

THE CHEMICAL TIMES

2019 No.1 (通巻251号)

2019 No.1 (通巻251号)

ISSN 0285-2446

特集

遺伝子工学 —ゲノム編集と最新技術—

- ゲノム編集の歴史と基礎 山本 卓 03
 - 生命現象の光操作技術の創出 佐藤 守俊 07
 - ローリングサークル増幅によるRNA直接検出 高橋 宏和、堀尾 京平
小堀 俊郎、岡村 好子 12
 - トピックス 次世代型核酸医薬の創製：マイクロRNAの化学修飾と創薬への展開 北出 幸夫 18





新年を迎えて

代表取締役社長 野澤 学

あけましておめでとうございます。

「THE CHEMICAL TIMES」をご愛読の皆様におかれましては、つつがなく良い新年を迎えられたこととお慶び申し上げます。

昨年は、各地で自然災害が立て続けに発生した大変な1年でした。被災された皆様には心よりお見舞いを申し上げます。

昨今の日本経済は緩やかに成長し、日経平均株価は一時24,400円を超え、1991年11月以来約27年振りの高値となり、バブル崩壊後の最高値圏に到達しました。しかし、昨年10月米国の金利上昇による世界株安連鎖の影響を受けて以来、株価は不安定な状況が続き、サウジリスクによる原油供給も経済の不確実化を引き起こしております。一方、企業は長引く景気後退局面に際して、ムダを廃し、効率を重視した結果、利益を生み出せる構造となり、雇用情勢が改善、有効求人倍率や賃金が上昇しております。今年10月には消費増税が予定されておりますが、むしろ東京オリンピック、IoTや自動車などの成長産業の需要による景気拡大を期待したいところです。

ところで、10月には明るいニュースが飛び込んで参りました。京都大学名誉教授の本庶佑先生がノーベル医学生理学賞を受賞、日本人の同賞の受賞は5人目であり、トータルでは26人目のノーベル賞受賞者となりました。受賞理由は、「免疫抑制の阻害による癌治療法の発見」であり、免疫反応にブレーキをかけるタンパク質PD-1の発見・機能の解明が、新しいがん免疫療法に道を開いたということが評価されました。本庶先生の栄えある受賞を祝し謹んでお喜び申し上げますとともに、今後のご活躍を心よりお祈りいたします。

さて、当社では昨年より紙媒体の試薬総合カタログを廃止し、ホームページ上に「電子版試薬総合カタログ」

をアップしております。ご利用いただいているお客様からは、電子版ならではの検索機能、抽出機能などの面から概ね好評を得ており、さらに今年4月には、皆様からの様々なご意見を反映させて、より使い易いサイトにリニューアルを予定しています。また、同時に電子版の有機試薬専用カタログを新たにリリースする準備を進めているところです。有機試薬カタログの新機能として、母骨格や官能基での抽出、用途による抽出、分子量順での並べ替えなどが付加されます。電子版試薬総合カタログをサポートする強力な化合物検索ツールとしてご活用頂ければと思います。今後も内容の充実、使い易さを向上させて参りますので、忌憚のないご意見を頂ければ幸いです。

科学技術創造立国を目指す日本の技術力の発展には、試薬や分析機器の技術革新も大きく貢献しております。今後も新たな産業を作り出す基盤業界として責任を果たして参る所存です。

本誌は科学の最新の話題を提供するようにますます充実した内容にする様引き続き取り組んで参りますので、皆様のご指導、ご鞭撻を何卒よろしくお願い申し上げます。

この一年が皆様にとって光輝に満ちた幸多い年でありますように祈念しております。



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

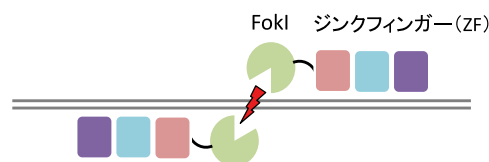
ゲノム編集技術の開発の歴史

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ティングが開発されてきた²⁾。遺伝子ターゲティングは、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で一方、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。

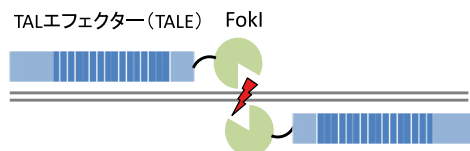
そこで研究者は、特定の塩基配列を認識・切断する酵素で

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)

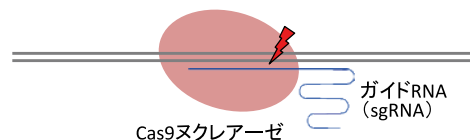


図1 様々な人工DNA切断システム

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、標的遺伝子のみ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ニュ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。高い確率で正しく正確に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)。

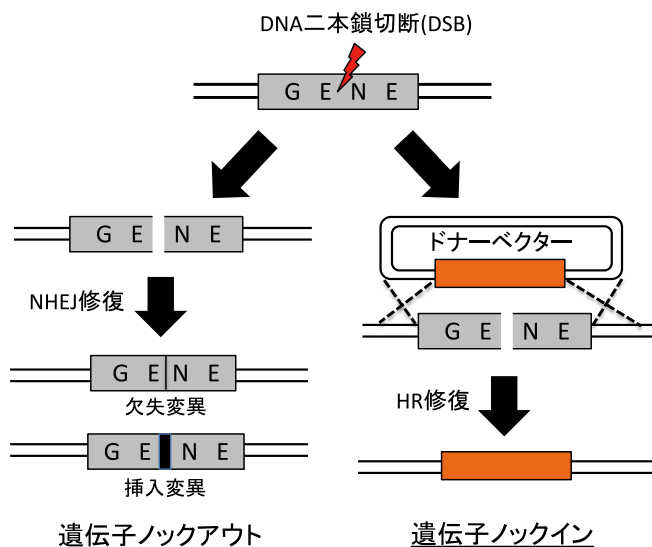


図2 ゲノム編集による遺伝子改変

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、アレルギー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

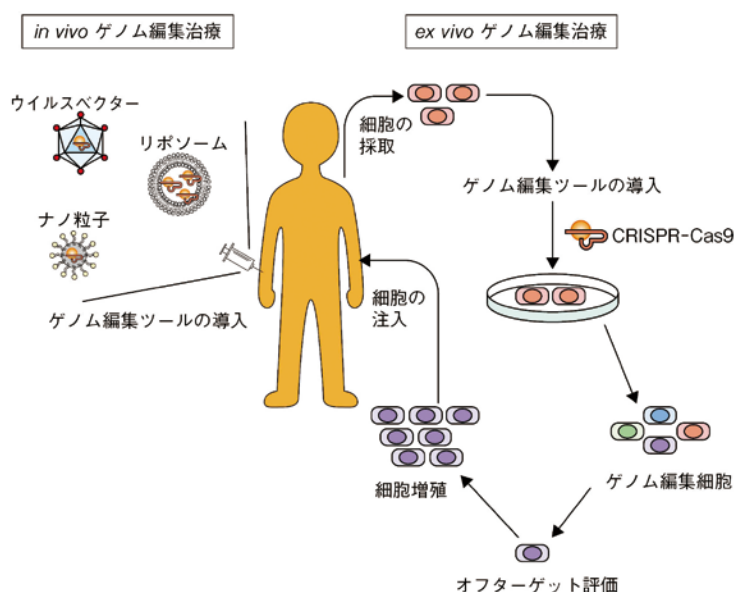


図3 ゲノム編集を利用した遺伝子治療の戦略
文献²⁾から引用

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).

生命現象の光操作技術の創出

Manipulating living systems by light

東京大学大学院総合文化研究科 教授 **佐藤 守俊**

Moritoshi Sato, PhD (Professor)

Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo



キーワード

光操作、ゲノム編集、CRISPR-Cas9システム

01

はじめに

蛍光タンパク質の実用化を契機として、1990年代以降、光を使ったバイオイメーシング技術が世界中の研究室で利用されるようになった。しかし、ライフサイエンスにおける光技術の将来は、必ずしもバイオイメーシングに限定されない。光を使って生命現象を「見る」だけでなく、それらを光で「操る」ことができるとしたら、ライフサイエンスや医療はどうなるだろう？例えば、細胞内シグナル伝達を光で操作できるようになれば、代謝、分泌、細胞増殖、細胞分化、細胞死等の生命機能を自由自在にコントロールできるようになるかもしれない。ゲノムの塩基配列を光で自由自在に書き換えたり、遺伝子のはたらきを自由自在に制御できるようになったらどうだろう？光が得意とする高い時間・空間制御能をもってすれば、狙ったtime windowのみで、狙った生体部位のみで、様々な生命機能や疾患をコントロールできるかもしれない(図1)。このような未来を実現すべく、筆者らは新しい技術の開発を行ってきた。

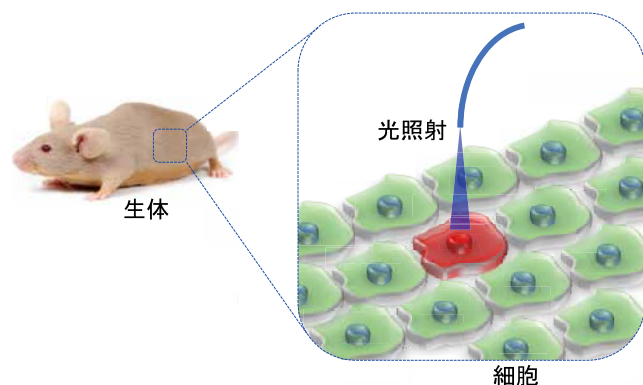


図1 生命現象の光操作の概念図

02

光操作の基盤技術 “Magnetシステム”の開発

筆者らがまず重要と考えたのは、操り人形で言えばヒモとか棒に相当する、汎用性の高い基盤ツールの開発である。植物や

菌類のように光を利用して生きている生物は光受容体と呼ばれるタンパク質を持っている。光受容体は、光を吸収すると大きく構造変化したり、別のタンパク質と相互作用することにより下流に情報を伝えている。つまり光受容体は、光による入力をタンパク質の構造変化や相互作用といった力学的シグナルとして出力できるのだ。しかし、野生型の光受容体は、光応答性や反応速度などに問題を抱えていることが多い。筆者らは、アカパンカビ(*Neurospora crassa*)が有する光受容体(Vivid)に対して多角的にプロテインエンジニアリングを施してその性質を大幅に向上したり、新しい機能を付与するなどして“Magnetシステム”と称する光スイッチタンパク質を開発した(図2)¹⁾。

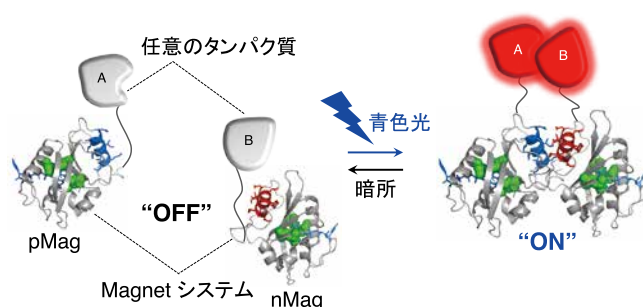


図2 光スイッチタンパク質“Magnetシステム”

青色の光を照射すると二量体を形成し、光照射をやめると元の単量体に戻る。その分子量は緑色蛍光タンパク質(GFP)の3分の2程度と非常に小さい。Magnetシステムを連結すれば二種類のタンパク質(A、B)の相互作用や活性を光照射のON/OFFでコントロールできる。

Magnetシステムに様々なタンパク質やペプチド(例えばAとB)を遺伝子工学的に連結することにより、それらを光刺激で近接させることができる。光刺激をやめればMagnetシステムは解離するので、AとBも元のようにバラバラになる。このようなMagnetシステムの特徴を利用してタンパク質の活性を光で自由自在にコントロールすることにより、ゲノムの塩基配列を光刺激で書き換えたり、ゲノム遺伝子の発現を操作することが可能になった。以下では、このようなゲノムの光操作技術について、筆者らの最近の研究を紹介したい。

03 | CRISPR-Cas9システムの光操作技術

2012年、原核生物のCRISPR-Cas9システムに基づくゲノム編集 (genome editing) が報告されて以来、当該技術は爆発的な勢いで発展し、すでに世界中の研究室で利用されている (図3)。CRISPR-Cas9システムの報告を受け、Magnetシステム

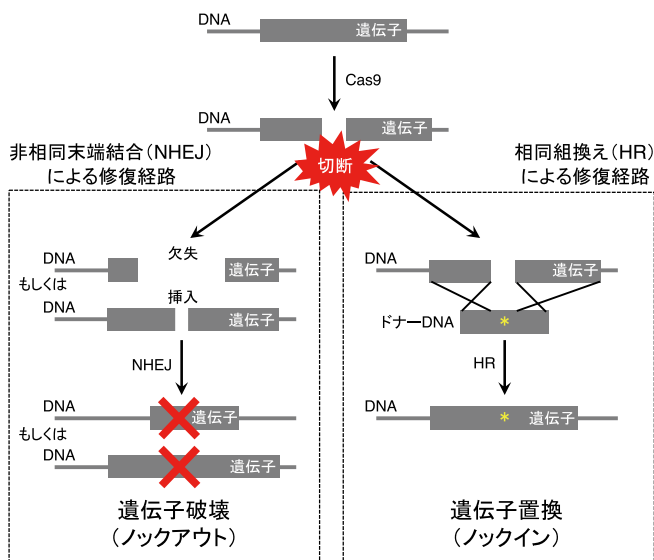


図3 CRISPR-Cas9システムによるゲノム編集

ゲノムのDNAは、Cas9により部位特異的に切断されると、細胞内で修復される。この修復経路には、非相同末端結合 (NHEJ) による修復 (図の左のボックス) と相同組換え (HR) による修復 (図の右のボックス) が知られている。Cas9で切断されたDNAの末端は欠失や挿入を起こしやすい。欠失挿入 (indel) を起こしたあと非相同末端結合 (NHEJ) により修復されると、当該遺伝子にフレームシフトやindel変異が導入され、その機能は破壊される (遺伝子破壊 (ノックアウト))。一方、ドナーDNAを共存させておくと、切断部位は相同組換え (HR) による修復され、当該遺伝子にドナーDNAの塩基配列を導入できる (遺伝子置換 (ノックイン))。このように、Cas9による部位特異的なDNA切断と細胞内でのDNA修復を利用してゲノムの塩基配列を書き換えるのがゲノム編集技術である。

ムを応用した光操作技術の新しい展開を模索していた筆者らは、2013年初頭からCRISPR-Cas9システムとMagnetシステムを組み合わせた新しい技術の開発研究を開始した。

ゲノム編集を行うためには、ゲノム上の狙ったDNA配列を切断する必要がある。よく知られているように、Cas9はガイドRNAが指定するDNA配列を切断する酵素である。しかし、そのDNA切断活性は常にONであり、外部からコントロールすることはできなかった。このため、狙ったタイミングや狙った時間、組織の中の狙った細胞でのみゲノム編集を実行することができないなど、既存のゲノム編集技術には様々な制約が課せられていた。このような背景から、筆者らはCas9の活性を制御できる技術の開発が必要と考えた。CRISPR-Cas9システムに基づくゲノム編集技術が発表された当時、筆者らの研究室では、上述した光スイッチタンパク質“Magnetシステム”の開発が佳境を迎えていた。このMagnetシステムを使えばゲノム編集を自由自在に光で操作できるとの確信から、光駆動型のゲノム編集ツール“PA-Cas9 (photoactivatable Cas9)”の開発研究に着手した (図4)²⁾。

筆者らは、Cas9のDNA切断活性をON/OFF制御するために、まず、Cas9タンパク質を二分割してそのDNA切断活性を不活性化した。さらに、二分割により活性を失った“split-Cas9”のN末端側断片 (N-Cas9) とC末端側断片 (C-Cas9) にMagnetシステム (pMagおよびnMag) を連結した。このようにsplit-Cas9にMagnetシステムを連結して開発したのがPA-Cas9である。Magnetシステムは青色の光に反応して結合する光スイッチタンパク質である。青色の光を照射すると、Magnetシステムの結合に伴って、split-Cas9も互いに近接し結合する。これにより、split-Cas9は本来のCas9タンパク質のようにDNA切断活性を回復し、標的の塩基配列を切断できるようになる。そして、光照射を止めるとMagnetシステムは結合力を失うため、split-Cas9は元のようにバラバラになり、DNA

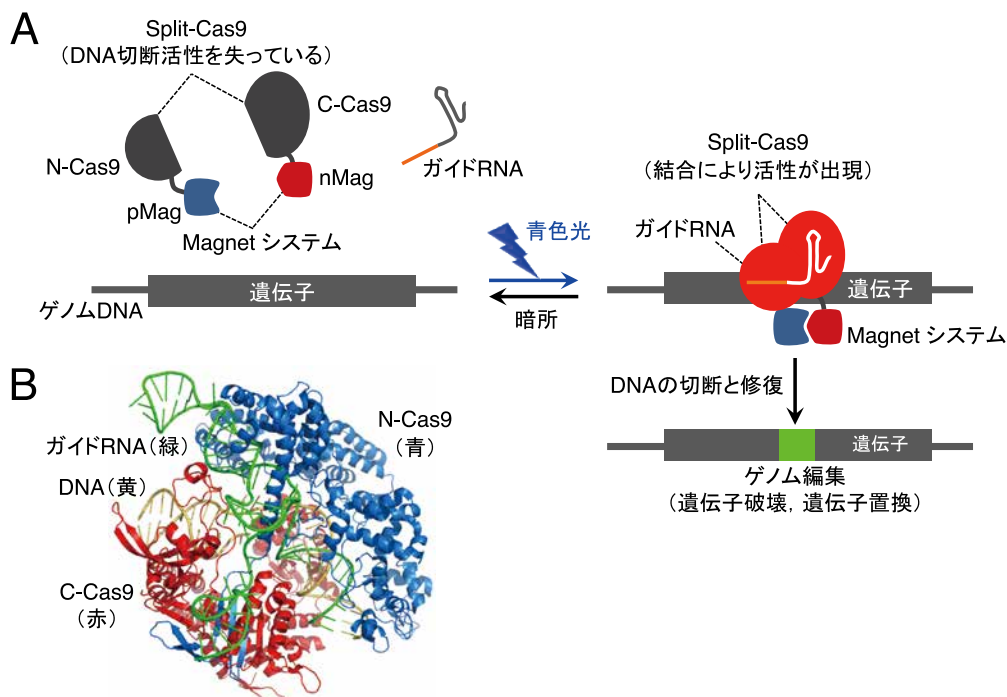


図4 PA-Cas9

(A) PA-Cas9の原理 二分割により活性を失わせたsplit-Cas9のN末端側断片 (N-Cas9) とC末端側断片 (C-Cas9) にMagnetシステム (pMagとnMag) を連結する。青色光を照射すると、Magnetシステムの二量体化に伴ってN-Cas9とC-Cas9も互いに近接し結合する。これにより、N-Cas9とC-Cas9は本来のCas9タンパク質のようにDNA切断活性を回復し、標的の塩基配列を切断できるようになる。光照射を止めるとMagnetシステムは結合力を失うため、N-Cas9とC-Cas9も離れ離れになり、DNA切断活性は消失する。このため光を照射している間だけ、ゲノム編集を実行できる。(B) Cas9の結晶構造 青: N-Cas9に相当する部分、赤: C-Cas9に相当する部分、緑: ガイドRNA、黄: DNA。

切断活性は消失する。このようにPA-Cas9は、DNA切断活性を光照射で自由自在にコントロールできるツールである。なお、ガイドRNAはゲノム上での案内役をつとめるRNAであり、その5'末端の塩基配列(20塩基程度)を設計することにより、どの遺伝子を光操作するのかをあらかじめ指定できる。

PA-Cas9により、光で指令を与えて意のままにゲノム遺伝子の機能を破壊(knockout)したり、別の塩基配列で置換(knockin)できるようになった。筆者らは、主としてHEK293T細胞を用いて様々な検討を行っている。例えば、当該細胞の染色体にコードされた*EMX1*遺伝子と*VEGFA*遺伝子を、光照射で同時にゲノム編集できることを示した。その効率をCas9のゲノム編集効率と比べると、両者にそれほど大きな差がないことが明らかになった。さらに、PAM配列や標的配列に対する選択性なども、PA-Cas9とCas9ではほとんど差がないことがわかった。上述のようにPA-Cas9は、Cas9を真っ二つにするという、かなり荒っぽい手法で開発されているが、そのDNA切断活性や配列特異性がCas9とそれほど変わらないというのは、筆者らにとって驚きであった。

このように筆者らは、CRISPR-Cas9システムを光照射のON/OFFで制御する技術を開発し、光によるゲノム編集の制御を実現した。既存の技術では、狙ったタイミングや狙った時間でのみゲノム編集を実行することは不可能だったが、PA-Cas9を用いればDNA切断活性の持続時間を非常に短く制御できるため、オフターゲット(off-target)に関する既存技術の問題を低減できるかもしれない。また、既存の技術ではゲノム編集を空間的に制御することは不可能だったが、PA-Cas9を用いれば、例えば脳における神経細胞のように、組織の中で狙った細胞単位でのゲノム編集が実現するかもしれない。このようにPA-Cas9は、ゲノム編集の応用可能性を大きく広げることが期待される。

04 | ゲノム遺伝子の発現を光操作する技術

分化や発生、代謝、免疫、記憶・学習など、私たちの生体でみられる多様な生命現象は、さまざまな遺伝子の発現によって成り立っている(図5)。それぞれの遺伝子がどのように生命現象

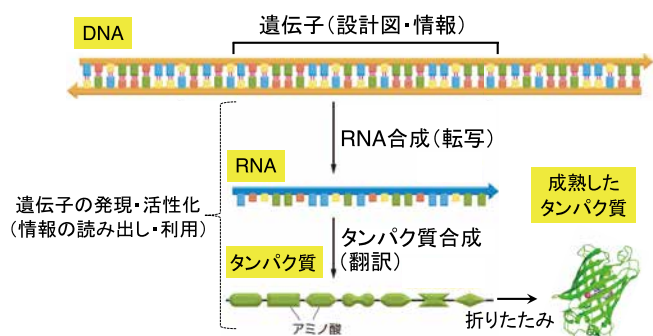


図5 遺伝子の発現

遺伝子(DNA)の塩基配列はRNAの塩基配列に転写され、さらにタンパク質のアミノ酸配列に翻訳される。このアミノ酸配列に基づいてタンパク質は折りたたまれ、成熟したタンパク質となる。このような遺伝子の発現こそが生命現象や疾患には重要な役割を果たす。

の制御に関わっているのかを明らかにするには、ゲノム上に散らばったそれぞれの遺伝子の発現を自由自在にコントロールする技術が必要である。この目的のために筆者らは、新たなゲノムエンジニアリングツール(Split-CPTS2.0)³⁾(図6)を開発した。Split-CPTS2.0はゲノムの塩基配列を改変する上述のPA-Cas9とは大きく異なり、ゲノムにコードされた遺伝子の発現を自由自在に光で操作するツールである。しかもその効率が著しく高いことが大きな特徴であり、既存のツールでは実現困難だった新たな応用が可能になる。

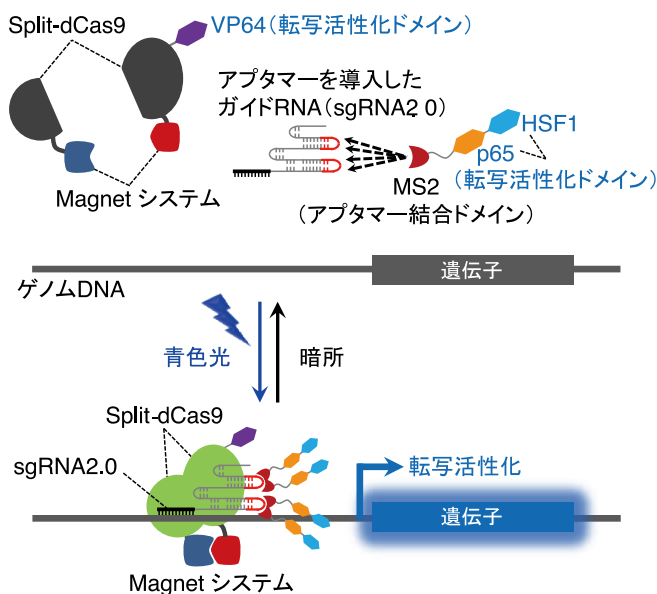


図6 Split-CPTS2.0の原理

dCas9の二分割体(split-dCas9)とMagnetシステムを用いて、3種類の異なる転写活性化ドメイン(VP64、p65、HSF1)を合計9つ、標的ゲノム遺伝子の転写開始点の上流領域に光刺激によって集積することにより、そのゲノム遺伝子の転写を高効率で活性化できる。

Split-CPTS2.0の開発においては、まずCas9に変異を導入してヌクレアーゼ活性を欠失させたdCas9を作成し、さらにこのタンパク質を二分割してN末端側断片とC末端側断片を作製した。この両断片(split-dCas9)に、筆者らが開発した光スイッチタンパク質のMagnetシステムと転写活性化ドメイン(VP64)を連結した。さらに、アプタマーと呼ばれるRNA配列を挿入したガイドRNA(sgRNA2.0)、MS2タンパク質(アプタマーと結合するタンパク質)と転写活性化ドメイン(p65およびHSF1)の融合タンパク質を用いた。なお、sgRNA2.0は標的遺伝子の転写開始点の上流領域に結合するように設計する。青色光を照射すると、split-dCas9とsgRNA2.0が標的遺伝子の転写開始点の上流領域に集積し、転写活性化ドメインの働きにより、当該ゲノム遺伝子の転写を活性化する。光照射をやめると、上述のsplit-dCas9とsgRNA2.0は再びバラバラになり、標的遺伝子の転写は停止する。このように、光照射の有無によって、標的遺伝子の発現をコントロールできる。筆者らが開発した一世代前の技術(CPTS: CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system)⁴⁾では、光刺激により、1種類の転写活性化ドメイン(p65)を1つだけ、ゲノム遺伝子上流領域に呼び寄せていたが、Split-CPTS2.0では、3種類の異なる転写活性化ドメイン(VP64、p65、HSF1)を合計

9つ同時にゲノムに集めたため(split-dCas9にVP64を一つ導入。sgRNA2.0にはアプタマーが二つ導入してあり、一つのアプタマーにMS2-p65-HSF1は二つ結合。従って、VP64×1、p65×4、HSF1×4が光刺激によりゲノム遺伝子上流領域に集積)、著しく高い効率でゲノム遺伝子の発現を光操作できるようになった。なお、sgRNA2.0の5'末端の塩基配列(20塩基程度)は、ゲノム上でのSplit-CPTS2.0の結合部位を決定する因子である。sgRNA2.0の設計を通じて、任意のゲノム遺伝子を選択し、それを自在に光操作できることもSplit-CPTS2.0の大きな特長である。複数の異なるガイドRNAを細胞に導入しても良い。Split-CPTS2.0は同時に複数の標的遺伝子を光操作することも可能である。

筆者らは、Split-CPTS2.0をiPS細胞の分化を光操作するツールとして応用している(図7)。Split-CPTS2.0をiPS細胞に

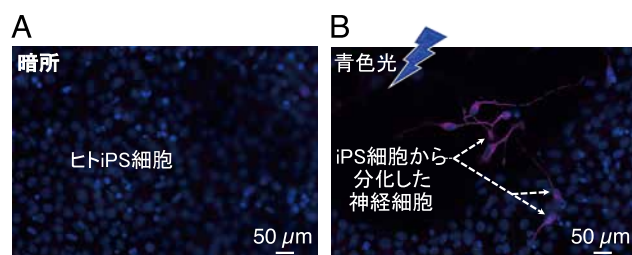


図7 Split-CPTS2.0による細胞分化の光操作
(A, B) Split-CPTS2.0を用いてiPS細胞の*NEUROD1*遺伝子の発現を光刺激で強く活性化し、iPS細胞から神経細胞への分化を光操作(A:暗所、B:4日間の光照射後)。細胞をDAPI(青)と神経細胞のマーカであるβ-III tubulinの抗体(マゼンタ)で染色。

導入し、神経細胞への分化を制御する*NEUROD1*遺伝子を光操作すると、上述の先行技術(CPTS)と比べて2000倍強く、*NEUROD1*遺伝子の発現を光刺激で活性化できる。このため、Split-CPTS2.0ではiPS細胞を光刺激で神経細胞に分化させることが可能になる。一方、先行技術では、*NEUROD1*遺伝子の発現を光刺激で操作することはできるが、その効率が十分でないため、iPS細胞を神経細胞に分化させることはできない。このように、遺伝子発現の効率を著しく高めたSplit-CPTS2.0では、ゲノム遺伝子発現の光操作に基づく新たな応用が可能になった。

05 | Cre-loxPシステムの光操作技術

最後に、ツール開発の方法論について触れたい。上述のCRISPR-Cas9システムを用いた二つの光操作技術(PA-Cas9, Split-CPTS2.0)は、Cas9タンパク質を二分割して両断片の会合をMagnetシステムでコントロールするというアプローチに基づいている。ツール開発のために我々が導入したこのアプローチは一般性が高く、Cas9以外のタンパク質を利用した光操作ツールの開発にも応用できることが極めて重要と筆者らは考えている。この観点から、CRISPR-Cas9システムに続く第二の例として、今やライフサイエンスには欠くことのできないツールとなったCre-loxPシステムとMagnetシステムを組み合わせるDNA組み換え反応の光操作を可能にしたツール(PA-Cre)について紹介する(図8)⁵⁾。

Cre-loxPシステムはバクテリオファージP1が有するDNA

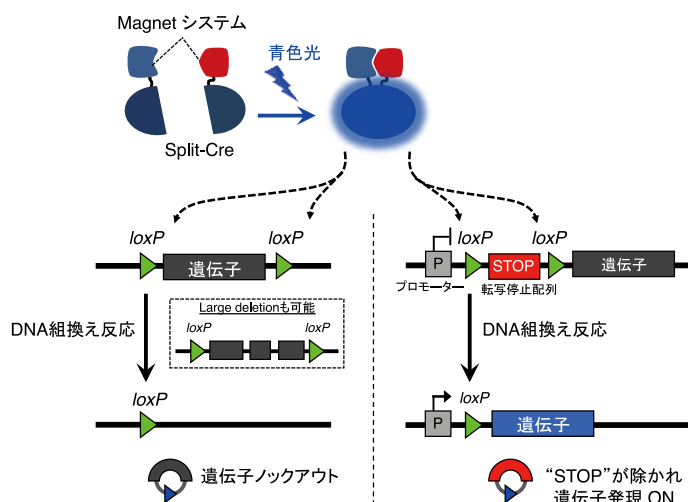


図8 PA-Creの原理

Split-CreとMagnetシステムからなるPA-Creは青色光で活性化するDNA組換え酵素である(上図)。遺伝子もしくは遺伝子群をloxPで挟むことにより、当該遺伝子・遺伝子群を光刺激でノックアウトできる(左下図)。また、転写停止配列(STOP)をloxPで挟むことにより、遺伝子の発現を光刺激で活性化できる(右下図)。

組換えシステムであり、DNA組換え酵素のCreはloxPと呼ばれる34bpの塩基配列に結合して2つのloxP配列の間での組換え反応を触媒する。筆者らはまず、CRISPR-Cas9のケースと同様に、Creタンパク質を二分割してそのDNA組換え活性を不活性化した。次に、二分割により活性を失った“split-Cre”のN末端側断片(N-Cre)とC末端側断片(C-Cre)のそれぞれにMagnetシステムを連結した。筆者らは、培養細胞での評価系でこのツール(PA-Cre)をテストすると共に、マウスでの検証も行なっている(図9)。

マウスでの検証では、まず、PA-Creをコードするプラスミドとレポーターのプラスミドをマウスの尾静脈に導入して、肝臓に当該プラスミドを導入した。レポーターはDNA組換え反応によりルシフェラーゼが発現するように設計しているので、マウスの肝臓の細胞の中でPA-Creが活性化すれば、その様子をEM-CCDカメラを用いて可視化できる。PA-Creは非常に感度が高いため、生体外からの光照射でもDNA組換え反応をコントロールできる。青色LEDをアレイ化した光源(470 ± 20 nm)を用いてマウスの腹側から光照射したところ、ルシフェラーゼの明るい生物発光が肝臓から観察された。興味深いことに、30秒間程度のパルス照射を生体外から施すだけでも、PA-Creの活性化を十分に誘起できることが分かった。一方、暗所ではルシフェラーゼの生物発光は全く観察されず、DNA組換え反応は起こらない。また、通常の部屋の明るさでも、暗所の場合と同様に、マウスの肝臓ではPA-Creは活性化せず、DNA組換え反応は全く起こらないことが分かった。このツール(PA-Cre)は、暗所ではほとんど活性を示さず、青色光を照射すると速やかに強いDNA組換え活性が出現する。つまり、PA-Creを使えば光刺激によって自由自在にDNA組換え反応を時空間制御できる。

06 | おわりに

本稿では光操作の基盤技術としての光スイッチタンパク質“Magnetシステム”について触れる共に、CRISPR-Cas9システムとCre-loxPシステムの光操作技術に関する研究事例を紹介した。筆者らが開発した技術により、ゲノムの塩基配列を自由自在に光刺激で書き換えることが可能になった。加えて、染色体にコードされた遺伝子の発現を光刺激で自在に活性化、つまりゲノム情報を光で読み出すことが可能になった。例えば、ヒトの脳では約860億個、マウスの脳では約7,000万個の神経細胞がそれぞれの役割を持って活動している。細い光ファイバーを使ってマウスの脳にピンポイントで光を当てて特定の神経細胞の特定の遺伝子の働きを操作した上で、マウスの行動等がどのように変化するかを観察すれば、光刺激で狙った神経細胞の遺伝子が脳の中でどのような役割を持っているのかを解明できるかもしれない。また、同様のアプローチで、生体内で生じたゲノムや遺伝子の異常(変異や欠失など)が、どのようにガンや精神疾患などの様々な疾患に繋がるのかを解明できるかも

しれない。このような期待から、化学や生命科学に携わる国内外の研究者が筆者らの技術に関心を寄せている。

本稿で紹介したCRISPR-Cas9システムやCre-loxPシステムと光遺伝学の出会いは、ライフサイエンスの可能性を大きく広げると筆者らは考えている。その試みは始まったばかりであり、技術のさらなる応用や改良・展開が可能だろう。さらに、筆者らのツール開発のアプローチは一般性・汎用性が高く、今後、様々な光操作ツールの設計・開発に貢献するだろう。上述したツールやツール開発の方法論が読者のみなさんのアイデアを刺激し、化学や生命科学の諸分野の研究に役立てば幸いである。

参考文献

- 1) F. Kawano, H. Suzuki, A. Furuya, M. Sato, *Nat Commun* **6**, 6256 (2015).
- 2) Y. Nihongaki, F. Kawano, T. Nakajima, M. Sato, *Nat. Biotechnol.* **33**(7), 755-760 (2015).
- 3) Y. Nihongaki, Y. Furuhashi, T. Otabe, S. Hasegawa, K. Yoshimoto, M. Sato, *Nat. Methods* **14**(10), 963-966 (2017).
- 4) Y. Nihongaki, S. Yamamoto, F. Kawano, H. Suzuki, M. Sato, *Chem. Biol.* **22**(2), 169-174 (2015).
- 5) F. Kawano, R. Okazaki, M. Yazawa, M. Sato, *Nat. Chem. Biol.* **12**(12), 1059-1064 (2016).

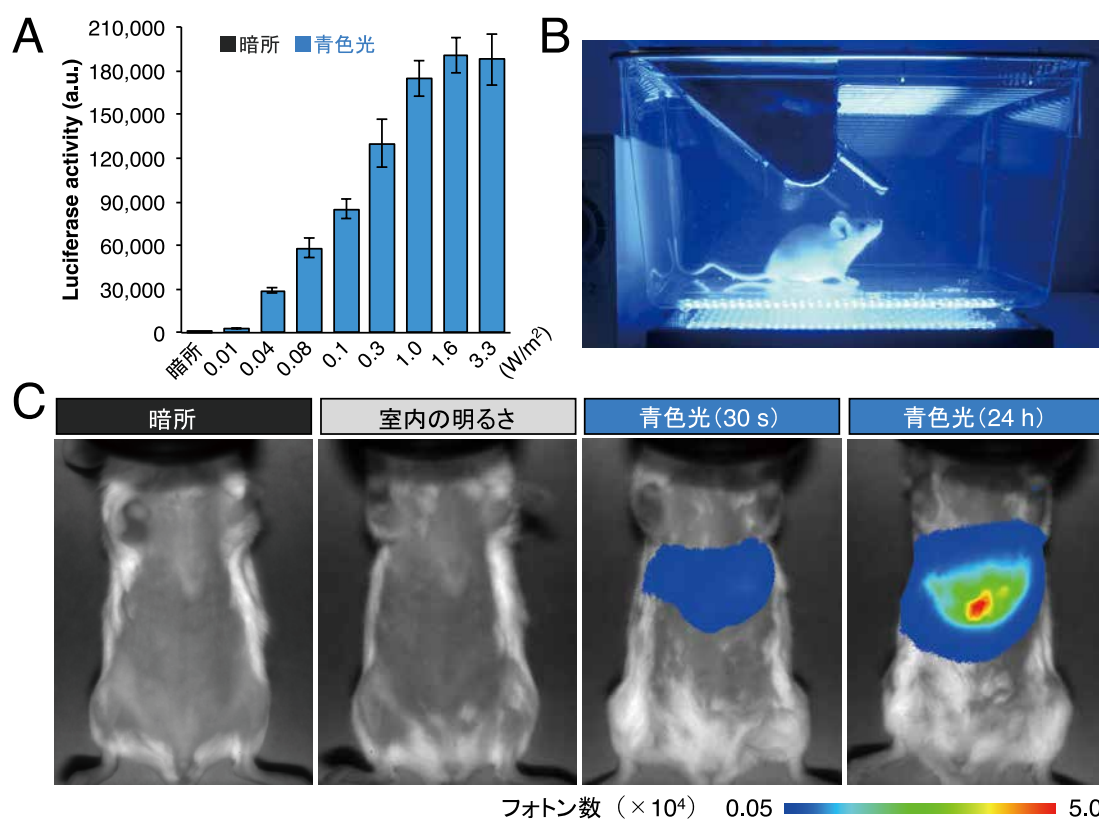


図9 PA-Creを用いて生体深部の遺伝子の働きをコントロール

(A) DNA組換え反応によりルシフェラーゼを発現するレポーターを用いて、PA-CreによるDNA組換え反応の青色光依存性を培養細胞で評価。(B) DNA組換え反応によりルシフェラーゼを発現するレポーターとPA-CreをコードするcDNAをマウスの肝臓に導入した後、LEDを用いてマウスに生体外からの非侵襲的に青色光を照射。(C) 青色光によりマウスの肝臓でDNA組換え反応が誘起されレポーターからルシフェラーゼが発現する様子を可視化。24時間の光照射はもとより、30秒間という短時間の光照射でも肝臓で遺伝子発現が観察された。一方、暗所や室内の明るさでは全くルシフェラーゼの発現は観察されなかった。

ローリングサークル増幅によるRNA直接検出

Directly RNA detection by rolling circle amplification

広島大学大学院 先端物質科学研究科 **高橋 宏和**

Hirokazu Takahashi, PhD (Researcher)
Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University

広島大学大学院 先端物質科学研究科 **堀尾 京平**

Kyouhei Horio (Graduate student)
Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University

(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 **小堀 俊郎**

Toshiro Kobori, PhD (Senior researcher)
Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization

広島大学大学院 先端物質科学研究科 **岡村 好子**

Yoshiko Okamura, PhD (Associate professor)
Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University



キーワード

Rolling circle amplification、phi29 DNA polymerase、RNA detection

01 | はじめに

近年、抗生物質耐性の病原性細菌や、新興または再興の人畜共通感染ウイルスの出現により、迅速診断法やポイントオブケアテスト(POCT)の開発が進められている。これら病原体による被害を最小にし、治療や拡散防止処置、感染経路の特定を円滑に行うためには、まず初めに菌種の同定と病原性および伝染性の有無の確認を迅速かつ正確に行うことが何よりも重要である。これら病原体を特定する技術としては、ルーチンを主とする検査部門(病院等)や食品産業においては、感度が高いこと、ランニングコストが低いことが重視されて、培養法が標準的な分析方法として採用されてきたが、培養可能な菌種に限定され、かつ時間が掛かるという大きな欠点がある。しかし、ウイルスの場合、その多くが培養できないため、短時間かつ高い正確性で病原を特定可能な方法の開発が求められている。

培養法に替わる最も代表的な診断法は、抗原抗体反応を利用したイムノクロマト法だが、検出感度が低く、擬陽性が発生しやすい、微生物の生死判定ができないなどの理由から、必ずしも普及しているという状況では無い。また、PCR法を用いた微生物のDNAやRNAを対象とした分子生物学的測定法は、迅速で正確性や感度に優れている一方で、実施に必要な機材(サーマルサイクラーなど)の導入コストや、増幅産物のキャリーオーバーコンタミネーションなどによる擬陽性を防止するための専用施設(クリーンルーム)の設置やその維持のためのコスト負担が大きい。このため普及の妨げとなっている。

近年は高価なサーマルサイクラーが不要な、等温増幅法に

よる核酸検出、例えばLAMP法が分子生物学的な微生物検出方法として期待されているが、等温とはいえ60-65℃といった比較的高い反応温度が必要であり、かつ、PCRで問題に挙げられているキャリーオーバーコンタミネーションによる擬陽性の問題を克服できていない。そのため、キャリーオーバーコンタミネーションに対して耐性がありつつ、かつ室温程度で反応可能な核酸検出法、特に開発途上の国や地域での使用可能となる方法に注目が集まっている。

我々の研究グループではこれまで主に、Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた全ゲノム増幅法を利用した、微生物1細胞のゲノム解析の研究を行っている¹⁾。その一方で、Phi29 DNA ポリメラーゼのもう一つの主な利用方法である、ローリングサークル増幅(rolling circle amplification; RCA)法による、RNAの直接検出方法の開発も行っている。Phi29 DNA ポリメラーゼを利用したRCA法は、室温程度(25-37℃)において等温反応が可能で、かつ簡便なシステムであることから、新たな核酸配列検出方法として、現在注目と期待が集まっている。本稿では、Phi29 DNA ポリメラーゼを用いたRCA法による、特定の微生物検出方法について概説する。

02 | ローリングサークル増幅(RCA)

まず初めにRCA法について説明しておく。RCA法は1995年にA. Fire(後にRNA干渉に関する研究でノーベル賞を受賞している)らが提唱²⁾した、環状DNAをゲノムとして持つウイルス

やプラスミドDNAの複製を模倣したDNAの合成方法である。環状の1本鎖DNA(ssDNA)を鋳型として、鋳型にハイブリダイズしたプライマーの3'末端を基点にDNAポリメラーゼがDNAを合成していき、環状の鋳型を一周してプライマーの5'末端にDNAポリメラーゼが戻ってきたとき、前方にあるDNA鎖をポリメラーゼが2本鎖DNAを引き剥がしながらDNAを合成する鎖置換(strand displacement)をしながらDNA合成を続け、環状DNAの相補鎖配列がタンデムな状態で並んだ長鎖のssDNAを合成する方法である(図1a)。この反応の鍵はDNAポリメラーゼの鎖置換活性にある。PCRのような反応温度サイクルが不要なので、全て等温で反応可能であり、従って酵素は耐熱性である必然性は無い。

このDNA増幅方法が特に注目され始めたのは、1998年にP. Lizardiら³⁾が5'および3'末端の配列に標的核酸との相補鎖配列を持つ南京錠型のパドロックプローブ(Padlock probe; PLP)を利用したlinear RCA法(これ以降、単にRCAと書いた場合はこのlinear RCAを指す、図1b)、さらにはRCAで合成されたssDNAに対する2種類の増幅用プライマーを加えたHyperbranched-RCA(HRCA)法(図1c)を発表したことによることが大きい。特に、1分子の目的DNA配列の存在をRCA増幅産物(rolling circle product; RCP)として増幅し、蛍光の検出プローブによって可視化したことが発端となっている。この論文以降、検出対象はDNAのみならず、抗原抗体反応のシグナル増幅(immuno-RCA)⁴⁻⁶⁾、生体小分子の有無など多岐にわたっており⁷⁾、特に近年はmiRNAの特異的検出に関する論文が多く、全体の8割以上を占めている。

特筆すべきは、RCA法では初期に投入したサンプルとRCPとの間では、増幅の開始に関わる核酸の3'末端の数は変化しないことである。そのため、PCRやLAMP法とは異なり、例えばキャリーオーバーコンタミネーションを起こしても、次の増幅結果に与える影響は小さいことから、施設整備等の初期投資が少なく済むことが期待されている。またPhi 29 DNA ポリメラーゼを利用したRCA法は、室温程度(25-37℃)の等温反応である

ことを鑑みて、迅速診断システムの構築に適していると考えられている。

余談ではあるが、P. Lizardiらの開発したHRCA法の増幅メカニズムは、その後R. Laskenらのグループにより、ランダムプライマーを利用した非特異的増幅法であるmultiply-primed RCA (MPRCA)⁸⁾法に発展していった。この増幅方法は、操作手順が非常に簡便で、かつPhi29 DNA ポリメラーゼの高い正確性のため増幅配列にエラーがほとんど含まれないことなどから、サンガーシーケンス用の鋳型調整方法として世界のシーケンス解析拠点で重用されていた。さらに、MPRCA法はランダムプライマーを利用するため対象配列がほとんど不明でも増幅可能なことから、未知の環状DNAゲノムのウイルス検出等に利用されている⁹⁾。また、大腸菌等の宿主経路ではクローニングが難しい配列の*in vitro* cloning¹⁰⁻¹¹⁾や、さらには近年話題の合成生物のゲノム構築にも利用されている¹²⁾。

また、HRCA法の増幅システムはさらにその後、例えばヒトゲノムの様な直鎖状ゲノムでも全ゲノム増幅が可能であるMultiple displacement amplification (MDA)法¹³⁾へと発展しており、現在最も信頼度の高く、また使用頻度の高い方法となっている。

03 | RCAでの微生物mRNA直接検出

RCA法を利用したウイルスや微生物の検出は、多少煩雑な手順を踏むが、検出対象のDNA配列に対するPLP¹⁴⁾を利用した方法が報告されていた。しかしながら、DNAを検出対象とした場合、微生物の生死判定はできず、またRNAを検出対象とした場合には、一度逆転写反応が必須となる。一方、Phi29 DNA ポリメラーゼはDNAだけでなくRNAも、プライマーとしてDNA合成に利用できる。そのため、検出対象をDNAからRNAに代替することは理論上可能である。しかし、RNAとPLPがハイブリ

ダイズを形成(RNA/PLP)しても、既存のT4 DNAリガーゼ(T4Dnl)でPLPのシール(プローブの末端を結合して環状化)を試みたとき、DNAのそれと比べシール効率が著しく悪化することが他の研究報告から解っていた¹⁵⁾。そのため、RNAは逆転写を経てcDNAに変換されて、従来法が適用されていた。

そこで我々はRNA検出用プローブをPLPから変更し、予め環状化させたDNAプローブを用いることを検討した。予めプローブを環状化しておけば、RNA/PLPシール効率は無視できるためである。しかしそれまでのDNAの環状化は、PLPをシール用のオリゴDNAとハイブリダイズさせた後、T4Dnlでシールし、その後シール用オリゴDNAをエクソヌクレアー

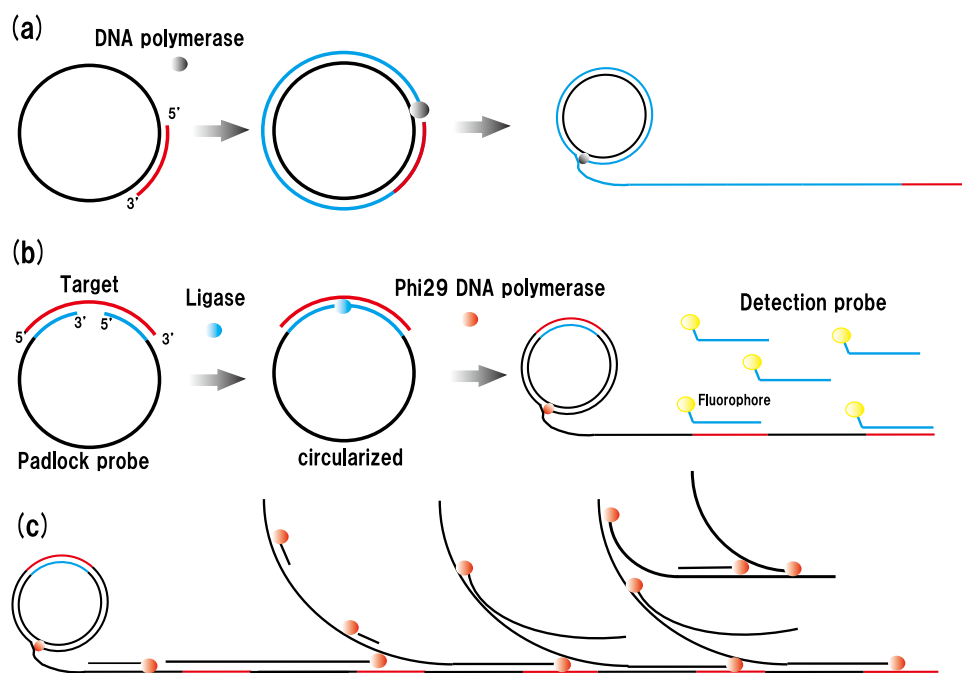


図1 Rolling circle amplification (RCA)
(a) RCAの基本的な増幅システム
(b) パドロックプローブ(padlock probe; PLP)を用いたlinear RCA
(c) Hyperbranched-RCA(HRCA)の増幅模式図

ぜ等で除いていたが、除去が完全では無く、残存したシール用オリゴDNAそのものがノイズの原因と考えられるシグナルノイズ比(SN比)の悪化が問題視されていた。しかし我々は、直接オリゴDNAを環状化できるCircLigaseを利用して、環状化DNAプローブを作成することとした。CircLigaseを用いて事前に目的のオリゴDNAプローブを環状化しておき、未反応(すなわち直鎖状)のオリゴDNAは、直鎖状DNAのみを分解するExonuclease I等で処理して予め除くことで、SN比の向上を試みた。そして、この環状化DNAプローブと、標的微生物が発現しているmRNAの3'末端を利用して、RCA反応を起こさせるRNA-primed RCA(RPRCA)法として確立した(図2)¹⁶⁾。原

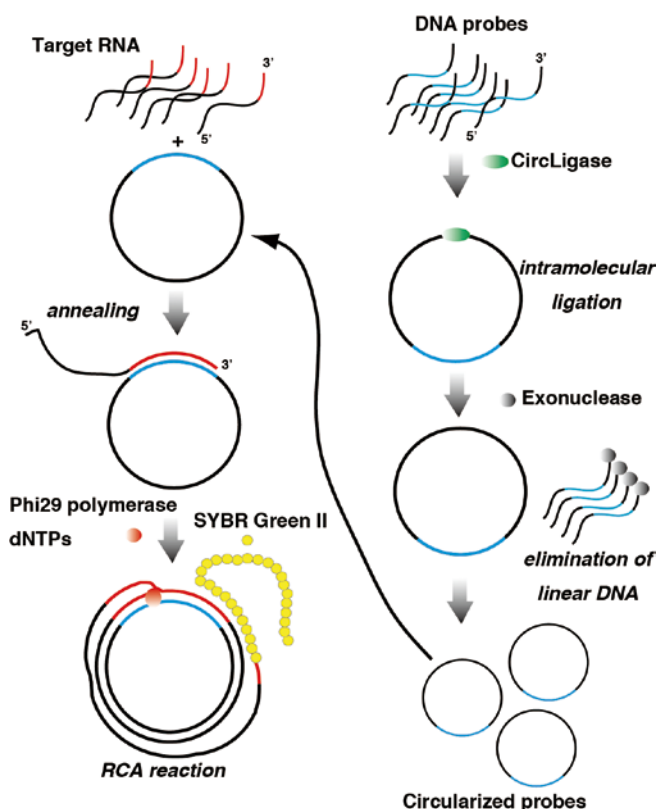


図2 RNA-primed RCA(RPRCA)による微生物mRNA検出法の模式図

核微生物のmRNAの3'末端には、真核生物のmRNAのようなpoly(A)テールが存在しないため、個々のmRNAの区別に利用でき、mRNAそのものを直接RCA法におけるDNA合成開始のプライマーとして利用出来ると考えたからだ。

このシステムで、mRNAを特異的に検出可能かどうかを、蛍光タンパク質GFPを発現している大腸菌を用いて確認した。ネガティブコントロールとしては、GFP発現用のプラスミドを保持しているが、GFP mRNAは発現していない菌体を用いた。その結果、本システムはGFP mRNAのみを特異的に検出できることが確認された¹⁶⁾。

このシステムはこれまでのRNA検出システムとは異なり逆転写反応の必要が無く、またRT-PCR等では必須であったRNA抽出時のDNase処理も必要がなく、それまでのRNA検出法に比べ、RNA抽出時や検出時の操作が簡便であることが特色である。しかしながら、検出感度は1反応あたり10³コピーと、PCRやLAMP法と比べるとかなり見劣りすることも確認されたが、この検出感度の詳細については後述することとする。

04 | RPRCA法の実施における問題点

RPRCA法が微生物のmRNA検出に有効であることが確認されたが、実際に病原性微生物等を検出するに当たっては問題があることが、それ以降の検討で次第に明らかにもなった。その問題とは、第一に微生物mRNAの3'末端配列の情報が極端に少ないこと、第二にゲノム配列情報からの3'末端配列の予測、すなわち転写終結の予測にブレが大きいことである。次世代シーケンサー(NGS)の登場により、微生物でも多数のRNAseqと呼ばれるmRNA配列解析が行われているが、真核生物とは異なり、mRNA配列にpoly(A)配列を持たないため、逆転写反応はランダムプライマーで行われている。その結果、RNAseq解析のデータからは、微生物mRNAの3'末端配列が欠損することとなる。従って、膨大な数のRNAseq解析データがあるにも拘わらず、この情報はRPRCA反応には全く利用できない。

さらに、対象微生物の全ゲノム情報が公開され、mRNA中のタンパク質のコーディング配列は記載されているが、転写終結配列がどこであるかは記載されることは無い。実際、微生物mRNAの転写終結に関わる配列、特に大腸菌で転写終結のシステムとして提唱されている、20 nt程度の逆方向反復配列(inverted repeats)や、転写終結に関わるρ因子の結合部位(rho loading site)を予測していく予備実験を行ったが、あまり研究が進んでいない分野であり十分な精度で予測ができず、全く使えない可能性が推察された。

また多少予測がズれていても、Phi29 DNAポリメラーゼは3'-5'リボエキソヌクレアーゼ活性を持つとされ、その相補鎖形成していない余りの部分を分解してRPRCA反応が進むことを期待していたが、我々の研究室のみならず他の研究グループもこの活性は全く確認できず¹⁷⁾、予測が間違っていてRPRCA反応が開始しないのか、mRNAが無いから動かないのかの区別が全く付かなくなってしまった。以上のことから、微生物のmRNAを検出対象としても、検出できるのは転写終結配列の解析まで明らかとなっている極僅かなmRNAに限られてしまうこととなり、汎用性が低いことが明らかとなった。

05 | RNase H-assisted RCAによるRNA直接検出法の汎用化

1) RNase H-assisted RCA

そこで我々は、対象RNA配列の位置情報に依存すること無く、プローブをmRNA上に任意に設定できるようにRPRCA反応システムを見直すこととした。もし任意にプローブ位置を設定できれば、mRNA分子内部配列のRNAseqデータも、また真核生物のように末端配列にpoly(A)配列があっても全て検出対象として利用できることとなる。

ここで我々は、環状DNAプローブとハイブリダイズしたRNAの内部配列をRNase Hで切断、ニックを入れることにより強制的に3'末端を作成し、この3'末端からDNA合成を開始させることを思いついた。手始めに*in vitro*転写によって作成したGFP mRNAの内部配列に対してプローブを設計し、環状DNAプローブを作成、RNase H存在下・非存在下でRCA反応

が起こるかどうか確認した。その結果、予想通りに任意の配列上にプローブを設定でき、かつRCPが確認できた¹⁸⁾。

しかしRNAサンプルをGFP mRNAを発現した大腸菌の全RNAに変更したところ、GFPの発現の有無に関係なくRCPが確認されてしまった。これは環状DNAプローブにミスマッチハイブリダイズを起こした他のRNAに対してもRNase Hがニックを作り、そこからDNA合成が開始されRCA反応が起きているものと予想されたため、環状プローブの配列等を色々変更してみたが、結果は全く改善されなかった。

そこで、環状化プローブの使用は諦めて、PLPを利用したRCA法に切り替え、新たにRNase H-assisted RCA (RHa-RCA)法¹⁹⁾として確立することとした。標的RNAとハイブリダイズしたPLPのみ環状化すれば、例えばPLPに非対象のRNAがハイブリダイズしRNase Hによってニックが形成されても、RCA反応による永続するDNA合成は起こらないはずである(図3a)。

2) リガーゼの検討

この方法を用いるに当たって問題なのは、前述の通りT4Dnlではシール効率がRNA/PLPを対象とした場合に低いことにある。そこで、当時新たにNew England Biolabs社から販売が開始され、RNA/PLPも環状化可能であると推測されたSplintRリガーゼ (SplintR) を利用して、PLPの環状化を行い、T4Dnlと比較することとした。また同時に、他の論文でRNA/PLPをシールできる能力があると報告のあった、T4 RNAリガーゼ2 (T4Rnl2)²⁰⁾も比較対象として検討した。その結果、SplintRのみが効率良くRNA/PLPでもPLPの環状化が可能であり、反応液中のATP濃度にも依存しなかった(図3c)。また、T4DnlはATP

濃度が10 μ Mの時に僅かにPLPを環状化することができたが、ATP濃度が高くなると、全くシールすることができず、これについては既報通りであった。一方で、T4Rnl2は、いずれのATP濃度においてもPLPを環状化することができず、これは複数のリガーゼの基質特異性を比較した既報¹⁵⁾と同じ結果であり、RCA反応にT4Rnl2が利用できるとした既報とは真逆の結果であった。この結果から、我々のRNA検出用のRCAの反応にはSplintRを利用することとした。

3) プローブの設定箇所の検討

次に、PLPの設定箇所がmRNA上の位置によって、そのシール効率に影響を与えるかどうかを検討した。Circligaseを利用してプローブを予め環状化した場合には、プローブのmRNA上の位置は基本的に環状化効率に影響を与えない。しかし、PLPの設定位置により、例えばRNAの二次構造によるハイブリダイズの効率や、RNA配列そのものがシール効率に大きく影響を与えるようであれば、任意の配列をプローブとしては設定できないことになる。

そこで、GFP mRNAの内部配列中にプローブを5箇所設定し、環状化効率を確認した。その結果、環状化効率に若干の差はあるものの、どの位置のプローブも環状化することが可能であり(図3b, d)、RNase Hの添加によりRCPが生成されることが確認された。今回の結果から、例えばRNAseqのデータのように、mRNAの配列の一部しかない無い情報からでも、基本的にはRHa-RCA用のPLPを設計することが可能であることが示唆された。

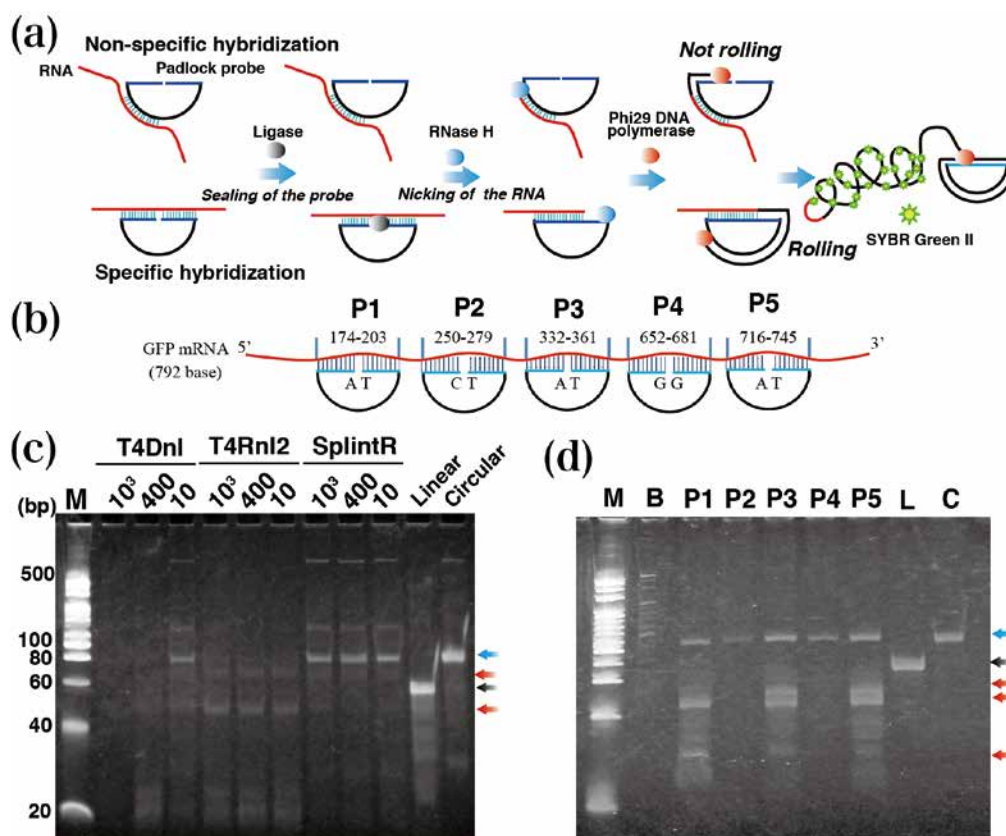


図3
(a) RHa-RCAによるRNAの検出模式図
(b) 設定したP1-P5 プローブの、GFP mRNA上の位置、および5'末端と3'末端の塩基
(c) ライゲースの環状化効率の比較。各レーン上の数字はATP濃度を示す。Linearは未反応のオリゴヌクレオチド、CircularはCircligaseで環状化したssDNAコントロール。Mはサイズマーカー。黒矢印は直鎖状ssDNA、青矢印は環状化ssDNA、赤矢印はヌクレアーゼ処理による破片。
(d) 各プローブの環状化効率の比較。Lは未反応のオリゴヌクレオチド、CはCircligaseで環状化したssDNAコントロール。Mはサイズマーカー。黒矢印は直鎖状ssDNA、青矢印は環状化ssDNA、赤矢印はヌクレアーゼ処理による破片。

4) RNase Hの濃度の検討

次に、RNase H濃度が濃すぎると、PLPにハイブリダイズしたRNAが全て分解されてしまい、DNA合成が開始できない恐れがあったため、至適なRNase H濃度を決定することを試みた。PLPとしてはGFP mRNAで設定したP4プローブを用い、RNase H濃度を変え、最終的なRCP量で比較した。

その結果、おおよそRCA一反応当たり0.06~0.3 unitsが至適であり、0.6 units以上の時は予想通りRNAの分解のためにRCP量が減少することも確認された。

4) 検出限界の算定

次に、RHa-RCA法の検出限界を、大腸菌から抽出した全RNAに、*in vitro*転写した濃度が既知のGFP mRNAを加えて検討した。また、本RHa-RCA法が、RPRCA法で用いた環状DNAプローブとは異なり、対象mRNA以外のRNAやDNAの影響を受けないことを、GFP mRNAを加えていない全RNAを用いて確認した。

その結果、検出限界は設定したPLPによって多少異なるものの、概ね1~5 fmol、おおよそ1反応当たり 10^9 コピーあることから、以前のRPRCA法と比べて遜色が無いことが確認された(図4a)。また、GFP mRNAを添加していない全RNAからは、一切のRCPが検出されていないことから、GFP mRNAのみを特異的に検出していることが確認された。

さらに実際にGFP遺伝子をプラスミドの形で保有している大腸菌を用いて、GFP mRNAを誘導、および非誘導の状態で培養後に全RNAを抽出し、RHa-RCA法によりGFP mRNAの検出を試みた。その結果、GFPを誘導した大腸菌のRNAからのみ、

RCPが確認され、おおよそ10~20 ngの極微量のRNAからでも特異的に検出できることが確認された(図4b)。また、GFPを誘導していない大腸菌のRNAからは、一切のRCPが検出されていないことから、GFP mRNAのみを特異的に検出していることが確認された。

06 | RCA法の検出限界について

RPRCAも今回開発したRHa-RCAも共に検出限界が、おおよそ 10^9 copies/反応であり、PCRやLAMP法には遠く及ばない。しかしこれは、RCA法の検出限界では無く、実際の所は、検出に使用するSYBR Green IIの検出限界によるところが大きい。

RCA反応で合成されるDNAは、既存のPCR等のDNA増幅方法とは異なり、指数関数的な増幅を示さない。基本的に、1つの環状DNAプローブから作成されるssDNAは、DNA合成酵素の[合成速度]×[時間]で決定されている。Phi29 DNAポリメラーゼの合成速度は~200 nt/secであると推測されており、市販されているDNA合成酵素の中でも非常に早い。しかし、例えば200 nt/secでも、2時間のRCA反応で合成できるssDNAは1個のRCP当たり 1.44×10^6 baseであり、重さとしては僅か約1.4 fgにすぎない。SYBR Green IIの検出限界は電気泳動のバンドで約2 ng程度であり、RCPが拡散した液中での検出感度はそれより劣ることが容易に推測される。従って、SYBR Green IIを使った場合の検出感度は、どう頑張っても $10^6 \sim 10^7$ copies/反応を超えることができないものと推測される。

現在、*in vitro*のRCA法の検出系では、様々な方法で極微量のRCPを検出する方法が多数報告されており、検出システムに工夫を行えば、RCA法はより高感度化が可能であると考えている。

07 | *in situ* RHa-RCAによる微生物検出

一方で前述のように、RCA法は1分子のRCPを可視化するために注目を浴びたと記述したが、これは主に蛍光顕微鏡下などでの観察によるものである。実際*in situ*でRCA反応を行い、RCPを検出用蛍光プローブで検出する系では、ゲノム中の1分子のDNA配列やmRNAなどを可視化している報告が既に複数ある¹⁷⁾。RCPIは*in situ*の検出において、PCR産物のように拡散しにくく、またRCPIはPLPの相同配列のタンデムリピートであり、70 baseのPLPの場合、PCRは2時間の反応で約2万回もの繰り返し配列となっており、蛍光プローブで検出するのに適した状態となっている。

そこで、今回開発したRHa-RCA法を大腸菌内で発現しているGFP mRNAの検出に適用可能かどうか試してみた。その結果、GFPを誘導した大腸菌内でスポット状に蛍光シグナルが観察された(図5)。また、非誘導の大腸菌ではシグナルが全く確認できない。従って、例えば検出対象の配列をDNAとして保持していても、蛍光シグナルは観察されないことから、RHa-RCAはRNAのみを特異的に検出していることが明らかとなった。大腸菌内の蛍光シグナルがスポット状に観察されたことから、これ

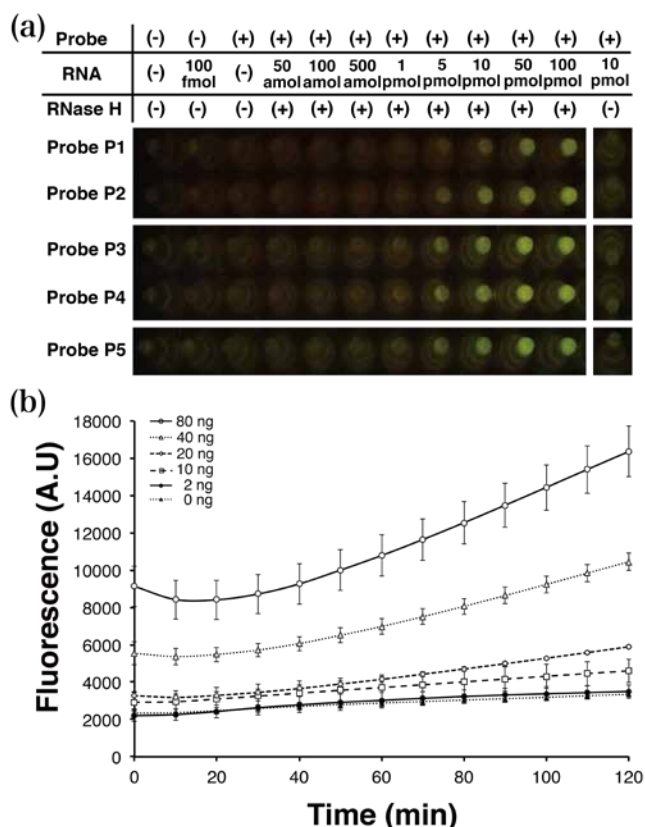


図4 RHa-RCAによるGFP mRNAの検出

(a) *In vitro* 転写したmRNAを用いた各プローブの検出感度の検定。反応が終了したPCRプレートに青色光を当て、SYBR Green IIを可視化している。

(b) 大腸菌全RNAを用いたGFP mRNAのリアルタイム検出。

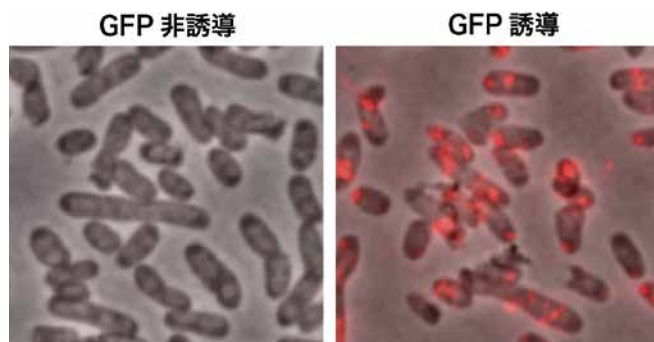


図5 RHa-RCAによる大腸菌で発現しているGFP mRNAの*in situ*検出
RHa-RCA後に、Alexa-568で標識したオリゴヌクレオチドでRCPを検出。明視野像と蛍光像をマージして示している。

までの*in situ* RCAの報告を踏まえれば、これら一つ一つのスポットシグナルが、それぞれ一つ一つのmRNA由来である可能性がある。しかし、我々の保有している顕微鏡の解像度では、それぞれのスポット数を計測することは、大腸菌の細胞が小さすぎるため残念ながら難しい。細胞の大きさがもっと大きい真核生物のmRNAを検出した場合、これらの個々のシグナルが、1分子のmRNAに対応しているかどうかは明らかになるものと思われる。

1分子のmRNAに1分子の蛍光標識プローブでラベルを行っても十分なシグナルが得られない為、これまでの微生物でのFluorescence *in situ* hybridization (FISH)は、主に細胞内で分子数の多い16S rRNAを対象とすることが一般的であった。しかし、16S rRNAを対象とした場合には菌種が解るのみである。これまでに、微生物のみならずmRNAを対象としたFISH法では、検出プローブをHorseradish peroxidase (HRP) でラベルし、シグナル増幅を行う方法が開発されてきたが、これらの方法はシグナルそのものが細胞内に拡散しやすく、少なくともmRNAの定量性は無かった。定量性を持たせるために開発された、single molecule FISH (smFISH)法²¹⁾は、1種類のmRNAに対し50以上の相補鎖配列で、かつ同一蛍光標識プローブでFISHを行うことにより、1分子のmRNAに多数の蛍光標識をハイブリダイズさせることで実現可能となったが、プローブ作成のコストが高い。

今回我々が開発している、*in situ* RHa-RCAとFISHの組み合わせは、簡便でありながら、コストはsmFISHに比べて格段に低く、未だ詳細な検討が必要な部分は残っているものの、smFISH並みにmRNAの定量ができる可能性がある。

08 | おわりに

現状の*in vitro*のRHa-RCA法では、未だ検出レベルが、PCRやLAMP法に比べ使用に耐えうるものではないが、検出方法に何らかのアイデアが加われば、理論的には1分子の対象RNA配列の検出が行えると期待している。また、*in situ* RHa-RCAであれば、1細胞レベルでmRNA配列を指標に微生物を特定可能であり、培養やRNA抽出を行わずに病原微生物やRNAウイルスを、比較的簡便に検出することが可能であると考えている。

細胞内でのmRNAの検出・定量化は、遺伝子発現の正しい理解には必須である。近年環境から、特に腸内細菌叢や土壌細菌叢などの、「培養できない微生物」を含む細菌叢において、メタ

ゲノム解析や、RNAseqが行われている。しかし、これらの手法では菌叢全体の大まかな情報は得られるが、各々の微生物の役割を明らかにすることは難しい。今回我々が開発した、*in situ* RHa-RCAによる微生物mRNAを可視化し、かつ定量化まで行うことができれば、菌叢において「誰が何をやっているか?」が解明できるかもしれないと期待している。

本研究は、JST戦略的創造研究推進事業 チーム型研究 (CREST)、「藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」、およびJST・A-STEPの支援によって実施した。

参考文献

- 1) 高橋宏和, 岡村好子, 小堀俊郎, THE CHEMICAL TIMES **238**, 22-27 (2015).
- 2) A. Fire, S. Q. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**(10), 4641-4645 (1995).
- 3) P. M. Lizardi, X. Huang, Z. Zhu, P. Bray-Ward, D. C. Thomas, D. C. Ward, *Nat. Genet.* **19**(3), 225-232 (1998).
- 4) B. Schweitzer, S. Wiltshire, J. Lambert, S. O'Malley, K. Kukanskis, Z. Zhu, S. F. Kingsmore, P. M. Lizardi, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**(18), 10113-10119 (2000).
- 5) Y. Gusev, J. Sparkowski, A. Raghunathan, H. Ferguson Jr., J. Montano, N. Bogdan, B. Schweitzer, S. Wiltshire, S. F. Kingsmore, W. Maltzman, V. Wheeler, *Am. J. Pathol.* **159**(1), 63-69 (2001).
- 6) T. Kobori, A. Matsumoto, H. Takahashi, S. Sugiyama, *Anal. Sci.* **25**(12), 1381-1383 (2009).
- 7) M. Stougaard, S. Juul, F. F. Andersen, B. R. Knudsen, *Integr. Biol. (Camb)* **3**(10), 982-992 (2011).
- 8) F. B. Dean, J. R. Nelson, T. L. Giesler, R. S. Lasken, *Genome Res.* **11**(6), 1095-1099 (2001).
- 9) A. Rector, R. Tachezy, M. Van Ranst, *J. Virol.* **78**(10), 4993-4998 (2004).
- 10) C. A. Hutchison, 3rd, H. O. Smith, C. Pfannkuch and J. C. Venter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**(48), 17332-17336 (2005).
- 11) H. Takahashi, K. Yamamoto, T. Ohtani, S. Sugiyama, *BioTechniques*, **47**(1), 609-615 (2009).
- 12) C. A. Hutchison, R.-Y. Chuang, V. N. Noskov, N. Assad-Garcia, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, J. Gill, K. Kannan, B. J. Karas, L. Ma, J. F. Pelletier, Z.-Q. Qi, R. A. Richter, E. A. Strychalski, L. Sun, Y. Suzuki, B. Tsvetanova, K. S. Wise, H. O. Smith, J. I. Glass, C. Merryman, D. G. Gibson, J. C. Venter, *Science*, **351**(6280), aad6253 (2016).
- 13) F. B. Dean, S. Hosono, L. Fang, X. Wu, A. F. Faruqi, P. Bray-Ward, Z. Sun, Q. Zong, Y. Du, J. Du, M. Driscoll, W. Song, S. F. Kingsmore, M. Egholm, R. S. Lasken, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**(8), 5261-5266 (2002).
- 14) J. Banér, M. Nilsson, M. Mendel-Hartvig, U. Landegren, *Nucleic Acids Res.* **26**(22), 5073-5078 (1998).
- 15) D. R. Bullard, R. P. Bowater, *Biochem. J.* **398**(Pt1), 135-144 (2006).
- 16) H. Takahashi, A. Matsumoto, S. Sugiyama, T. Kobori, *Anal. Biochem.* **401**(2), 242-249 (2010).
- 17) C. Larsson, I. Grundberg, O. Söderberg, M. Nilsson, *Nat. Methods* **7**, 395-397 (2010).
- 18) T. Kobori, H. Takahashi, *Anal. Sci.* **30**(1), 59-64 (2014).
- 19) H. Takahashi, M. Ohkawachi, K. Horio, T. Kobori, T. Aki, Y. Matsumura, Y. Nakashimada, Y. Okamura, *Sci. Rep.* **8**, 7770 (2018).
- 20) Y. Cheng, X. Zhang, Z. Li, X. Jiao, Y. Wang, Y. Zhang, *Angew. Chem. Weinheim Bergstr. Ger.* **121**(18), 3318-3322 (2009).
- 21) A. Raj, P. van den Bogaard, S. A. Rifkin, A. van Oudenaarden, S. Tyagi, *Nat. Methods*, **5**(10), 877-879 (2008).

次世代型核酸医薬の創製: マイクロRNAの化学修飾と創薬への展開

Creation of new-type nucleic acid medicine:
Chemical modification of microRNA and development to drug discovery

愛知工業大学 工学部応用化学学科 教授／株式会社 e-NA Biotec 代表取締役 **北出 幸夫**

Yukio Kitade (Professor / Representative Director)
Aichi Institute of Technology / e-NA Biotec Inc.



キーワード

マイクロRNA医薬、次世代抗がん薬、補充療法、RNA干渉、ノックダウン効果

RNAウイルスなど一部を除き、地球上のほぼ全ての生物はDNAに遺伝情報を保存している。この遺伝情報は、RNAを介してタンパク質へ伝達され、タンパク質が生命維持の中心的な役割を果たすと考えられる。この考えは、1958年にF. Crick によってセントラルドグマ(図1)と提唱された¹⁾。

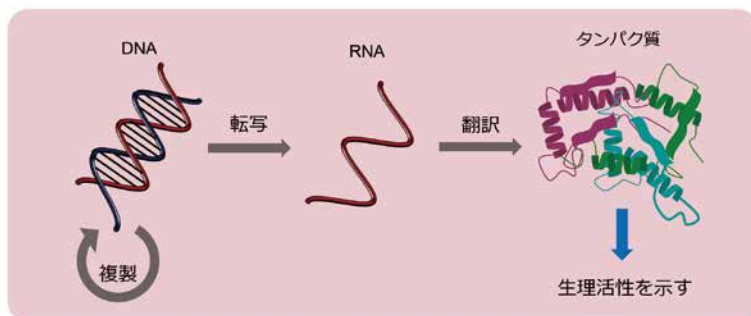


図1 セントラルドグマ

1990年には、ヒトの遺伝情報を全て読解しようとする、ヒト・ゲノムプロジェクトが開始された。このプロジェクトは2003年に終了したが、ヒトの遺伝子数は予想に反して少なく約22,000であった。これは、ヒトゲノムの僅か2%であり、残りの98%は不要なnon-coding領域と考えられた。しかし、近年のRNA研究により、non-coding領域の大部分の

DNAは、実際にはRNAに転写され、生成したnon-coding RNA (ncRNA) が多様な機能を示すことが分かってきた²⁾。その後、ncRNA研究は飛躍的に進み、次々と新しい生命現象が解明されてきた。ncRNAには、タンパク質の翻訳工場であるリボソームを構成するリボソームRNA (rRNA)、タンパク質の翻訳に必要なアミノ酸をリボソームに運搬するための転移RNA (tRNA)、核内低分子RNA (発生や分化に関与するmicroRNA (miRNA)) などが含まれる。

二本鎖RNAに由来するRNA干渉 (RNA interference; RNAi) は、1998年にA. FireとC. Melloらによって発見され、彼らは2006年にノーベル生理学・医学賞を受賞している。RNA干渉は、生体内遺伝子の発現抑制機構として重要な働きをし、mRNAの遺伝子発現を抑制する(図2.)^{3), 4)}。siRNAをはじめとする短鎖二本鎖RNAは、RNA干渉 (RNAi) によって配列特異的に標的のmRNAに作用し、遺伝子の発現を抑制することから、がんなどの難治性疾患の治療薬としての応用が期待される。RNA干渉を利用した核酸医薬は、疾患に関わるタンパク質を標的とする抗体医薬とは異なり、mRNAを標的とする。そのため、疾患遺伝子の配列さえ分かれば、容易に遺伝子制御分子を設計す

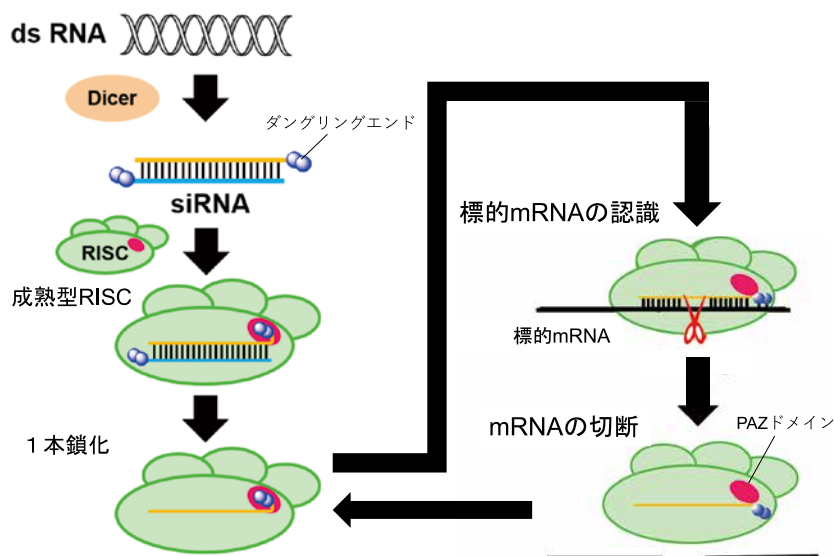


図2 RNA干渉機構とPAZドメインはダングリングエンド部分を放出

ることができると考えられ、抗体医薬の次に来る新たな革新的医薬として注目されている。細胞に取り込まれた長鎖二本鎖RNA(dsRNA)はDicer1によって切断されてsiRNAとなる。siRNAはRNA誘導型サイレンシング複合体(RISC)を構成するArgonaute2(Ago2)タンパクに取り込まれ、一本鎖化し、成熟化RISCを形成する。その後、成熟化RISCは標的mRNAと二本鎖を形成し、標的mRNAを切断することで遺伝子発現を抑制する。

RISCの主要構成タンパク質であるAgo2タンパクは4つのドメインから構成され、5'-末端はMIDドメインとPIWIドメインの境界で認識、固定化されている(図3)。3'-末端に位置するダングリングエンド部はPAZドメインで固定化されている。固定されたアンチセンス鎖が標的mRNA(Target mRNA)を認識した後、PAZドメインはダングリングエンド部分を放出することで、アンチセンス鎖は標的mRNAと完全相補的に結合し、mRNA鎖の切断が起こる(図2)。切断されたmRNA鎖が排出された後、ダングリングエンド部は再びPAZドメインの疎水性アミノ酸から形成されているポケットに固定化され(図2)、新たなmRNAを取り込むことで、mRNAが切断され遺伝子発現抑制が繰り返し起こる⁵⁾。この様にRNA干渉機構の中で、siRNAのダングリングエンド部が遺伝子発現に重大な関与をすることが示唆されたため、著者らの研究室ではダングリングエンド部に着目したRNA分子の新規化学修飾法の開発研究を行ってきた。

Dicerは、二本鎖RNAを約21-23塩基のsiRNAに分解するRNaseⅢファミリーのエンドヌクレアーゼである。ヒトや線虫では1種類であるが、ショウジョウバエには2種類存在し、それぞれDicer1、Dicer2と呼ばれている。ショウジョウ

バエにおいて、siRNA二本鎖の切断にはDicer2が関与しており、Dicer1は関与しないことが分かっている。Dicer1はもう一つのRNA干渉経路であるmiRNA機構において、Pri-miRNAからDrosha(Dicerと同様RNaseⅢ活性を有する)によって変換され、ステムとヘアピンループ構造を有するPre-miRNAを成熟型miRNAへと変換することが示されている(図4)。

ヒトにはAgo1-Ago4までの4種のArgonauteタンパクが存在する。その中でAgo2のみが切断活性を有しており、Ago2以外はその活性中心のアミノ酸が保存されておらず、切断活性を消失している。ArgonauteタンパクのRNA切断は、siRNAアンチセンス鎖の10塩基目と11塩基目の間で正確に標的mRNAを切断する。X線結晶構造解析によりPIWIドメイン近傍にあるリン酸結合ポケットにガイド鎖の5'-末端のリン酸基が固定されており、そこからPIWIドメインの切断活性中心までの距離によって、切断位置が決定されていると考えられている(図3. A)。

22塩基程度の機能性短鎖RNAであるmiRNAをコードする遺伝子は様々な生物種のゲノム中に多数存在し、発現は時期や組織特異的に制御されている。miRNAがヒトを含む多くの生物種に存在することが明らかにされたことでmiRNA研究が急速に進展してきた。そしてmiRNAは、線虫の他にショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウス、植物など様々な生物種における遺伝子の発現制御に重要であることが明らかとなった。特定の標的mRNAの翻訳を3'-非翻訳領域(3'-UTR)にmiRNAが結合することで抑制する遺伝子発現調節因子として認識されている(図3. Bと 図4)。miRNAの標的mRNAの認識に関して、ガイド鎖3'-末端側のミス

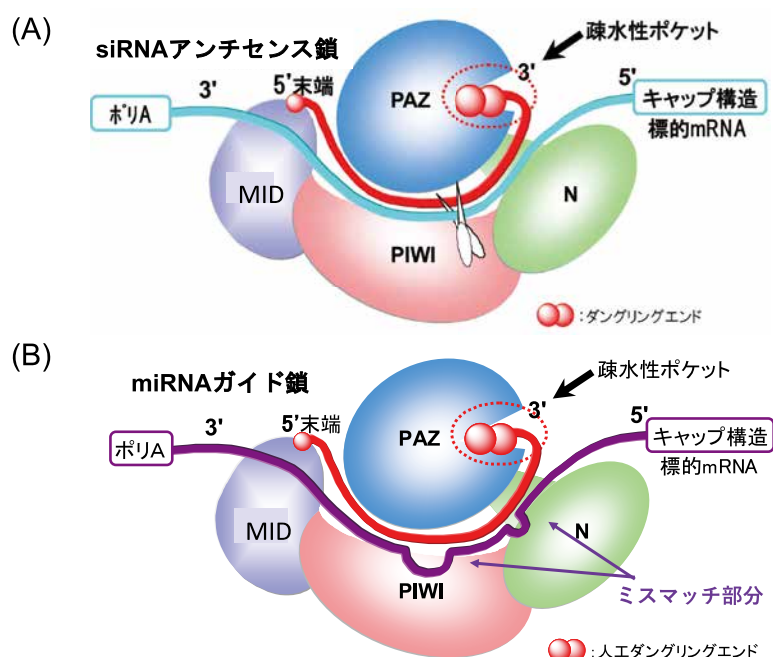


図3 siRNAや、miRNAとmRNAとの複合体

(A) siRNAとmRNAの複合体、(B) miRNAとmRNAの複合体。ミスマッチ部分を含む。

マッチよりも5'-末端側のミスマッチの方が抑制活性に大きく影響を与えると報告されている。また、RNAiで標的の識別に重要な役割をするのは、22塩基程度のmiRNAのうち5'-末端から数えて2番目から8番目までの7塩基であることも明らかとなっている。この領域はシード領域と呼ばれ、9番目以降の塩基も標的の選択に関わるがそれほど重要ではないとされている。このことから、1つのmiRNAは複数のmRNAを認識するとされている。さらに、標的mRNAは比較的長い3'-非翻訳領域を持たため、1つのmRNAが複数のmiRNAによって制御を受ける可能性もあると考えられている。

PAZドメインは疎水性アミノ酸残基からなるポケットが存在し、アンチセンス鎖(ガイド鎖)の3'-末端ダンanglingグエンド部を認識する(図3)。一方、Tuschlらは、3'-末端2塩基突

出部位であるダンanglingグエンド部にデオキシチミジン残基を二つ導入したDNA修飾型(TT) siRNAが天然型siRNAと比べて強いノックダウン効果を示すと報告している^{6), 7)}。(図5. A) 本修飾はmiRNAにも有効と考えられるが、miRNAの臨床展開には、siRNAの場合と同様、i) 核酸分解酵素耐性、ii) 標的細胞への効率的な輸送システム、iii) オフターゲット効果の回避、などの克服が重要である。

そこで先ず我々は、一つ目の課題である、核酸分解酵素耐性の増強に取り組んだ。様々な置換基をRNA3'-末端に導入し、先ず結合活性やノックダウン効果への影響について詳細な検討を加えた(図5. B, C)。ヌクレアーゼによる分解耐性の向上を期待してヌクレオシド部を芳香族化合物であるベンゼン誘導体やピリジン誘導体に置換したRNA誘導体を

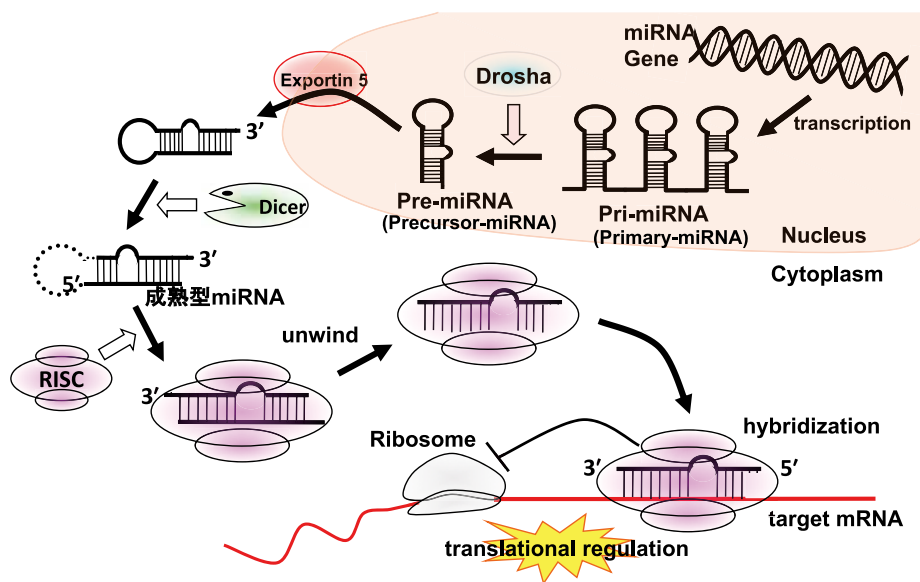


図4 miRNAのRNA干渉機構

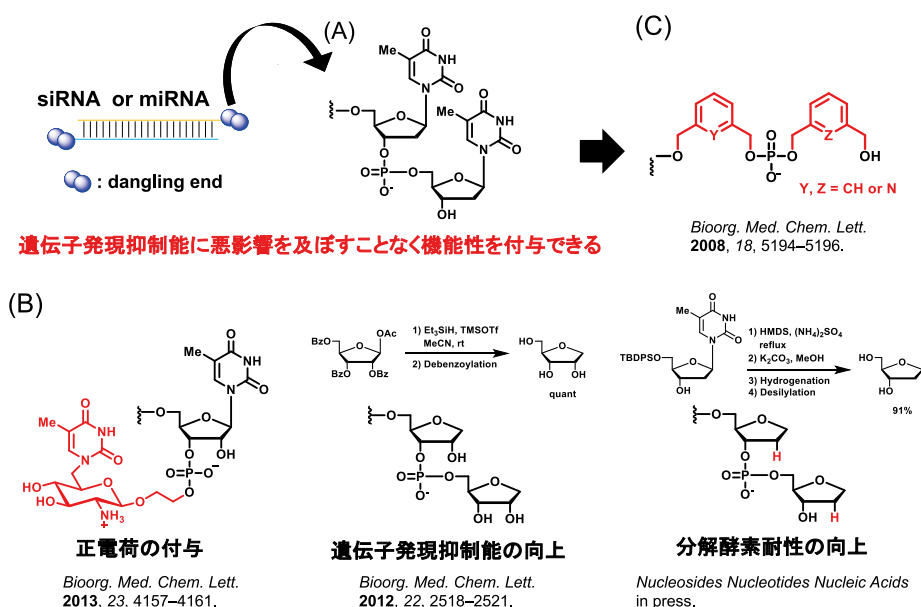


図5 ダンanglingグエンド部の様々な化学修飾

開発した⁹⁾。PAZドメインとダングリグエンド部との結合能は、ヒト遺伝子組換えPAZドメインを作成し、RNAを持たないダングリグエンド部のみとの結合能を等温滴定カロリーメータ (ITC) にて評価するシステムを立ち上げた⁹⁾。チミジン糖部をベンゼン骨格に置換したアナログや、ベンゼン誘導体やピリジン誘導体を連結した、核酸塩基部を持たないシンプルなアナログも開発した (図5. C)。これらも、未修飾型チミジンと比較したところ、ITCの解析結果からほぼ同等の結合活性を示した。この様に核酸塩基をもたない疎水性の置換基を導入しても、RNA干渉能 (ノックダウン効果) が低下することなく酵素分解耐性が增強されることを見出した。ノックダウン効果は、HeLa 細胞を用いたDual-Luciferase™ reporter assay にて評価した。siRNAやmiRNAの3'-末端ダングリグエンド部の化学修飾試薬として、ベンゼンやピリジン誘導体のホスホロアミダイト試薬やCPG樹脂を関東化学 (株) で市販している (図6)。また、負電荷を帯びている細胞表面との相互作用などを期待して正電荷を帯びたアミノ糖であるグルコサミンに置換したRNA誘導体¹⁰⁾の合成に

も成功した。さらに、核酸塩基を除いたリボース体¹¹⁾やデオキシリボース体¹²⁾も開発し、そのノックダウン活性を評価した。これら化合物は、ヌクレアーゼ耐性の増強を確認することができたことから、ユニバーサルなダングリグエンド部としての利用が可能である (図5. B)。

ダングリグエンドの 5'-末端側から、ベンゼン、ピリジンの順でRNAに置換したBP修飾miRNA-143 (4, X=CH, Y=N)は、顕著な抗がん活性を示した。このBP修飾miRNA-143誘導体とパッセンジャー (センス) 鎖の配列を最適化した誘導体から形成した2本鎖は、優れたヒト大腸がん細胞 (DLD-1) 増殖抑制活性を示した。さらにヒト大腸がん細胞を移植したヌードマウスに対し、BP修飾型miRNA-143誘導体を全身投与したところ顕著な抗がん活性を示した¹³⁾。化学修飾miRNAによる抗がん作用は、図7に示したmiRNAによる補充療法で説明できる。すなわち、何かしらの原因で発現低下したmiRNA-143によりがん遺伝子とがん抑制遺伝子とのバランスが崩れてがん化したのをヌクレアーゼ耐性でノックダウン効果を示す化学修飾miRNA-143を補充

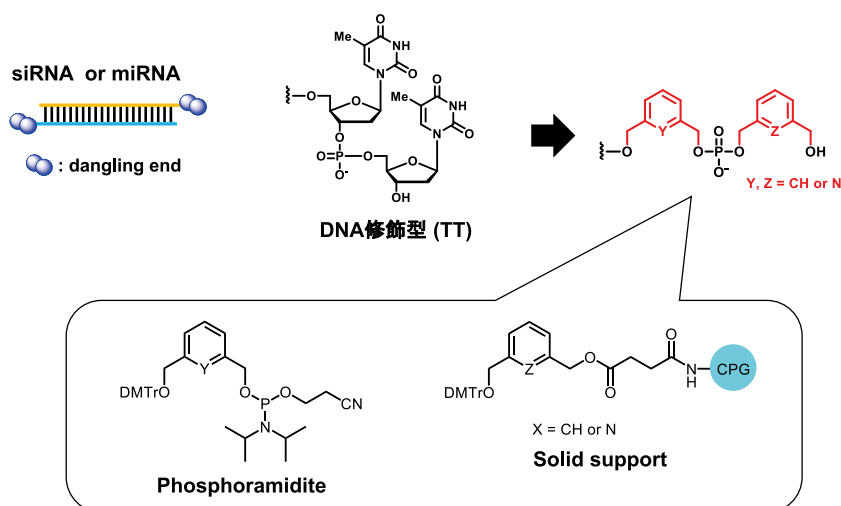


図6 関東化学 (株) より発売した化学修飾試薬

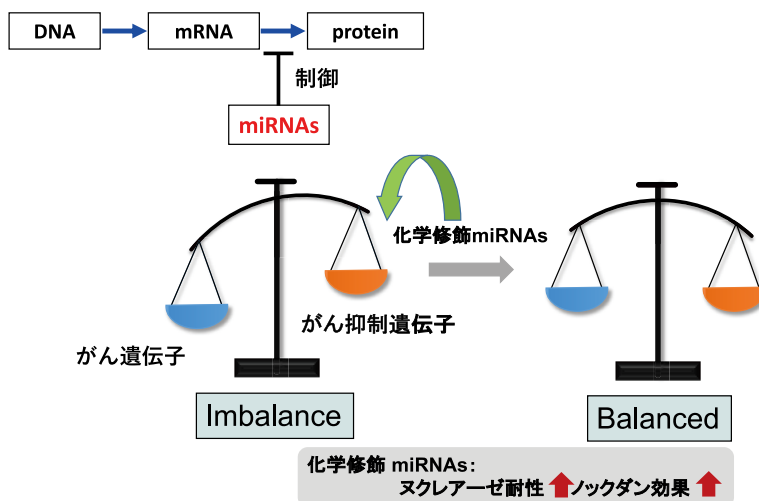


図7 miRNAの補充療法のメカニズム

することで崩れたバランスをもとに戻し、正常化するものと考えている。

負電荷の核酸を陽性荷電脂質などとリポプレックスを形成させて細胞内に導入するリポフェクション法を用いた全身投与では、毒性や疾患細胞選択性などの問題が未解決である。そこで、副作用が少ないと考えられる局所投与による治療を実施するため、皮膚ガンであるメラノーマに着目した。miRNA-205は、ヒト・メラノーマにおいて発現低下が顕著ながん抑制遺伝子であることが分かってきた。また、ヒトと同様イヌのメラノーマにおいても同様のmiRNA-205の発現低下が確認された。そこで、ヌクレアーゼ耐性を示すBP修飾miRNA-205を合成し抗がん活性を評価したところ、優れたヒト・メラノーマ細胞の増殖抑制効果を示した^{14)・16)}。自然発生メラノーマで放射線治療後に再発したイヌでの臨床試験を、岐阜大学動物病院の森崇教授らのもとで実施して頂いた。著者らが開発したBP修飾miRNA-205を用いて、患

部への週1、2回の計7回の局所投与で、10例中3例で完全寛解を示す優れた抗がん活性を示した(図8)。

この様にヌクレアーゼ耐性の付与がRNA医薬の開発に有用であることから、さらにダングリングエンド部のヌクレアーゼ耐性増強を目的に、先に示したBP修飾体のベンゼン残基とピリジン残基とのリン酸ジエステル結合をウレア結合に変換したBuP誘導体も開発した。この修飾体は、ヒト血清中での優れた安定性を示したことから国際特許も取得した¹⁷⁾。このウレア修飾miRNAの有効性に関しては今後詳細に検討し報告する予定である。

次の課題である、標的細胞への効率的輸送システムの開発にも取り組んでいる。一方で我々は、RNA医薬の開発には将来RNA分子の体内動態の解析が必要となると考えた。半減期が非常に短い放射性原子(¹⁸F, ¹¹C)が置換したPETラベル化分子の導入には、最終段階でのクリック反応の利用が最適と考えた。そこで、RNA分子の3'-末端にエチニル基を導入し、アジド基を修飾したPETラベル化分子をクリック反応で架橋することで、PETラベル可能なRNA誘導体の効率的合成法の開発に成功した¹⁸⁾(図9)。今後、RNA医薬の開発が進んだ場合に、RNA医薬の体内動態の解析に有効と考えている。なお、RNAへのエチニル基の導入に必要な試薬も開発済みであり、関東化学(株)より市販している。

さらに我々は、本法を用いて、がん細胞膜などに存在する特異的レセプターやトランスポーターを認識することが可能な様々なアジド修飾化リガンドを合成した。次いで、アジド修飾化リガンド体とエチニル基を有するRNA分子とをクリック反応して連結したパッセンジャー鎖(センス鎖)を合成した。種々のリガンドをRNA分子に架橋することで様々なDDS機能を付与したRNA分子のライブラリー化が容易にできることとなった(図10)。本法により、著者らは現在種々の

自然発生メラノーマの放射線治療後の再発がん治療



図8 化学修飾miR-205の抗メラノーマ活性

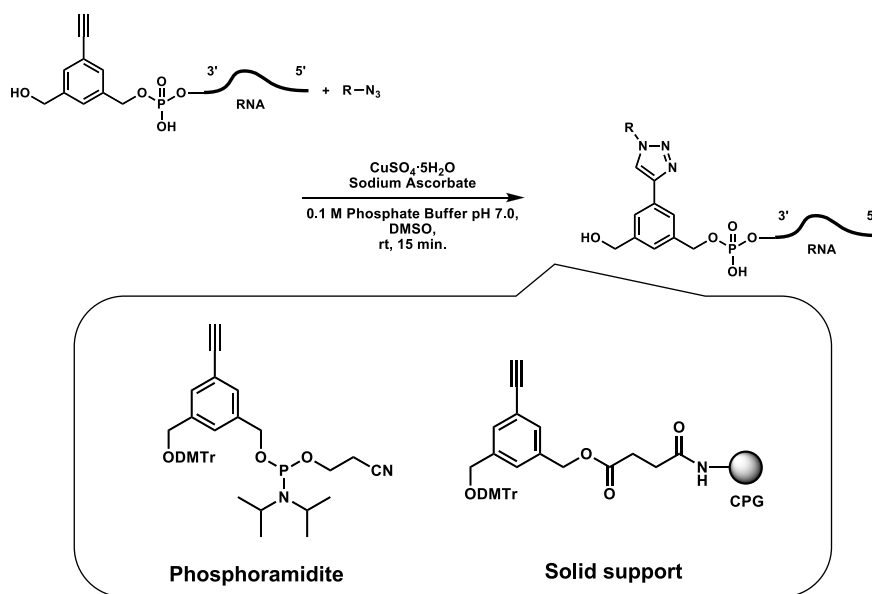


図9 関東化学(株)より発売した標識体導入試薬

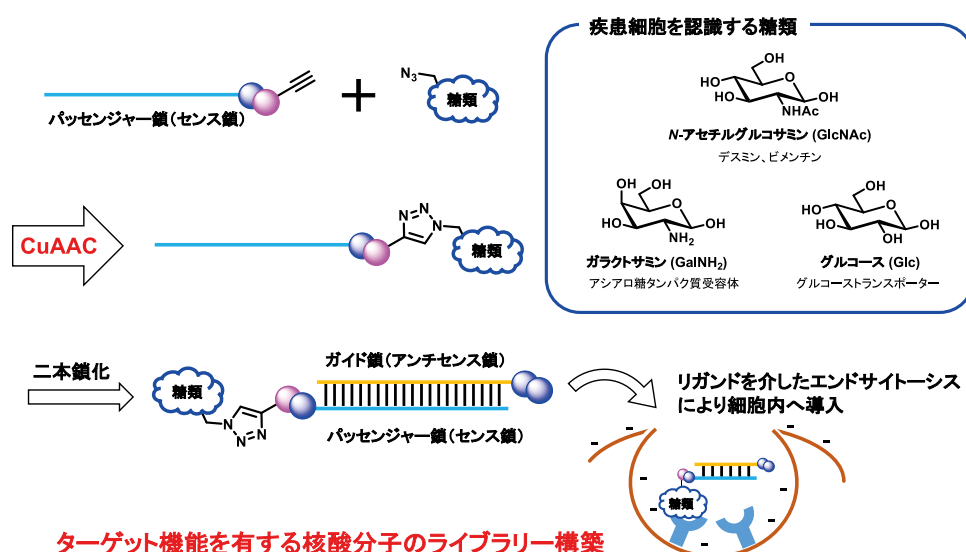


図10 クリック反応によるDDS機能を有するRNAの創製

リガンドが結合したとパスセンジャー鎖とヌクレアーゼ耐性を有するガイド鎖(アンチセンス鎖)からなる2本鎖RNAの簡易的なライブラリー化に成功した。このライブラリーが充実すれば、臓器選択性やがん細胞選択性を有するmiRNAやアンチセンスなどの核酸医薬の開発を容易にするものと考えている。

予備的検討の結果、ヒト乳がん細胞を選択的に認識するリガンドの探索にも成功しており、現在その抗がん活性や細胞膜透過性などを詳細に検討している。本研究が進めば、リポフェクション試薬なしに全身投与可能なRNA医薬の開発に繋がることが期待される。これら核酸の高機能化が、将来RNA医薬の実現に大きく寄与すること期待して本稿を閉じる。

参考文献

- 1) F. H. C. Crick, *Symp Soc Exp Biol.* **13**, 138-163 (1958).
- 2) J. D. Watson, *DNA: The Secret of Life*, New York, Alfred A. Knopf, Inc., 2003.
- 3) A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **391**, 806-811 (1998).
- 4) J.J. Song, S.K. Smith, G.J. Hannon, T.L. Joshua, *Science* **305**, 1434-1437 (2004).
- 5) E. Elkayam, C.D. Kuhn, A. Tocili, A.D. Haase, E.M. Greene, G.J. Hannon, L. Joshua-Tor, *Cell* **150**, 100-110 (2012).
- 6) S. M. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Genes Dev.* **15**, 188-200 (2001).
- 7) J.B. Ma, Y. R. Yuan, G. Meister, Y. Pei, T. Tuschl, D. J. Patel, *Nature* **434**, 666-670 (2005).
- 8) Y. Ueno, Y. Watanabe, A. Shibata, K. Yoshikawa, T. Takano, M. Kohara, Y. Kitade, *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 1974-1981 (2009).
- 9) Y. Kitade, Y. Akao, *J. Pharmacol. Sci.* **114**, 276-280 (2010).
- 10) X. Luo, T. Sugiura, R. Nakashima, Y. Kitamura, Y. Kitade, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 4157-4161 (2013).
- 11) K. Taniho, R. Nakashima, M. Kandeel, Y. Kitamura, T. Kitade, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 2518-2521 (2012).
- 12) Y. Nagaya, Y. Kitamura, R. Nakashima, A. Shibata, M. Ikeda, Y. Kitade, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **35**, 64-75 (2016).
- 13) Y. Akao, Y. Nakagawa, I. Hirata, A. Iio, T. Itoh, K. Kojima, R. Nakashima, Y. Kitade, *Cancer Gene Ther.* **17**, 398-408. (2010).
- 14) M. Kandeel, Y. Kitade, *PLoS One* **8**, e57140 (2013).
- 15) M. Kandeel, Y. Kitade, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **27**, 605-614 (2013).
- 16) M. Kandeel, A. Al-Taher, R. Nakashima, T. Sakaguchi, A. Kandeel, Y. Nagaya, Y. Kitamura, Y. Kitade, *PLoS One* **9**, e94538 (2014).
- 17) Y. Kitamura, Y. Masegi, S. Ogawa, R. Nakashima, Y. Akao, Y. Ueno, Y. Kitade, *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 4494-4501 (2013).
- 18) T. Shiraishi, Y. Kitamura, Y. Ueno, Y. Kitade, *Chem. Commun.* **47**, 2691-2693 (2011).



キーワード解説

ゲノム編集

ゲノム上の特定の遺伝子を改変する技術である。人工のDNA切断酵素を用いて標的遺伝子を切断し、その切断面が修復される過程において、標的遺伝子を破壊したり、別の遺伝子を挿入することができる。初期のゲノム編集は手間・コストがかかり、一部の研究者にしか利用されなかったが、最近のゲノム編集ツールの発展により研究者が広く利用できる技術になってきている。近年、遺伝子治療や農作物・家畜の品種改良への応用が急速に進んでいる。

全ゲノム増幅

ゲノムDNA全体を増幅する方法であり、微量あるいは貴重なゲノムDNAでも全ゲノム増幅を行うことで様々な解析に利用することができる。PCRをベースにした方法とphi29 DNAポリメラーゼを用いた方法に大別される。PCRをベースにした増幅法はホルマリン固定した組織片など断片化されたゲノムDNAでも増幅し易い。一方、phi29 DNAポリメラーゼを用いた増幅法は非常に長いDNAを正確に合成できるという特徴がある。

- **DNA (Deoxyribonucleic acid)** : 日本語ではデオキシリボ核酸と呼ばれ、A, T, C, Gと略される4種類のデオキシヌクレオチドから成る直鎖状ポリマーである。生物の遺伝情報はこの物質を介して保存される。
- **ゲノム** : ある生物が持つ全ての遺伝情報を指す。
- **遺伝子** : ゲノム上のあるタンパク質に翻訳される遺伝情報が含まれる領域を指す。タンパク質に翻訳されない機能性RNAに対応する遺伝情報を含む場合もある。

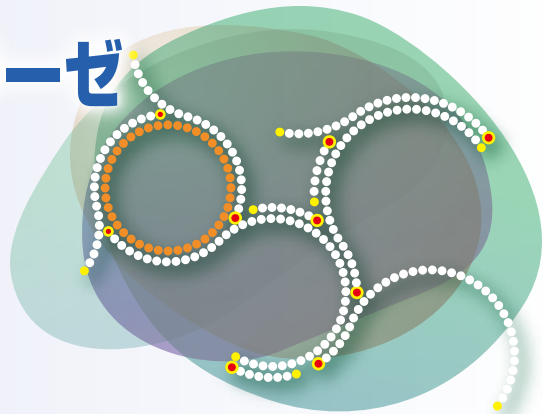
関東化学の遺伝子工学用試薬

phi29 DNAポリメラーゼ

信頼性の高い微量DNAの増幅に

特長

- シングルセルからのDNAを増幅可能です。
- 残存DNAを極限まで除去しました。
- 全ゲノム増幅反応時に非特異増幅を抑制します。



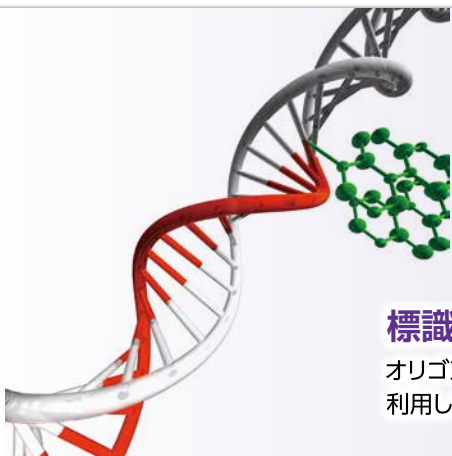
核酸修飾用試薬

ダンダリングエンド修飾試薬

オリゴヌクレオチドの3'末端を修飾し、ヌクレアーゼ耐性を高めた人工siRNAやmiRNAを合成するための試薬です。

標識体導入試薬

オリゴヌクレオチドにエチルベンゼン骨格を導入することにより、クリック反応を利用してオリゴヌクレオチドを標識化(蛍光色素や¹⁸Fなど)するための試薬です。



※各種製品のパンフレットをご希望の方はご連絡ください。

※無断転載および複製を禁じます。



関東化学株式会社

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

室町東三井ビルディング

電話 (03) 6214-1090 FAX (03) 3241-1047

HP <http://www.kanto.co.jp/times/>

E-mail : chemiti-info@gms.kanto.co.jp 編集責任者 : 猪瀬真人

2019年1月発行