

生命を科学する 明日の医療を切り拓く

2018 Vol.36 No.18

実験医学

11

Experimental Medicine

特集

急増する

炎症性腸疾患に挑む

腸内エコロジーの理解によるIBD根治への道

▶ 企画 / 長谷耕二

- 概論—腸内エコロジーの破綻と炎症性腸疾患 ▶長谷耕二
- IgA抗体による腸管粘膜面の免疫監視機構 ▶石垣佳祐, 新藏礼子
- 腸内エコロジーを支える生物間代謝経路 ▶山田恭央, 長谷耕二
- 飽食の時代の疾患—絶食・再摂食研究からのアプローチ
▶土肥多恵子
- エピゲノム制御に基づいた炎症性発がん機構の理解
▶田口純平, 山田泰広
- 炎症性腸疾患の免疫学的メカニズムと薬剤開発 ▶飯島英樹
- 炎症性腸疾患制御の新展開 ▶三上洋平, 金井隆典
- 培養腸上皮細胞を用いた粘膜再生療法と再生の分子基盤
▶油井史郎, 岡本隆一, 渡辺 守

連載

標的タンパク質を
分解する低分子薬

新連載

ブレイクスルーを狙う
バイオテクノロジー

羊土社

ブレークスルー を狙う バイオテクノロジー

編／東京大学先端科学技術研究センター 谷内江研究室

NGS、ゲノム編集、シングルセル…今の生命科学には、かつてないペースで新技術が登場しています。本連載では、組み合わせのアイデアで、さらなるシナジーをよび起こす先端バイオテクノロジーをご紹介します。

本連載をはじめるとあって テクノロジーを知り、新しい生命科学を創造する

これまでの生命科学の歴史のなかで研究者たちはさまざまな発見をし、われわれの知識を推し広げてきた。他の自然科学と同様に、研究者の慧眼と努力によるそれを支えてきたのは技術であり、生命科学においては光学顕微鏡、X線構造解析技術、DNAシーケンシングや質量分析といったテクノロジーである。また、ときには新しく発見された生命現象によって新しい技術が生まれ、それが次の発見をもたらしてきた。このような生命科学に独特な美しいサイクルには、例えばDNAの複製機構とDNAポリメラーゼの発見がPCR法の発明につながり、それがDNAシーケンシング法の発明につながり、今日私たちがゲノム情報を基礎とする研究をできるというものがあるだろう。

もちろん生命現象の新しい発見は狙ってできるものではない。しかしながら「このようなテクノロジーが生まれると、このような生命現象に挑戦できるようになる」と想像し、そのようなテクノロジーの実現を狙うことはできる。また、見渡してみると、いきなり一人の天才がこれまで誰も見たことがなかったような独創的な発明をして世界を驚かすというようなことはほとんどない。誰かの小さな発見やこれまでの技術を丁寧に理解して組み合わせることによって、他の開発者達に「ああ、その手があったか」と思わせるような技術が生まれることが多い。その世界にどっぷりと浸かることはとてもおもしろく、それが私たち自身のことを含めた生命の神秘に迫るものであればなおさらである。特に近年は、DNAシーケンシング、DNA合成、ゲノム編集、イメージングなどの技術が加速的に発展しており、従来の遺伝学の枠組みを超えて細胞や生物の機能を大胆に改変する合成生物学の技術と、それによる生命現象の観察が可能になってきた。生物機能に介入するようなテクノロジーの開発は、不確定要素の多い細胞あるいは分子のふるまいを制御する必要があり難しいが、「ここはこういうふうには動いているのかもしれない」と想像し、その裏をとりながら目的の制御を実現できたときは技術の実現と、生命の神秘に触れてそれを少しずつ理解するという喜びを同時に得ることができる。

世界では生物学，工学，情報科学を起点としたさまざまなバイオテクノロジーが生まれており，養われたセンスによってそれらがさらに複合され，分野の潮流をつくるようなアイデアが登場している。最近では，マイクロ流路デバイス，DNAバーコード，超並列DNAシーケンシングを組合わせた1細胞トランスクリプトーム技術がこれにあたる。またゲノム編集の登場は，単なる染色体DNA配列の改変にとどまらず，多くの研究者たちを個体発生における細胞系譜トレーシング技術の開発に参入させた。DNA合成技術やDNAアセンブリ技術の加速はマイコプラズマや出芽酵母の染色体まるごと合成の成功につながった。テクノロジーはビジョンをつくる。しかし，慧眼をもってすばらしいテクノロジーを生み出している科学者たちが世界中にいる一方で，どれだけの“賢い”科学者たちがこういったことが自分にもできると捉え，大胆なビジョンをもち，その価値を想像しながら挑戦しているだろうか？

私たちをとり巻くさまざまなバイオテクノロジーは，一見無関係なノードでも，その要素技術群までみてみると見事に連関しており，美しいウェブを形成している。生命科学の新しい学徒は，広大なウェブを端からほぐして逐一理解する行程を思い躊躇するだろう。しかしながら，まずは何も考えず，ウェブに身を放り込んでしまうのがよい。あなたも次々と新しいアイデアを生み出すようになり，ともすると永久に抜け出せなくなるような強烈におもしろい次の生命科学のビジョンをつくってしまうかもしれない。

本連載では東京大学先端科学技術研究センター谷内江研究室のメンバーがさまざまなバイオテクノロジーを解説し，一人でも多くの研究者とその卵をこのすばらしい世界に引き込むことを目的としている。私たち自身もまた，すばらしい技術の存在を再確認し，その可能性を誌面で議論することで自分たちのサイエンスを育み，楽しむ機会としたい。取り扱うトピックは，ゲノム編集などの基礎的な技術から高度な1細胞トランスクリプトーム，細胞系譜追跡技術，情報プロファイリング，一分子イメージング，人工細胞合成など多岐にわたるが，連載の進行につれ「前に説明したあれもこれもつながって，こういう技術が生まれた」あるいは「この技術とこの技術を組合わせれば，こういう新しいバイオロジーを考えることができるのではないか」と解説するようにする。第1回では，現在のバイオテクノロジーの美しきウェブの中で，急速にハブとなりつつあるゲノム編集技術について触れ，その大いなる拡がりについて，続くいくつかの回で楽しめるようにする。



バイオテクノロジーのウェブにダイブする

ゲノム編集 (genome editing) は、任意のDNA配列を特異的に切断し、それによって染色体ゲノム配列を自在に改変できる技術として2000年代後半に登場した。2012年にCRISPR/Casシステムが登場するまでは、任意のDNA配列に結合するように自在にデザインできるタンパク質にヌクレアーゼ (FokI) を融合したジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZNF) やTALエフェクターヌクレアーゼ (TALEN) が主流であった¹⁾ (図1A)。

哺乳動物細胞では染色体に切断が引き起こされると、相同染色体を利用した相同組換え修復や非相同末端結合修復が惹起される。非相同末端結合修復では、DNA切断末端がエキソヌクレアーゼやポリメラーゼによって処理されてから再連結されるために、欠失などの変異が入り、これが遺伝子破壊に利用できる (図1B)。一方で、切断末端の両方に相同な配列を末端にもつDNA断片がドナーとして切断処理と同時に細胞に導入された場合は、相同組換え修復を経てこれが高効率に目的の染色体座位にノックインされる (図1C)。このほか、ヌクレアーゼの代わりに転写因子や染色体修飾因子を融合させることで、狙った染色体の切断だけでなく、遺伝子発現やエピゲノム状態を制御できるような技術も開発された。

今日では、言うまでもなく、バクテリアのファージに対する免疫防御機構として発見されたCRISPR/Casシステムがゲノム編集の中心である。天然の生命システムから発見された技術を利用するためには、それが元来のシステムにおいてどのように機能しているかを理解することが要である。CRISPR/Casシステムについては連載の後半にこのことがさらに重要になってくるため、現在最も利用が進んでいるCas9をコードする *Streptococcus pyogenes* を例に外来DNAに対する原核生物の免疫防御機構を簡単に説明する²⁾。

このバクテリアではファージなど外来のDNAの侵入があると、Cas1, Cas2タンパク質が外来DNAのもつPAM (protospacer adjacent motif) という短いモチーフ配列 (*S. pyogenes*由来のCas9の場合は5'-

NGG-3') を認識してそれに隣接する5'側の一定長のDNA配列 (プロトスペーサー) を切り出し、ホストのゲノム上に挿入 (免疫) する (図2A)。新しく免疫されるDNA配列 (スペーサー) は、ある共通配列に挟まれる形で過去に免疫された配列群の先頭に挿入されるため、ゲノム上には一定間隔を空けた周期的なリピート配列が生じる。このリピート配列がその詳しい機能が明らかになる前に発見されたことがCRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) という名称の由来である。一度免疫された外来DNAの侵略が再び起こった場合は、次のように外来DNAが分解される。まず、ゲノムのCRISPR領域から発現するpre-CRISPR RNAからプロセッシングされる単位ユニット (crRNA) それぞれのリピート配列部分とtracrRNAとよばれるRNAが二次構造を形成し、それらがさらにCas9タンパク質と複合体を形成する (図2B)。複合体のスペーサーRNA部分は外来DNAのプロトスペーサー配列の逆鎖と塩基対を形成し、Cas9タンパク質がPAMを認識することでDNA二重鎖切断を引き起こし (図2C)、ターゲットされたDNAを分解に導く。このCas9のDNA切断活性のためのPAM要求性は、ホストゲノムのCRISPR領域に免疫した同じスペーサーは切断せずに外来DNAのみを切断することができる自己・非自己の認識機構として働く。

これらの機構が理解されてすぐ2012年にカリフォルニア大学バークレー校のJennifer Doudnaとウメオ大学 (当時) のEmmanuelle CharpentierらがtracrRNAとcrRNAを融合させた人工的なガイドRNA (gRNA) とCas9が3'側にPAM配列をもつ20塩基程度の配列を自在に切断できることを示し (図2D)、翌年Broad研究所のFang Zhangとハーバード大のGeorge Churchのグループが同時に哺乳動物細胞のゲノム編集においてもこれが利用できることを示した。その後、ZNFやTALENと異なりgRNAのスペーサー部分を変更するだけで汎用的に利用できるその簡便性から爆発的に利用が広がった。Cas9の場合はヌクレアーゼドメインを2つもち、これがDNA二重鎖切断を

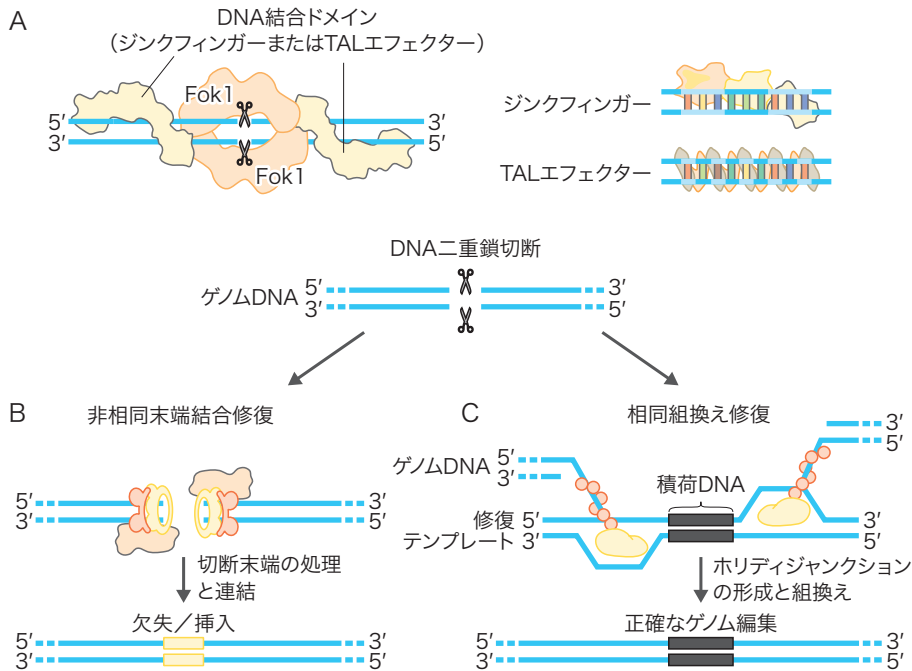


図1 TALENやZNFをもちいたゲノム編集

A) ジンクフィンガーやTALエフェクターはDNA結合性のタンパク質であり、DNA認識モジュールのくり返し構造をもつ。ジンクフィンガーは1つの認識モジュールが特異的な3塩基と選択的に結合し、TALエフェクターでは1つの認識モジュールが特異的な1塩基と選択的に結合する。このため任意のDNA配列に結合するタンパク質をデザインすることが可能であり、これにヌクレアーゼドメイン (FokI) を融合させたものがジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZNF) やTALエフェクターヌクレアーゼ (TALEN) といったゲノム編集ツールである。B) 非相同末端結合修復と相同組換え修復。(文献1を参考に作成)

可能にするが、これらを一部または両方欠損させたニックアーゼ型 Cas9 (nCas9) や不活性型 Cas9 (dCas9) も開発され、ZNFやTALENのようにこれらにさまざまなエフェクタータンパク質を融合させた多様な染色体操作技術も実現した。

CRISPR/Casシステムによる簡便な染色体切断はさまざまな生物種における遺伝子破壊を可能にし、ノックインは外来遺伝子の導入のみならず一塩基レベルでの染色体ゲノム配列の書き換えを可能にしたが、ゲノム編集はさらに新しい考え方によって染色体の遺伝コードを書き換える方向に向かっている。塩基編集 (base editing) とよばれるこの方法ではdCas9あるいはnCas9にシチジンデアミナーゼやRNAアデノシンデアミナーゼを改変したものをエフェクタータンパク質として融合させ (図2E)、ターゲットとなるDNA領域の塩基を脱アミノ化反応を介してシトシン・グアニン塩基対 (C・G) からチミン・アデニン (T・A) に変換することや、アデニン・チミン塩基対 (A・T) か

らグアニン・シトシン塩基対 (G・C) に変換することを可能にする³⁾⁴⁾。これによって細胞にとって毒性のある染色体切断や、まだ決して効率の高くないDNA断片のノックインを必要とせずに染色体ゲノム配列を高効率かつ正確に書き換えられるようになった。

ゲノム編集技術がもつ力の一端 ジーンドライブ

ゲノム編集が、自然がつくり上げた生命システムにどれだけの人工的なインパクトを与えるかを端的に示す例としてジーンドライブ (gene drive) がある⁵⁾⁶⁾。通常、特定の変異をもつ個体は、自然選択の枠組みを超えて集団内で広がることはない。つまり、その変異が生育に有利な形質を生み出さない限り、野生型も同じように増殖するため、変異型の個体が集団を支配するようなことは生じえないし、遺伝的浮動 (genetic drift) によって集団から消えることも多い。このこと

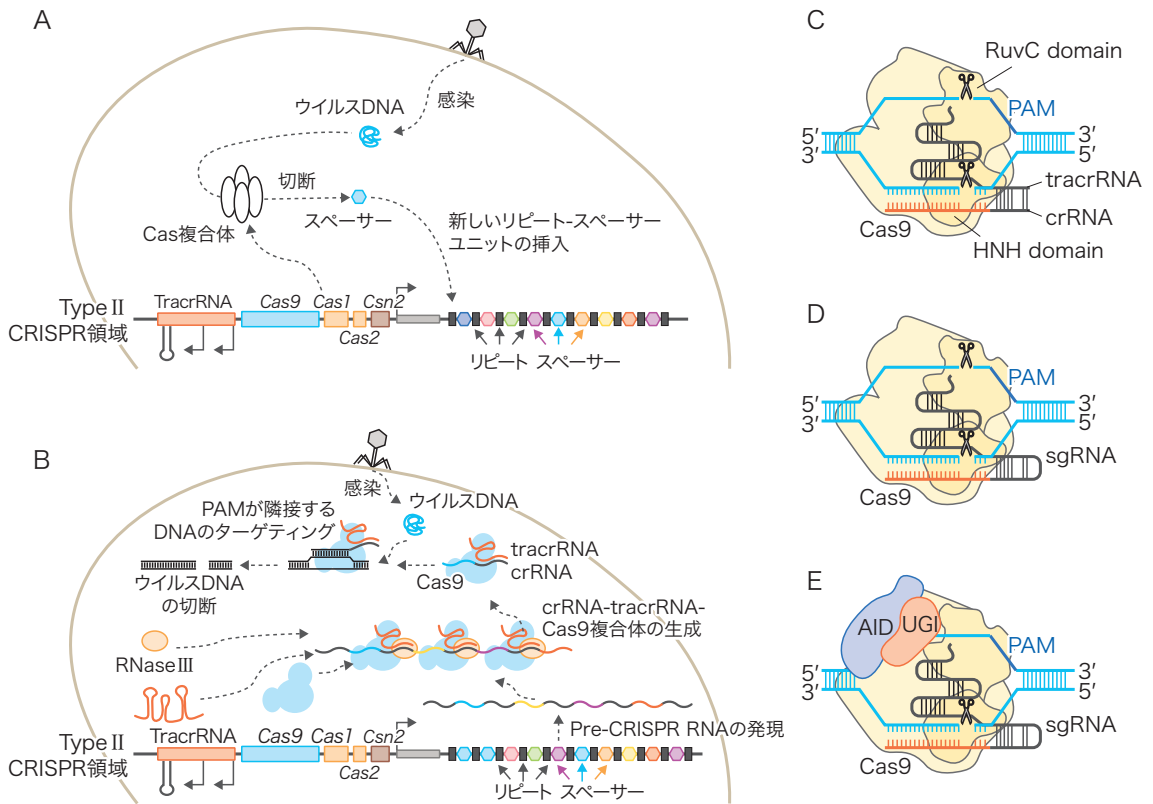


図2 原核生物の外来DNAに対する免疫防御機構

A) 外来DNAに対する免疫付与。 **B)** 外来DNAに対する防御機構。 **C)** crRNA-tracrRNA-Cas9 (3コンポーネント) によるターゲットDNAの切断。 **D)** gRNA-Cas9 (2コンポーネント) によるターゲットDNAの切断。 **E)** シチジンデアミナーゼをもちいた塩基編集Target-AID法。 nCas9にシチジンデアミナーゼ (AID) およびウラシルグリコシラーゼ阻害剤 (UGI) が融合されている。 nCas9によって一本鎖化されたDNAにAIDが動きシチジンを脱アミノ化反応によってウリジンに変換する。 UGIの作用によって一塩基除去修復が阻害され、DNA複製過程においてウラシルはチミンに変換される。(文献1, 2を参考に作成)

は有性生殖であっても同様で、野生型の個体と変異型の個体が交配した場合は、その子には親の姉妹染色体が均等な確率で分配されるため変異型が集団を支配することはない (図3A)。一方、ジンドライブとよばれる概念では、任意の「野生型配列を切断するゲノム編集ツールを発現するDNAカセット自体がその染色体の野生型配列と置き換えられた」個体が準備される。このとき、例えヘテロにジンドライブカセットをもつように改変された個体であっても、ゲノム編集によって野生型配列の切断と相同組換えDNA修復が誘導されて、ジンドライブカセットは他の相同染色体にコピーされてすぐにホモ化する (図3B)。したがって、その個体から生じる配偶子はすべてジンドライブカセットをもち、野生型と交配してもその子は

すべてジンドライブカセットを (少なくともヘテロには) もつことになる。最初はヘテロに入っていたカセットも、じきにホモ化する。この、ジンドライブカセットをもつ個体が野生型と交配しはじめると、メンデルの遺伝の法則を無視して、そのうち野生型が環境から消える (図3C)。

このようにジンドライブはこれまでの生物進化が頼ってきた遺伝のバランスを一気に変えてしまうような破壊的なインパクトをもった技術である。そのコンセプト自体は15年ほどの歴史があるが、CRISPR/Casシステムなどのゲノム編集の登場によって、特定の個体の任意の染色体座位に対してジンドライブ効果を簡便に生み出すことが可能になった (あるいは「なってしまう」)。例えば、ジンドライブを活用する有

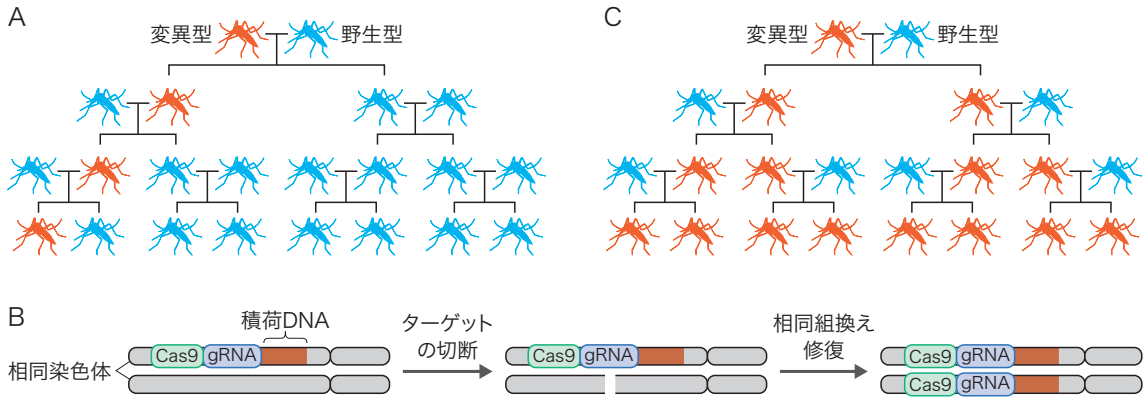


図3 ジェンドライブ

A) 通常、変異型をもつ個体は集団のなかで広まらない。B) ジェンドライブカセットは野生型の切断と相同組換え修復を経て相同染色体にコピーされる。C) ジェンドライブカセットをもつ個体は集団を支配する。

名なアイデアとして、マラリア原虫に対する耐性遺伝子を保持する蚊の個体を、マラリア流行地域に放出し、媒介蚊を駆逐しようというものがある⁵⁾。他のゲノム編集関連技術の例に漏れず、ジェンドライブも生態系への影響などの倫理的な議論が未熟である。

合成生物学におけるゲノム編集

分子生物学以降の生命科学の歴史は、遺伝子破壊、遺伝子導入によって変化する細胞や個体の形質の観察、蛍光タンパク質遺伝子を融合させた遺伝子による目的タンパク質の細胞内動態の可視化など、DNAにコードされた生命システムのプログラムに介入してリバースエンジニアリングすることをスタンダードなアプローチとしてきた。また合成生物学では、転写因子の発現誘導やDNAの組換えを安定かつ精密に制御して、細胞内に複雑な論理ゲートをもった計算機⁷⁾や外部刺激の数を数え上げられるようなカウンター⁸⁾が開発され、ゲノム合成のアプローチとともに生命システムを積極的にプログラミングするような技術開発が進んできた。連載の後半でも徐々に触れていくが、近年ではこれらのアプローチが統合されて、より複雑な論理回路をコードするDNAを細胞に導入することによって、動物個体の細胞を個別に蛍光識別する技術⁹⁾、タンパク質間相互作用ネットワーク¹⁰⁾や遺伝子間相互作用ネットワーク¹¹⁾を網羅的に同定する技術、個体発生の細胞系譜をトレーシングする技術^{12)~14)}などが生まれた。自

前にDNA配列を書き換えることができるゲノム編集は、細胞内に導入された論理回路を遺伝子発現誘導系などではなく、遺伝子コードレベルで精密に制御でき、生命科学研究のためにさらに精密で大規模な人工回路をもつモデル生物を構築するという意味においてもその意義が大きく、私たちの研究室を含めて世界中でそういった方向での技術開発が進んでいる。

バイオテクノロジーは協調して（あるいは開発者たちにとってはアイデアを「盗み」合いながら）発展しつつある。今回は近年急速にさまざまな技術開発に利用されはじめたゲノム編集に触れ、それによって生まれたジェンドライブというシンプルなアイデアが生態系を変化できるほどの大きなインパクトをもつという例を示した。第2回は発生における細胞系譜追跡について解説する。細胞系譜追跡の歴史に触れ、体細胞変異を利用した手法からDNAバーコードやゲノム編集が発生の視点を変えつつある様子を紹介しながらその限界についても議論する。

文献

- 1) Hsu PD, et al : Cell, 157 : 1262-1278, 2014
- 2) Mali P, et al : Nat Methods, 10 : 957-963, 2013
- 3) Nishida K, et al : Science, 353 : 10.1126/science.aaf8729, 2016
- 4) Gaudelli NM, et al : Nature, 551 : 464-471, 2017
- 5) Akbari OS, et al : Science, 349 : 927-929, 2015
- 6) DiCarlo JE, et al : Nat Biotechnol, 33 : 1250-1255, 2015

- 7) Weinberg BH, et al : Nat Biotechnol, 35 : 453-462, 2017
- 8) Friedland AE, et al : Science, 324 : 1199-1202, 2009
- 9) Livet J, et al : Nature, 450 : 56-62, 2007
- 10) Yachie N, et al : Mol Syst Biol, 12 : 863, 2016
- 11) Díaz-Mejía JJ, et al : Mol Syst Biol, 14 : e7985, 2018
- 12) McKenna A, et al : Science, 353 : aaf7907, 2016
- 13) Frieda KL, et al : Nature, 541 : 107-111, 2017
- 14) Pei W, et al : Nature, 548 : 456-460, 2017

著者プロフィール

谷内江 望 (Nozomu Yachie)

東京大学先端科学技術研究センター准教授および慶應義塾大学先端生命科学研究所特任准教授。2009年慶應義塾大学にて博士号を取得。'10年よりハーバード大学およびトロント大学博士研究員。'12年カナダ政府が選出するバンティングフェロー（自然科学技術分野）。'14年より現職。実験生物学と情報生物学を組合わせたさまざまなバイオテクノロジーを開発。谷内江研究室ウェブサイト：<http://yachie-lab.org/>



本 pdf は、著作者自身によるサーバーへのアップロード、配布の目的にのみご利用いただけます。

以下の行為はご遠慮ください

- ・ 本 pdf の販売など、直接的な利益を得る目的での利用
- ・ 本 pdf の一部を抜粋、あるいは改変しての利用
- ・ 本 pdf の第三者による配布

書籍名：実験医学 Vol.36 No.18

使用頁：3134～3140 頁

著者名：谷内江 望

発行社：（株）羊土社

発行年：2018 年

© YODOSHA CO., LTD. 2019