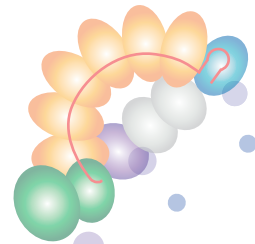




## 国産ゲノム編集技術

# CRISPR-Cas3 ゲノム編集関連製品 (第2版)

1. CRISPR-Cas3 について
2. CRISPR-Cas3 システムを用いたゲノム編集
3. CRISPR-Cas3 ゲノム編集関連製品
  - Cascade-crRNA複合体作製サービス
  - Cascade-crRNA complex, hB2M
  - Cas3 protein NLS
4. ゲノム編集関連製品 (CRISPR/Cas9)



# 1. CRISPR-Cas3 について

## 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」(クリスパーRNA)と5種類のCas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。

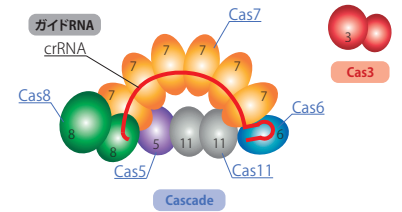


図1. CRISPR-Cas3 機能因子群

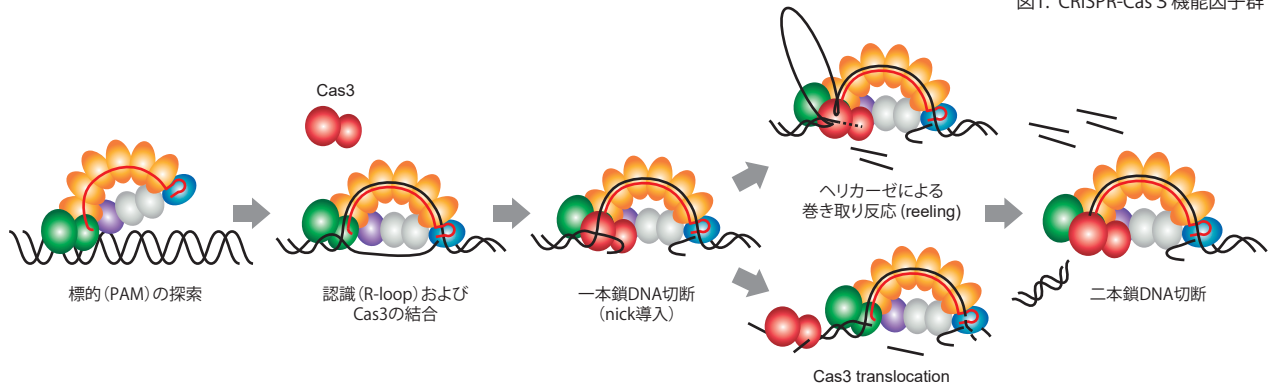


図2. CRISPR-Cas3による二本鎖DNAの切断<sup>1)</sup>

## CRISPR-Cas3 の特長

### ● ゲノムの大規模欠損が可能

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、数百～数千塩基の大規模欠失変異が可能。

### ● 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)

crRNAの相補配列が32塩基と長いいため、オフターゲットへの影響が極めて低い。

### ● シンプルなライセンス

ゲノム編集技術の実用化にむけた戦略が立て易い

表1. CRISPR-Cas3 と CRISPR/Cas9 の比較

	CRISPR-Cas3	CRISPR/Cas9
分類	クラス1* (タイプI)	クラス2** (タイプII)
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
オフターゲット変異 <sup>2)</sup>	極めて低い	低い
大規模欠損 <sup>2)</sup>	◎	△
編集効率 <sup>2)</sup>	◎	◎
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 <sup>1)</sup>	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
特長	<ul style="list-style-type: none"><li>● crRNAの相補配列が長いいため高い特異性を期待できる</li><li>● 数百～数千塩基の大規模欠失変異が可能</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>● 実験系の構築が非常に簡単</li><li>● 1～数塩基の挿入or欠失が可能</li></ul>

■ 参考文献 1) Yoshimi, K. et al. :Nature Communications, 13:4917 (2022)  
2) Morisaka, H. et al. :Nature Communications, 10:5302 (2019)

\* クラス1：複数のタンパク質で標的配列を切断  
\*\* クラス2：単一のタンパク質で標的配列を切断

## 2. 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)

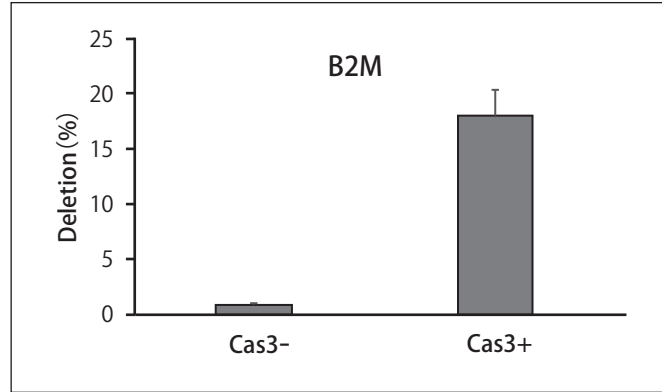
$\beta$ 2-ミクログロブリンをコードするB2M遺伝子をターゲットとして実験を行った。エレクトロポレーション法でHEK293T細胞へCas3 protein NLS (Code No.311-09441)及びCascade-crRNA complex, hB2M (Code No.312-09471)を導入し、培養3日後にFlow CytometryでB2M遺伝子のノックアウトをHLA-A抗体を使って確認した。また、B2M遺伝子がどの程度欠損が起きているかをクローニング及びシーケンス解析により確認した。

#### <実験方法>

- ① RNP (Cas3 – Cascade-crRNA複合体) 各種を調製
- ↓
- ② 細胞懸濁液を用意 ( $0.3 \times 10^6$  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

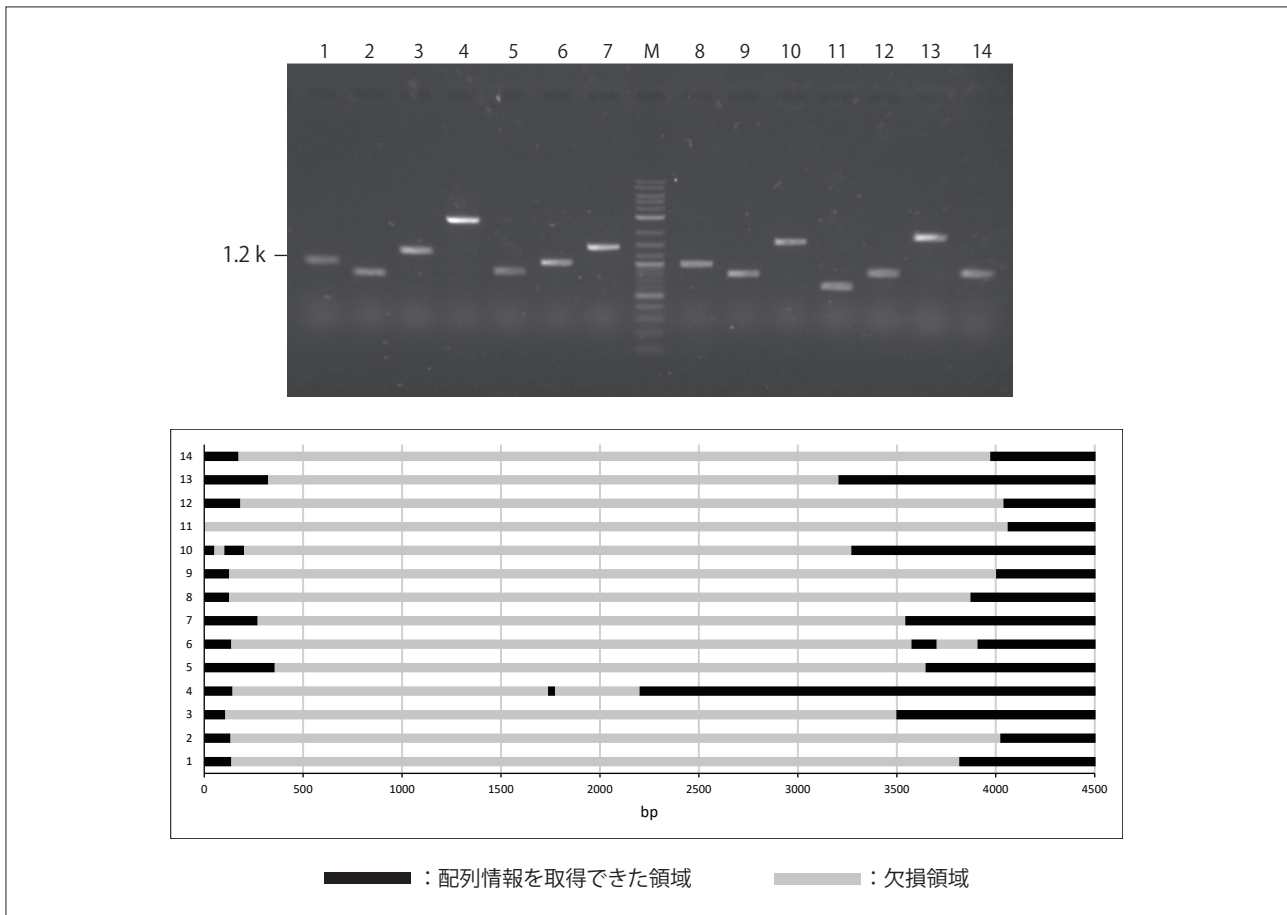
#### <実験条件>

- 【エレクトロポレーター】 4D-Nucleofector® (Lonza社)
- 【Pulse Code】 DG150
- 【細胞】 HEK293T細胞
- 【細胞数】  $0.3 \times 10^6$  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。

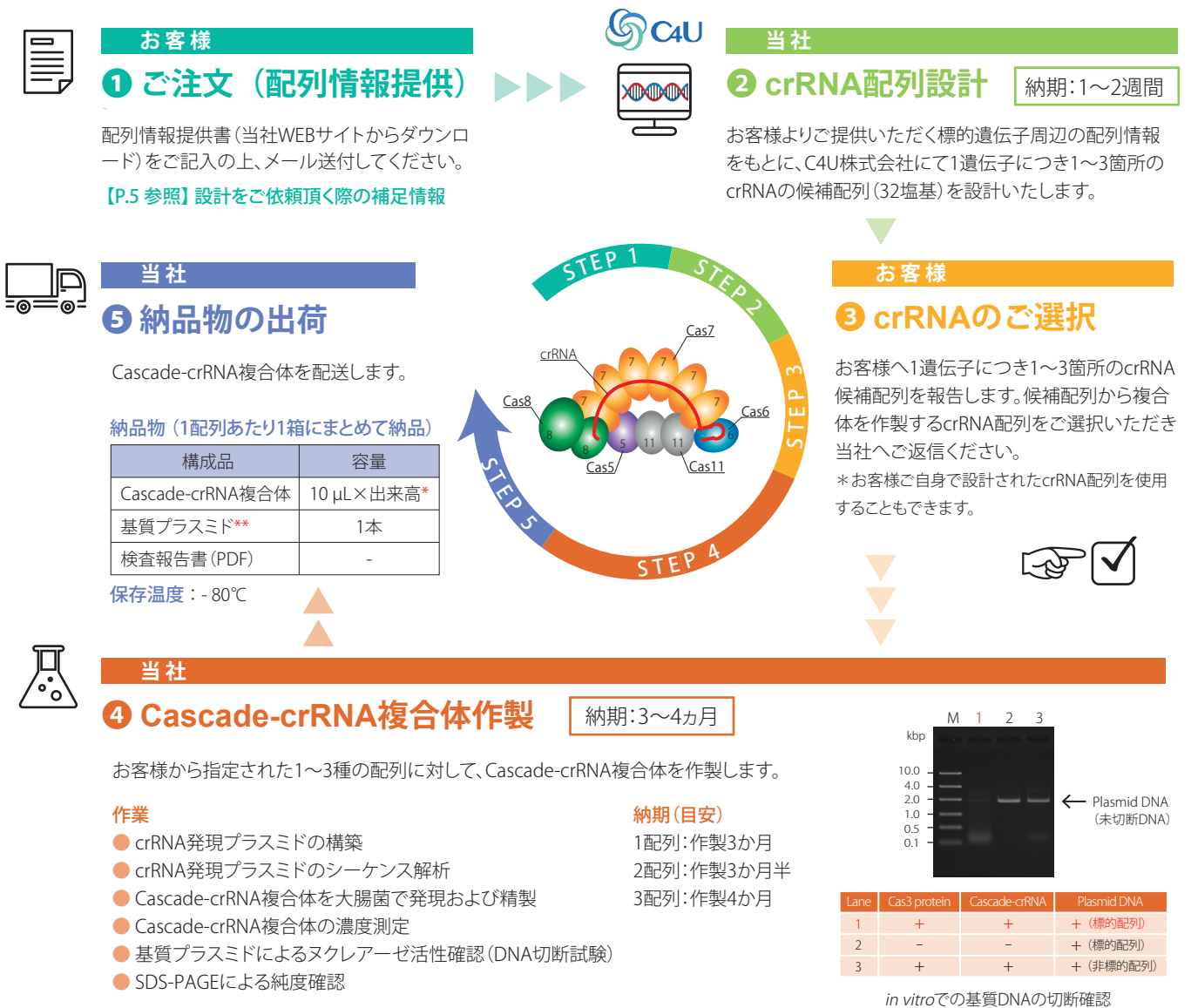
### 3. CRISPR-Cas3 ゲノム編集関連製品

crRNA (クリスパーRNA) 配列設計およびカスケード複合体作製サービス

## 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。本サービスで作製したCascade-crRNA複合体と、切断活性をもつCas3 protein NLS (Code No.311-09441)を組み合わせることで、CRISPR-Cas3システムに利用することができます。

### サービスの流れと概要



#### Cascade-crRNA複合体

<b>起 源</b>	遺伝子組換え大腸菌	<b>保 存 温 度</b>	-80℃
<b>濃 度</b>	25 μg/μL Cascade-crRNA複合体	<b>収 量 目 安</b>	10 μL × 1本~出来高*/1配列あたり
<b>形 状</b>	20 mM HEPES-NaOH (pH7.0), 350 mM NaCl		
<b>納 品 物</b>	Cascade-crRNA複合体、基質プラスミド**、検査報告書 (PDFをメール送付)		

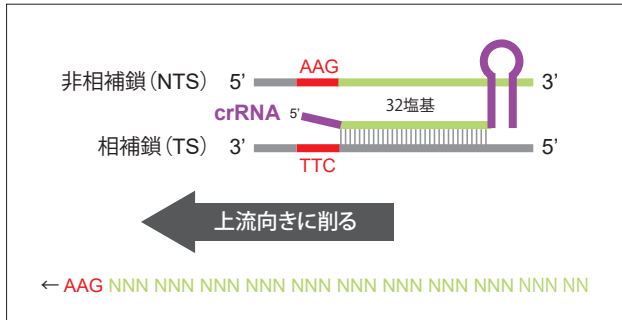
\* 製造した出来高を出荷いたします。目安として1配列あたり6~15本程度を見込んでおりますが、保証はいたしかねます。

\*\* 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。

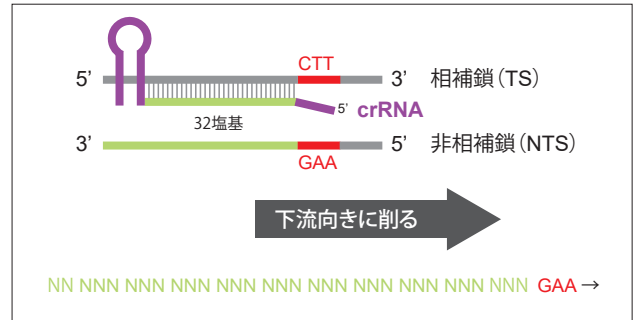
## 設計をご依頼頂く際の補足情報：① 削りたい方向性 (PAM配列と切断の方向)

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。

### ▼ 候補領域から上流向きに削る



### ▼ 候補領域から下流向きに削る



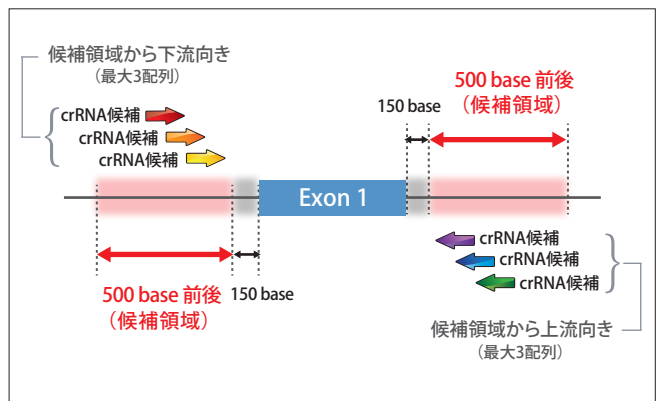
## 設計をご依頼頂く際の補足情報：② crRNA配列を抽出するための候補領域

- 配列情報提供書「2. 標的遺伝子情報」の入力項目「候補領域 (5'→3')」には、crRNA配列を抽出するための候補領域をご入力ください。
- ✓ 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。選択したcrRNAによって活性が異なります。

### ▼ 配列情報提供書の「2. 標的遺伝子情報」の入力例

遺伝子名*1	B2M
対象遺伝子の機能*1	血清タンパク質
由来生物種*1	Homo sapiens
Accession No.*1	NC_00015.10 (44,711,517..44,718,145)
候補領域 (5'→3')	<pre>CCCCCGCAACAATCAACAACAAGAAAATTACCTAACAGCAAGGACATAGGGAGAACTCTTGGCACA GAACCTTCCAAACTTTTCCTGGAAGGGATACAAGAAGCAAGAAAGGTACTCTTCTACTAGGACTCTCTGA GCTGTCTCAGGATGCTTTTGGGACTATTTCTTACCCAGAGAAATGGAGAAACCTGCAGGAAATCCCAAG CTTCTGAGAAATGCAAGTCCGAGCAGTTAATCGCTGGGGCACATTAGCAATCTAGCATCTGGGGCC AGCTCGCAAAGCGAGGGGACCCCTTAATGTGCTCCAGCCTGAAGTCTAGAAATGAGCCGGGTGTCCTCA AGCTGGGGCGCGCACCAGATCGGAGGGGCGGATGTACAGCAGCAAAGTCAACCTCAGCAGCTTCTAGTCATGCC TTTCTGAGAAATGCAAGTCCGAGCAGTTAATCGCTGGGGCACATTAGCAATCTAGCATCTGGGGCC GTTAGGTCAGCAGCAGTCCGAGCAGTTAATCGCTGGGGCACATTAGCAATCTAGCATCTGGGGCCGCTT ATATAAGTCTAGTCATGCCCTGCAAGTCTAGAAATGAGCCGGGTGTCCTCAAGTCTAGTCATGCC CTAGTCATGCCCTGCAAGTCTAGAAATGAGCCGGGTGTCCTCAAGTCTAGTCATGCCCTGCAAGTCTAGAAATGAGCCGGGTGTCCTCA AGTCTGGGGCGCGCACCAGATCGGAGGGGCGGATGTACAGCAGCAAAGTCAACCTCAGCAGCTTCTAGTCATGCC</pre>
削りたい方向性*2	候補領域から下流向き

### ▼ crRNA配列を抽出するための候補領域



\*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。  
\*2) 削りたい方向性をプレタउनから選択して下さい。

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)

#### [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で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な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、富士フイルムと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。

### 3. CRISPR-Cas3 ゲノム編集関連製品

Cascade-crRNA複合体 (ヒト B2M遺伝子)

## Cascade-crRNA complex, hB2M

本品は、CRISPR-Cas3ゲノム編集用のCascadeタンパク質とcrRNAの複合体で、複数の核移行シグナル (NLS) が付与されています。crRNAはヒトの beta-2-microglobulin (B2M) 遺伝子を標的としています。Cas3 protein NLS (Code No.311-09441) と組み合わせることで、標的配列を含むDNAを切断することができます。

#### ■ 特長

- CRISPR-Cas3システムの実験系立ち上げの際の予備実験に使用可能
- 本品とCas3 protein NLSを組み合わせることで標的配列を含むDNAを切断することが可能
- ヒト beta-2-microglobulin (B2M) 遺伝子を標的としたCascade-crRNA複合体
- 核移行シグナル (NLS) を付与

起 源	遺伝子組換え大腸菌	hB2M遺伝子情報	
濃 度	25 µg/µL Cascade-crRNA複合体 (hB2M)	由 来	<i>Homo sapiens</i> (human)
形 状	20 mM HEPES-NaOH(pH7.0), 350 mM NaCl	遺 伝 子 名	beta-2-microglobulin (B2M)
保 存 温 度	-80℃	標的配列情報	
分 子 量	396,819 (アミノ酸配列より算出)	配 列	5'- AAG GCA TGC ACT AGA CTG GGT GAG TTT GCT GT -3'

Code No.	製品名	容量	希望納入価格 (税別)
312-09471	Cascade-crRNA complex, hB2M	250 µg	98,000円

高純度、高濃度のCas3タンパク質

## 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
- 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
- 核移行シグナル (NLS) を付与

起 源	遺伝子組換えバキュロウイルス
濃 度	15 µg/µL Cas3 protein NLS
形 状	20 mM HEPES-NaOH(pH7.0), 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 50% Glycerol
保 存 温 度	-20℃
分 子 量	103,698 (アミノ酸配列より算出)

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

## 使用例：in vitroでの基質DNAの切断確認

Cas3 protein NLS (Code No.311-09441) および Cascade-crRNA complex, hB2M (Code No.312-09471) を用いて、PAM配列 (AAG) と32塩基の標的配列を含むPlasmid DNAの切断確認を行った。

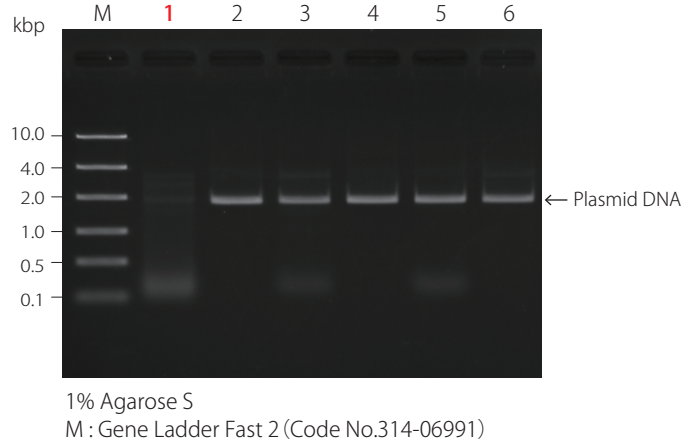
### <反応液組成>

5 mM HEPES-KOH (pH7.5)  
60 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 μM CoCl<sub>2</sub>  
2.5 mM ATP  
0.24 μM Cas3 protein NLS (Code No.311-09441)  
0.20 μM Cascade-crRNA complex, hB2M (Code No.312-09471)  
100 ng Plasmid DNA

### <反応条件>

37°C、5分間反応  
↓  
Loading Buffer (SDS含有) を反応液に添加\*1  
↓  
アガロースゲル電気泳動

\*1) 正確な泳動結果を得るため、SDSを含むLoading Buffer (Code No.313-90111等) の使用をお勧めします。



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)

### <結果>

PAM配列 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。

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

## ライセンス

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, Cascade-crRNA complex, hB2M 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。


製品詳細は当社HPをご覧ください。

ニッポンジーン Cas3



## 4. ゲノム編集関連製品 (CRISPR/Cas9)

ニッポンジーンでは、CRISPR/Cas9によるゲノム編集関連製品も幅広くラインアップしています。

Step	ガイドRNA合成 (in vitro転写)	Cas9タンパク質を細胞導入	変異導入の確認
CRISPR/Cas9 関連製品 ラインアップ	<p>ガイドRNAを正確かつ大量に合成 <b>CUGA®7 gRNA Synthesis Kit</b></p> 	<p>野生型Cas9タンパク質 Cas9 Nuclease protein NLS (3 µg/µl) Cas9 Nuclease protein NLS (15 µg/µl)</p> <p>オフターゲット効果の抑制に Cas9 Nickase protein NLS (15 µg/µl)</p> <p>転写抑制研究などに dCas9 protein NLS (15 µg/µl)</p>	<p>遺伝子変異を簡便に検出 T7 Endonuclease I reaction Mix</p> <p>遺伝子変異検出に必要な試薬がセットに Rapid Indel Detection Kit</p> <p>高感度にCas9タンパク質を検出 Anti-Cas9 Monoclonal Antibody</p>

Code No.	製品名		容量	希望納入価格 (税別)
<b>in vitro 転写でのガイドRNA合成キット</b>				
314-08691	CUGA®7 gRNA Synthesis Kit	ライセンス	50 回用	¥54,000
<b>野生型Cas9ヌクレアーゼ &lt;高純度・高濃度&gt;</b>				
319-08641	Cas9 Nuclease protein NLS (3 µg/µl)	ライセンス	75 µg	¥23,000
316-08651	Cas9 Nuclease protein NLS (15 µg/µl)	ライセンス	300 µg	¥75,000
<b>改変型Cas9ニッカーゼ</b>				
317-09161	Cas9 Nickase protein NLS (15 µg/µl)	ライセンス	300 µg	¥75,000
<b>不活性型dCas9タンパク質</b>				
314-09171	dCas9 protein NLS (15 µg/µl)	ライセンス	300 µg	¥75,000
<b>ミスマッチ切断酵素 &lt;変異導入の確認&gt;</b>				
313-08801	T7 Endonuclease I reaction Mix		50 µl	¥15,000
<b>迅速変異導入検出キット</b>				
313-08921	Rapid Indel Detection Kit		50 回用	¥30,000
<b>【関連製品】抗Cas9モノクローナル抗体 (Cas9タンパク質の検出)</b>				
310-08431	Anti-Cas9 Monoclonal Antibody		50 µg	¥55,000

### ライセンス

CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術に関して、ERS Genomics 社よりライセンス許諾を受けて製造・販売しております。



- 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

20240331HT