

ゲノム編集の歴史と基礎

History and Basics of Genome Editing Technology

広島大学大学院理学研究科 教授 **山本 卓**

Takashi Yamamoto, PhD (Professor)

Graduate School of Science, Hiroshima University



キーワード

CRISPR-Cas9、TALEN、Gene knockout、ゲノム編集治療

01 | はじめに

ゲノム編集は、人工のDNA切断システムを利用して正確に遺伝子を改変するバイオテクノロジーである。これまで狙って改変ができなかった培養細胞株や生物種において、遺伝子ノックアウトや遺伝子ノックインが可能であることから、基礎から応用の幅広い分野での利用が期待されている。本稿では、ゲノム編集の開発の歴史とその基本原理を紹介すると共に、ゲノム編集の応用分野で可能性について紹介する。

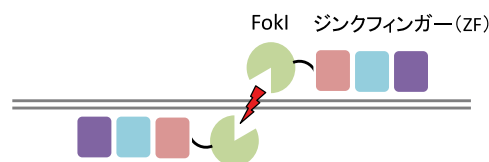
02 | ゲノム編集技術の開発の歴史

ゲノム編集の開発の歴史は、基盤となる人工DNA切断酵素(ゲノム編集ツールとも呼ばれる)の開発の歴史と言える。古くから、細胞内のDNAが切断を受けると、これが原因となって突然変異が誘導されることが知られていた。放射線による変異導入は1950年以降に農作物で開始され、「ゴールド二十世紀」など多くの品種が作られてきた。目的の遺伝子に変異(点変異や欠失挿入変異)が導入された個体を、PCRを利用して効率的に選別する方法(Tilling法)も確立されている¹⁾。しかしながら、これらの方法では、基本的にDNAヘランダムに切断や修飾が起こり、その結果、変異が導入される。また、複数の遺伝子へ同時に変異が導入されることもしばしばである。そのため、標的遺伝子の塩基配列(A, G, C, Tの4つの塩基の並び順)に応じて、特異的に切断を導入する方法の開発が重要であると考えられてきた。一方、DNAの切断を介さない改変法として遺伝子ターゲットングが開発されてきた²⁾。遺伝子ターゲットングは、相同組換え(HR)修復を利用したDNAの切断を介さない方法であり、大腸菌や酵母、ニワトリのDT40細胞、マウスES細胞、ヒメツリガネゴケなどに限られた生物種で可能な技術である。この方法は正確な改変が可能一方、HR修復活性の低い生物種では利用できないという問題があった。

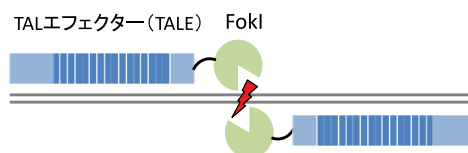
そこで研究者は、特定の塩基配列を認識・切断する酵素で

ある細菌のもつ制限酵素に着目した。制限酵素は、侵入してきた外来DNA(ファージなど)を切断・不活性化するために細菌がもつ防御システムに利用されるタンパク質である。多くの制限酵素は4塩基あるいは6塩基の特定の配列(認識配列)を認識して、2量体となってDNAを切断する。例えば、制限酵素の*Bam*HIを哺乳類の細胞や植物の細胞内で働かせると、染色体DNAはバラバラになってしまう。*Bam*HIの認識配列はGGATCCであり、4,000~5,000塩基対に1箇所の頻度で現れるため、30億塩基対を持つヒトのゲノムはバラバラになってしまう。そこで、より長い塩基配列に特異的に結合して切断できる酵素が人工で作れるようになれば、ヒトで2万以上ある遺伝子の中から選んで特定の遺伝子を改変できると考えられた。この目的で開発されたのが、人工の制限酵素である。1996年に開発された第一世代のジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)は、DNAの認識・結合を行うドメインとDNAを切断するドメインからなるキメラタンパク質である(図1)⁴⁾。ジンクフィンガーは

ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)



テールヌクレアーゼ(TALEN)



クリスパー・キャス9(CRISPR-Cas9)

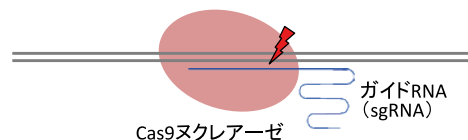


図1 様々な人工DNA切断システム
FokIはフラボバクテリウム属細菌の制限酵素であり、そのDNA切断ドメインがZFNやTALENのDNA切断ドメインとして利用される。

多くの生物で転写因子のDNA結合ドメインに利用されるドメインである。1フィンガーが3塩基を認識・結合し、複数のフィンガーを連結することによって長い配列に特異的に結合させることができる。例えば、4フィンガーのZFNは12塩基を認識して結合する。制限酵素は1組で働くので、ZFNペアで24塩基の特異性で働かせることができる。24塩基の連続する配列は哺乳類ゲノムであれば理論的には一箇所しか現れないため、標的遺伝子だけに切断を導入することが可能になる。ZFNは分子サイズが小さいというメリットある一方で、特異性の高いZFNの作製が難しく、一部の企業に作製を頼らざるを得なかった。私の研究室では、2008年以降にZFNの作製システムを導入し、ウニ胚でのゲノム編集に取り組んできた。ZFNによる標的遺伝子の切断によって蛍光遺伝子を挿入し、初期胚で骨を作る遺伝子の発現をモニターすることに成功している⁵⁾。

2010年には、米国のグループから第二世代のゲノム編集ツールとしてターレン(TALEN)が発表された⁶⁾。ZFNに比べると格段に作製が簡便であり、切断特異性が高いことも特徴である。TALENは植物病原細菌キサントモナスが作る転写因子様エフェクター(TALEタンパク質)を利用した人工制限酵素である。TALEタンパク質には、34アミノ酸残基を単位とするDNA結合リピート(TALEリピート)が存在し、この部分で標的遺伝子の塩基配列と結合する(図1)。TALEリピートの繰返し数は、TALENでは15~20と長いので、一組で作用させる場合30~40塩基の標的配列を認識して切断させることが可能である。私の研究室では、アミノ酸配列の改変によって、高活性型TALEN(Platinum TALEN)を開発し、様々な生物種での高効率での改変を報告した⁷⁾。現在では、モジュールライブラリーを使って3日間でPlatinum TALEN構築することが可能である。しかし、作製する数にはよるが、一からTALENを作製すると、かなりの労力を必要とする。そのため、TALENを使った研究を考える場合は、作製に慣れている研究グループと共同研究を進めることを推奨している。

TALENの開発によってゲノム編集は使いやすくなってきたものの、依然として作製には煩雑な作業が必要とされた。このような状況は、2012年のCRISPR-Cas9の開発によって大きく変わった。CRISPR-Cas9は、簡便かつ高効率なことに加えて、基礎研究であれば自由に使うことができた。そのため、2013年からはZFNやTALENに変わってCRISPR-Cas9が急速に広がった。CRISPR-Cas9は、細菌の獲得免疫機構を利用したシステムである。米カリフォルニア大学バークレー校のジェニファー・ダウドナ博士と独マックスプランク研究所のエマニュエル・シャルパンティエ博士のグループが共同開発し、2012年にScience誌に発表した⁸⁾。同年リトアニアのヴィリユニス大学のヴィルギニウス・シクスニス博士もCRISPRシステムでのDNA切断を発表している⁹⁾。細菌には、ウイルス(バクテリオファージとよばれる)が感染するが、このウイルスを不活性化するのが獲得免疫機構として働くCRISPR-Cas9システムである。細菌は、感染したウイルスのDNAをCRISPR遺伝子座へ取り込み、再び感染した場合にCRISPR遺伝子座から転写される短鎖RNA(シングルガイドRNA:sgRNA)を利用してウイルスDNAを切断する。ダウドナとシャルパンティエは、sgRNAとCas9ヌクレアーゼを利用して試験管内において標的遺伝子を切断できることを示したのである。sgRNAは標的遺伝子と20塩基長で結合し、sgRNAと複合体を作るCas9ヌクレアーゼがDNA二本鎖を切

断する(図1)。Cas9の切断には、sgRNAの結合に加えて、PAM配列と呼ばれるCas9切断のために認識する配列が必要とされる。化膿レンサ球菌のSpCas9のPAM配列は5'-NGG-3'であり、黄色ブドウ球菌のSaCas9のPAM配列は5'-NNGRRT-3'である。CRISPR-Cas9を用いたゲノム編集は、2013年初頭から次々と報告され、2014年以降は毎週のようにCRISPR-Cas9を使った論文が発表されている。

03 | ゲノム編集による遺伝子改変

細胞内のDNAは、自然放射線や化学物質などによって切断を受けるだけでなく、DNAの複製においても切断されることが知られている。切断されたDNAは、そのままにしておくと遺伝子が分断された状態となり致命的である。そのため、細胞内では、切断されたDNAは速やかに修復される。高い確率で正しく元通りにつなぎ合わされる一方で、修復のエラーが起こる場合がある。この修復エラーは、疾患の原因になる可能性があるが、品種改良や生物の進化の原動力となっている。

ゲノム編集は、TALENやCRISPR-Cas9などのゲノム編集ツールによる標的遺伝子の切断とその修復エラーを利用した技術である(図2)。細胞内でツールを導入することによって、目的の遺伝子の切断を繰返し、修復エラーを誘導し遺伝子を破壊する(遺伝子ノックアウト)。また、切断箇所に挿入する外来DNAを入れておくと切断箇所に高い確率で外来DNAを挿入することが可能である(遺伝子ノックイン)。これらゲノム編集ツールを利用した遺伝子改変は、ゲノム編集とよばれる。後者の遺伝子ノックインは、外来DNAを挿入するので、遺伝子ノックイン個体は遺伝子組換え体となる(培養細胞は組換え体から除外される)。

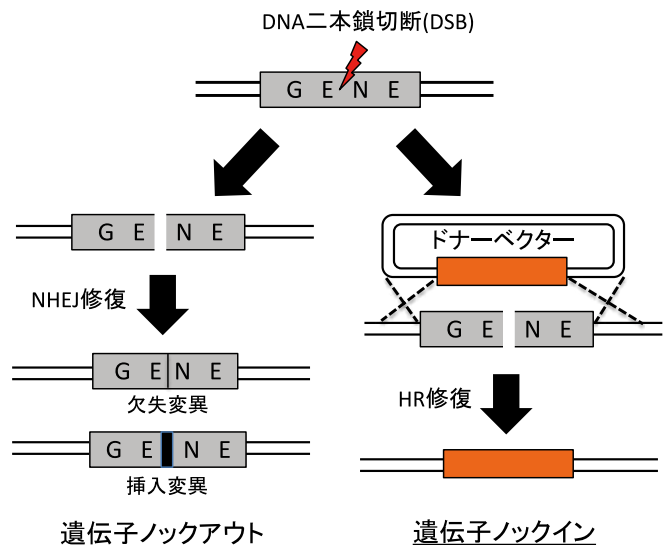


図2 ゲノム編集による遺伝子改変

上述のゲノム編集には、複数のDNA修復経路が関与する。遺伝子ノックアウトでは、DNAの修復経路には切断末端を保護し、末端を連結する非相同末端結合(NHEJ)修復のエラーが利用される。NHEJ修復エラーでは多くの場合、数塩基から数十塩基の欠失が誘導され、遺伝子の読み枠にずれが生じ、正常な

タンパク質が合成できなくなる。遺伝子ノックインでは、切断末端の削り込みが起こる一方で、鋳型となるDNAを介した相同組換えによって修復される。これにより、正確な改変や外来遺伝子のノックイン(蛍光遺伝子の挿入など)が可能となる。

04 | 培養細胞や生物個体でのゲノム編集

ゲノム編集技術(特にCRISPR-Cas9)の開発によって、これまで遺伝子改変ができなかった培養細胞、動物や植物での遺伝子ノックアウトや遺伝子ノックインが可能となった。培養細胞の遺伝子改変は簡単に思われがちだが、ゲノム編集以前の技術を使った場合、効率的な改変ができる細胞種は限られていた。マウスES細胞やニワトリDT40細胞は、相同組換えによって目的の遺伝子を薬剤耐性遺伝子に置き換え、遺伝子を破壊する遺伝子ターゲティングが可能な数少ない細胞であった。原理的にはこの方法によって、薬剤耐性を指標としてノックイン細胞を得ることが可能であるが、HR修復活性が低い細胞種での遺伝子ノックイン細胞の取得はこれまで困難であった。この問題を解決したのがゲノム編集である。ゲノム編集ツールによるDNA切断は、相同組換え活性を上昇させ、現在多くの細胞種での遺伝子ノックインを実現している。さらに、ゲノム編集ツールの発現ベクターあるいはタンパク質の導入によって多くの細胞種においてNHEJを介した遺伝子ノックアウトが報告されている²⁾。最近では単なる遺伝子破壊と挿入に加えて、同じ染色体を2箇所切断することによって大きな欠失変異を導入できることが確認されている。また、異なる染色体を同時に切断することによって、がん細胞株で転座が誘導されることも報告されている。

動物個体でのゲノム編集は、基本的には受精卵へゲノム編集ツールを導入することによって可能である。例えば、マウスであれば、ゲノム編集ツールの形状は、DNA、mRNAあるいはタンパク質のどれを使っても一定の効率で改変が可能である。特に、遺伝子ノックアウトは簡便かつ高効率であり、CRISPR-Cas9を使ったノックアウトマウス作製がES細胞を利用したマウス作製に置き換わっている。これまで1年近くかかっていたES細胞を使った遺伝子ターゲティングが、今ではCRISPR-Cas9を使って数ヶ月から半年で可能である。

05 | ゲノム編集の産業利用

ゲノム編集の利用が期待される産業分野は、生物工学、農水畜産学や医学など幅広い。微生物は、様々な機能性物質を産生するが、産業利用においてはその生産量や性質をコントロールすることが必要になる。この目的では産業微生物において自在に遺伝子改変を加えることが重要である。しかしながら、大腸菌や酵母などのモデル微生物では、遺伝子改変は自在であるものの、産業微生物については必ずしも自在な改変法は確立していない。そのため、ゲノム編集ツールの導入やゲノム編集効率化などの技術開発が今後必要と考えられる。

農作物でのゲノム編集は、食料問題などの解決のため重要な開発につながることは言うまでもない。国内外において、様々な農水畜産物でのゲノム編集が競って進められている。国内では穂の多いイネや毒のないジャガイモ¹⁰⁾など農作物でのゲノム編集が内閣府の戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)で進められている。水畜産物では、筋肉細胞の増殖を抑えるミオスタチン遺伝子を破壊した肉付きのよいタイ(マッスルマダイ)が京都大学の木下らによって作出され、広島大学の堀内らは、アレレルゲン物質の原因遺伝子をノックアウトしたニワトリを作出している。

06 | ゲノム編集の医学分野での利用

ゲノム編集は、医学研究および創薬において大きく期待されている。医学研究では、培養細胞や動物を用いた疾患モデルの作製にゲノム編集技術は重要である。単に原因遺伝子を遺伝子ノックアウトするだけでなく、疾患の原因変異を正確に再現することも最近では可能となってきた。特に人工多能性幹細胞(iPS)細胞での疾患モデル細胞の作製や、疾患患者から樹立したiPS細胞での変異の修復において、ゲノム編集の利用価値は高い。iPS細胞で疾患変異を再現することによって、疾患の発症メカニズムを解明することも可能となる。これらの細胞を利用した低分子化合物スクリーニングを行うことによって、今後薬の候補となる物質を見つけ出すことが効率的に進められると期待される。

ゲノム編集を利用した遺伝子治療は、既に米国や中国で進められている。ゲノム編集治療は、生体内(*in vivo*)ゲノム編集と生体外(*ex vivo*)ゲノム編集の2つに分けられる(図3)¹¹⁾。*in vivo*ゲノム編集は、ゲノム編集ツールをウイルスベクターやナノ粒子などを利用して体内に直接導入する方法である。米国では、血友病やムコ多糖症に関して、ウイルスベクターを介して対象タンパク質をコードする遺伝子を肝臓でノックインすることによって、不足したタンパク質を血中へ分泌させる方法を

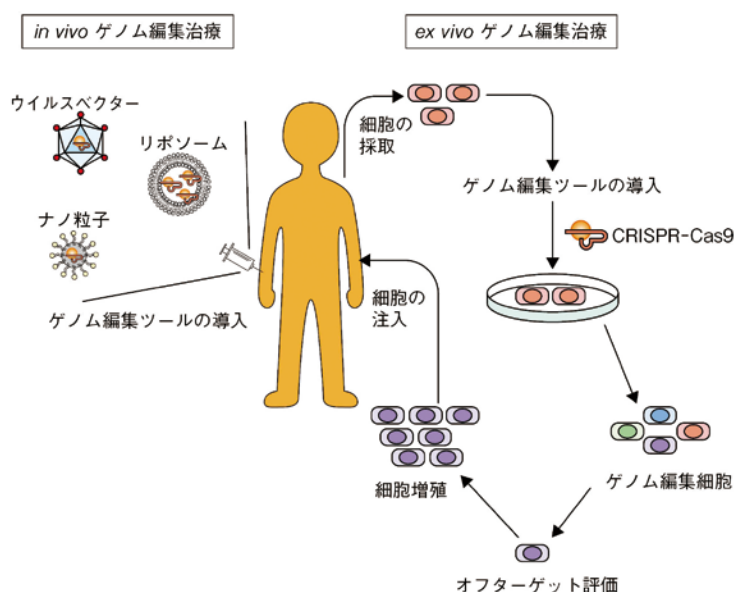


図3 ゲノム編集を利用した遺伝子治療の戦略
文献²⁾から引用

行っている。一方、*ex vivo*ゲノム編集は、取り出した細胞をゲノム編集によって改変し、体内へ移植する方法である。HIVの共受容体であるCCR5遺伝子を遺伝子ノックアウトすることによって作製したT細胞を移植することで、HIVウイルス量が低下する効果が得られている。この方法のメリットは、正確にゲノム編集ができた細胞を選別することが可能な点にある。最近ゲノム編集では予期せぬ変異導入（オフターゲット作用）や大きな欠失が起きる可能性について指摘されている。これらの問題を解決するため、オフターゲット作用を低減させた様々なCas9ヌクレアーゼの変異体が開発されている¹²⁾。さらに、オフターゲット変異導入の有無をゲノムワイドに評価する方法（GUIDE-seq法¹³⁾やDigenome-seq法¹⁴⁾など）も確立されている。

07 | おわりに

ゲノム編集は、開発から数年でライフサイエンス分野では必要不可欠な技術となってきた。基礎研究目的であれば世界中に配付される仕組み（オープンイノベーション）が整っており、基礎研究では誰もが自由に使える。国内のゲノム編集技術開発は遅れ気味ではあるが、新しいゲノム編集ツールも開発されつつあり、日本の巻き返しには多くの研究者の参入が不可欠である。筆者らは、国内のゲノム編集の研究推進および情報共有を図る目的で、平成26年に日本ゲノム編集学会を設立した。1人でも多くの若い研究者がこの技術に興味を持って導入してくれることを願っている。

参考文献

- 1) C. M. McCallum, L. Comai, E. A. Greene, S. Henikoff, *Nat. Biotechnol.* **18**(4), 455-457 (2000).
- 2) 山本卓, *ゲノム編集の基本原理と応用* (裳華房, 東京, 2018).
- 3) Y. G. Kim, J. Cha, S. Chandrasegaran, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**(3), 1156-1160 (1996).
- 4) M. Christian, T. Cermak, E. L. Doyle, C. Schmidt, F. Zhang, A. Hummel, A. J. Bogdanove, D. F. Voytas, *Genetics* **186**(2), 757-761 (2010).
- 5) H. Ochiai, N. Sakamoto, K. Fujita, M. Nishikawa, K. Suzuki, S. Matsuura, T. Miyamoto, T. Sakuma, T. Shibata, T. Yamamoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**(27), 10915-10920 (2012).
- 6) T. Sakuma, H. Ochiai, T. Kaneko, T. Mashimo, D. Tokumasu, Y. Sakane, K. Suzuki, T. Miyamoto, N. Sakamoto, S. Matsuura, T. Yamamoto, *Sci Rep* **3**, 3379 (2013).
- 8) M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, *Science*, **337**(6096), 816-821 (2012).
- 9) G. Gasiunas, R. Barrangou, P. Horvath, V. Siksnys, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**(39), E2579-E2586 (2012).
- 10) S. Sawai, K. Ohyama, S. Yasumoto, H. Seki, T. Sakuma, T. Yamamoto, Y. Takebayashi, M. Kojima, H. Sakakibara, T. Aoki, T. Muranaka, K. Saito, N. Umemoto, *Plant Cell* **26**(9), 3763-3774 (2014).
- 11) D. B. T. Cox, R. J. Platt, F. Zhang, *Nat. Med.* **21**(2), 121-131 (2015).
- 12) H. Mitsunobu, J. Teramoto, K. Nishida, A. Kondo, *Trends Biotechnol.* **35**(10), 983-996 (2017).
- 13) S. Q. Tsai, Z. Zheng, N. T. Nguyen, M. Liebers, V. V. Topkar, V. Thapar, N. Wyvekens, C. Khayter, A. J. Iafrate, L. P. Le, M. J. Aryee, J. K. Joung, *Nat. Biotechnol.* **33**(2), 187-197 (2015).
- 14) D. Kim, S. Bae, J. Park, E. Kim, S. Kim, H. R. Yu, J. Hwang, J. I. Kim, J. S. Kim, *Nat. Methods* **12**(3), 237-243 (2015).