail) 2 (detail) 1116 (detail)
108 - 130	cccagagagagcagcagcagcag	70.00 % 82.52 °C -	1 (detail) 1011 (detail)
120 - 142	cccagagcagcctcagagcagcct	65.00 % 80.61 °C -	1 (detail) 6 (detail) 1510 (detail)
130 - 152	tcagagcagcctcagagcagcag	65.00 % 80.58 °C -	1 (detail) 4 (detail) 289 (detail)

Showing 1 to 20 of 77 entries

First Previous 1 2 3 4 Next Last

遺伝子のIDや塩基配列を入力

特異性の高いガイドRNAの候補

図 1 ゲノム編集のためのガイド RNA 設計ソフトウェア「CRISPRdirect」

特異性の高いガイド RNA を設計するためには、ゲノム全体の塩基配列を探索し、ゲノムのほかの領域とは塩基配列が一致せず、標的とする部位とだけ塩基配列が完全に一致するようなゲノム DNA の領域を見つける必要があります。この領域に対しガイド RNA を設計します。さらに、ガイド RNA とゲノム DNA とのあいだに不一致や挿入・欠失があってもオフターゲット効果の起こることが実験的に報告されていることから、CRISPRdirect では、そのような塩基配列を精度よく探索し、オフターゲット効果のリスクを評価します。

また、CRISPRdirect は直感的で優れたユーザーインターフェースを備えており、簡単な操作によりガイド RNA を設計することが可能です。特異性の高いガイド RNA の候補が緑色にハイライトされるほか、候補となるそれぞれのガイド RNA によりオフターゲット効果の起こる可能性のあるゲノムの部位を表示します。

3. 社会的意義・今後の予定

本研究の成果により、標的となる部位に対する特異性が高くオフターゲット効果の少ない優れたガイド RNA の設計がきわめて容易になることから、ゲノム編集のための強力なツールとしてライフサイエンス研究に幅広く貢献することが期待されます。現時点で、CRISPRdirect は代表的なモデル生物を含む 16 種の生物種（ヒト、マウス、ラット、マーモセット、ブタ、ニワトリ、ツメガエル、ゼブラフィッシュ、ホヤ、シヨウジョウバエ、カイコ、線虫、シロイヌナズナ、イネ、ソルガム、出芽酵母）に対応しており、生命科学系および医学系の多彩な分野の研究者の利用が見込まれます。対応する生物種は今後も追加していく予定です。CRISPRdirect はウェブブラウザ上で利用でき、すべての機能は無償で自由に利用できます。

本研究は、科学技術振興機構バイオサイエンスデータベースセンター、科学研究費助成事業、革新的細胞解析研究プログラム（セルイノベーション）などの支援を受けて行われました。

掲載論文

Yuki Naito*, Kimihiro Hino*, Hidemasa Bono and Kumiko Ui-Tei.

(内藤 雄樹*, 日野 公洋*, 坊農 秀雅, 程 久美子. *は共同筆頭著者)

CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites.

Bioinformatics (平成 26 年 11 月 20 日付 オンライン版公開)

doi: 10.1093/bioinformatics/btu743

用語解説

注 1 ゲノム編集

生命の設計図であるゲノム DNA の任意の部位に切断を引き起こし、その切断部位の修復機構を利用して配列の挿入や欠失を引き起こすゲノム DNA の改変手法。この手法には標的とするゲノム DNA の領域を認識して切断するヌクレアーゼ（DNA 切断酵素）が必要であり、Zinc finger nuclease や TALEN などの人工ヌクレアーゼが用いられてきた。最近、CRISPR/Cas9 システムという、設計が簡単な新しい人工ヌクレアーゼが登場し、これを用いたゲノム編集が大きな注目を集めている。

注2 CRISPR/Cas9 システム

原核生物に由来する獲得免疫機構で、細胞内に侵入してきた核酸（ファージ DNA やプラスミドなど）を切断および分解する。この機構において中心的な役割を果たすヌクレアーゼが Cas9 である。Cas9 は単独では DNA 切断活性を示さず、細胞内で合成されるガイド RNA と相互作用することにより、細胞外から侵入してきた核酸を認識し切断できるようになると考えられている。そのため、このガイド RNA を人工的に改変するだけで、任意の配列を認識し切断する人工ヌクレアーゼを設計することが可能である。

注3 ガイド RNA

原核生物のゲノムから転写・合成される RNA 分子で、CRISPR/Cas9 システムにおいて、その塩基配列と相補的なゲノム DNA の部位を認識する役割をもつ。ガイド RNA を人工的に設計することにより、Cas9 を任意の部位を認識し切断することが可能な人工ヌクレアーゼとして機能させることが可能になる。

発表者

内藤 雄樹（ライフサイエンス統合データベースセンター 特任助教）
日野 公洋（東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 助教）
坊農 秀雅（ライフサイエンス統合データベースセンター 特任准教授）
程 久美子（東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 准教授）

問い合わせ先

研究内容について

大学共同利用機関法人情報・システム研究機構
ライフサイエンス統合データベースセンター 特任助教 内藤 雄樹
電話：04-7135-5508 FAX：04-7135-5534 E-mail：y-naito@dbcls.rois.ac.jp

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 准教授 程 久美子
電話：03-5841-3044 FAX：03-5841-3044 E-mail：ktei@bs.s.u-tokyo.ac.jp

報道について

大学共同利用機関法人情報・システム研究機構
リサーチ・アドミニストレーター（広報） 池谷 瑠絵
電話：03-6402-6226 FAX：03-3431-3070 E-mail：ikeya@rois.ac.jp

東京大学大学院理学系研究科・理学部
特任専門職員 武田 加奈子，広報室副室長（准教授） 横山 広美
電話：03-5841-8856 E-mail：kouhou@adm.s.u-tokyo.ac.jp