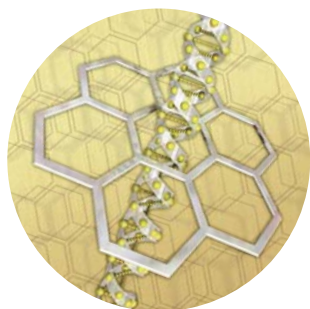
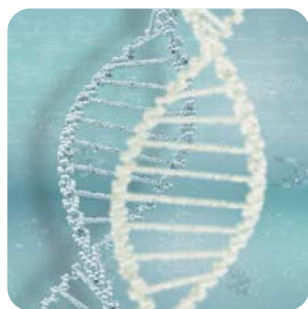


# ASCA Bulletin

March 2016 vol. 13

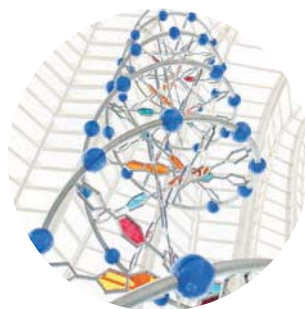


C



R

I

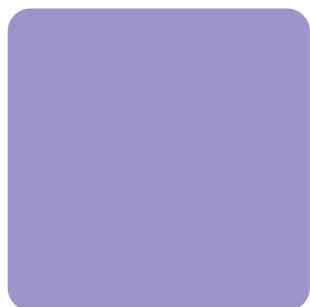


S

P



R



c

u

t



s

a

n

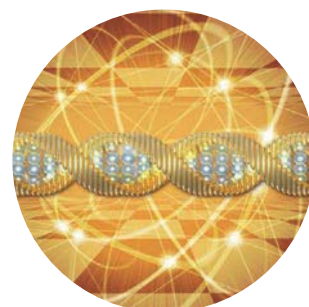


d

c

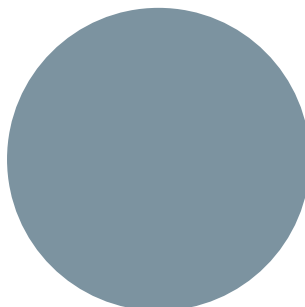
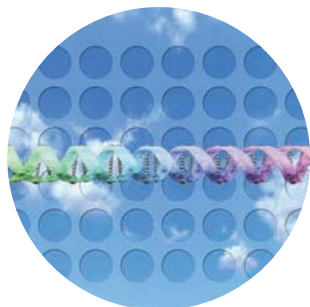
u

r



e

s



## ■ プロフェッショナルに聞く

■ CRISPR cuts and cures — ゲノム編集が切り開く未来

■ ゲノム編集技術普及の取り組み

■ ASCA Letter : 翻訳支援ツール ～ 概要と現場の声 ～

■ ASCA 掲示板 : Word 機能でセルフチェック!

■ 科学誌サイエンス記事 : 両染色体に RORC 変異を有する  
ヒトでのカンジダ菌と抗酸菌に対する免疫不全

# プロフェッショナルに聞く

## CRISPR cuts and cures

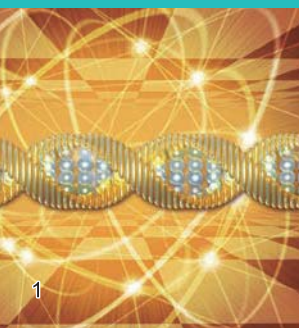
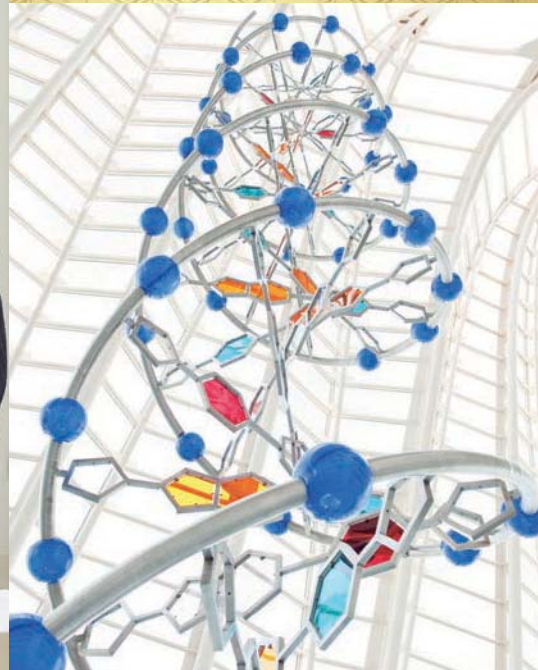
### — ゲノム編集が切り開く未来

やまもと たかし

**山本 卓** 先生

広島大学大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻 分子遺伝学研究室

科学学術誌 *Science* は 2015 年のもっとも画期的な科学研究のトピック (Breakthrough of the Year 2015) に「CRISPR」を選びました。CRISPRは遺伝子のDNA配列を任意に切り貼りする「ゲノム編集」の最新技術。画期的な手法として様々な科学技術の分野で注目を集めています。今回は、「ゲノム編集コンソーシアム」の運営をはじめ、ゲノム編集技術の振興に取り組まれている広島大学大学院理学研究科の山本 卓先生にお話を伺いました。





## 新しい遺伝子工学

ゲノム編集は、ゲノムDNAの特定の部位を改変する遺伝子工学の技術です。

これまでの遺伝子工学では、遺伝子組換えの技術が科学の発展と社会問題の解決に大きく寄与してきました。遺伝子組換え作物の登場により、農作物は優れた病害虫耐性や、人間にとって有益な健康機能成分を持つようになりました。また生物学においても、ノックアウトマウスなど、遺伝情報を変化させたトランスジェニック動物を作製できるようになり、いまやあらゆる分野で研究に欠かすことのできない存在になっています。

しかし遺伝子組換えには技術的な限界がありました。酵母やマウスなどの限られた生物を除くほとんどの生物では、改変を行う遺伝子に狙いを定めることが難しく、意図した改変が起こるかどうかは偶然性に頼るほかなかったのです。このことは、遺伝子工学の安全性に対する理解を得るうえでも障壁のひとつになっています。

こうした技術的問題を改善する手法として研究が進んでいるのが、ゲノム編集です。ゲノム編集では、ターゲットとする部位にピンポイントで切り込みを入れて「編集」することができ、精度が大幅に改善されています。また、遺伝子組換えのように遺伝子を導入する改変だけでなく、編集の痕跡がほとんど残ら

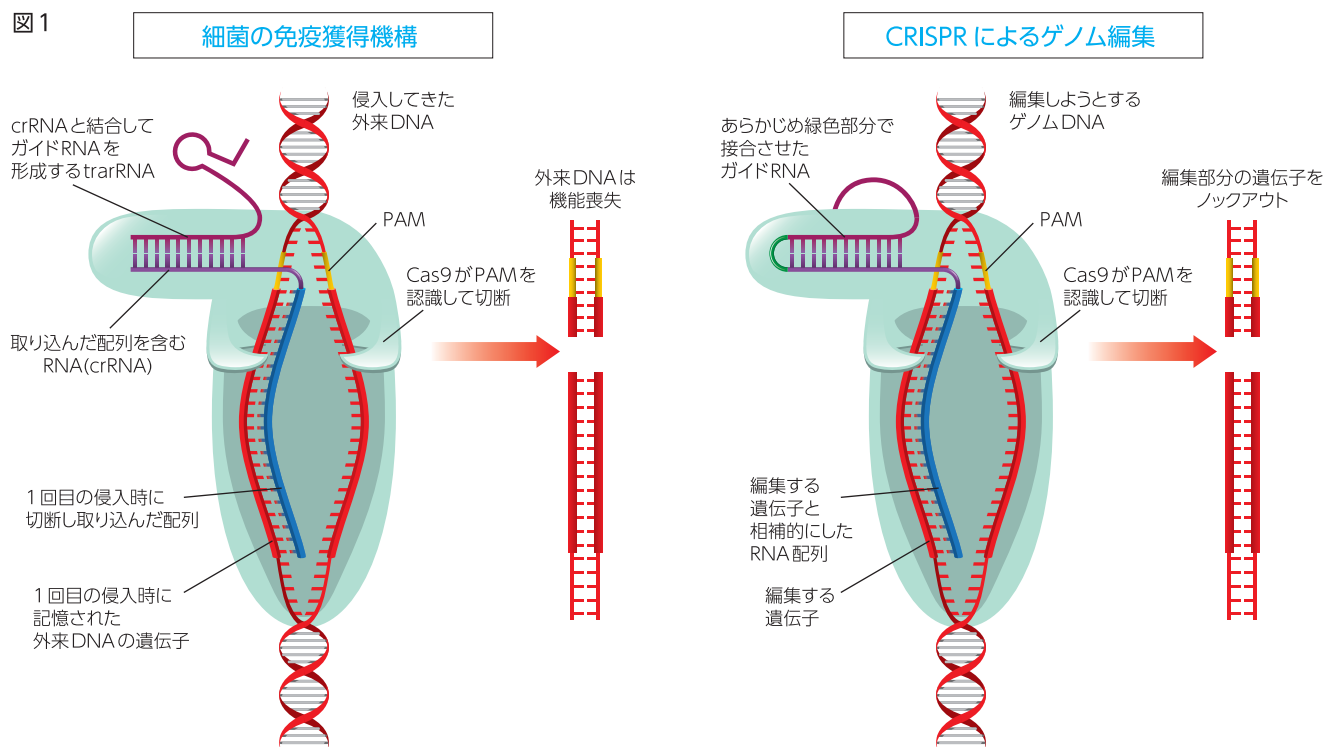
ない自然突然変異と同じ変異を作ることができます。この特徴から様々な生物種で用いることが可能です。

ゲノム編集の応用で期待されていることは多数ありますが、ひとつ例を挙げるなら、疾患モデルの構築です。ヒトの疾患には、遺伝子単位、あるいはそれよりも小さな変異が関わっていることが明らかになっています。従来の技術ではこうした変異を動物で再現することは難しかったのですが、技術開発によってそれが可能となりつつあります。ゲノム編集は病態の解明や創薬スクリーニングへの活用を通じて、新しい治療法の開発に大きく貢献するでしょう。

## ゲノム編集技術CRISPR

ゲノム編集はDNAの修復機構のエラーを利用したものです。すなわち、DNAは切断されると再結合しようとするのですが、その時に起こる遺伝子の破壊（ノックアウト）や相同組換えを利用した配列置換によりDNAを編集します。初期に開発されたゲノム編集のツールはジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）と呼ばれる人工の制限酵素\*です。ZFNの一部であるジンクフィンガードメインは、特定の塩基対配列を認識し、結合する機能を持っています。標的の配列に結合すると、ジンクフィンガードメインにつながっている制限酵素のDNA切断ドメインがDNAを切断し、編集を行います。ZFNの後に登場したツール

図1



\*人工の制限酵素：DNAを切断する働きを持つ酵素の一種

がTALENです。TALENはZFNよりも長い塩基対を標的にできることから、無関係の配列に結合して切断する(off-target作用)リスクが減り、特異性の高い切断が可能になっています。



CRISPRは第三世代にあたる新しいゲノム編集のツールです。CRISPRはもともと古細菌の獲得免疫に関与するDNAの塩基配列として石野良純教授(現九州大学)により発見されました。ファージなどが外部から細胞内に侵入すると、CRISPR配列中のcas遺伝子群がコードするCasタンパク質ファミリーが、外来のDNAを切断し断片化します。そのうちCas1タンパク質は、外来性DNAのproto-spacer adjacent motif (PAM) と呼ばれる配列を認識して切断を行い、CRISPR配列の中に取り込みます。これが免疫記憶となります。同じ外来性のDNAが再度侵入してきた時、1回目で取り込まれた配列が転写されて2種類の小分子RNAが発現し、標的を認識します。このRNAと切断活性を持つCas9タンパク質複合体が、侵入したDNAを切断して排除するというのが獲得免疫のメカニズムで、CRISPR-Casシステムと呼ばれています。

CRISPRはこのメカニズムをゲノム編集に応用したもので、Cas9ヌクレアーゼを切断に用いることからCRISPR-Cas9とも呼ばれます。CRISPR-Cas9では編集を行いたい部位をPAMとみなし、その部位と結合するようにガイドとなるRNAを合成します。ガイドRNAがDNAと結合すると、Cas9はPAMを認識して切断を行います(前頁図1)。このようにRNAをガイドとしている点が、ZFNやTALENとの大きな違いです。この仕組みを実用可能なものとし、2012年にScience誌に発表したのがDoudnaとCharpentierで<sup>1)</sup>、彼女らはすでに次のノーベル賞候補と目されています。

## CRISPRの長所

CRISPRの画期的な長所はいくつかありますが、まず、狙って編集できる箇所が従来法では1箇所であったのが、複数箇所の編集が可能になりました。Wangらは、2013年に同時に5箇所の編集に成功したことをCell誌に発表しています<sup>2)</sup>。複数箇所の同時編集は効率性を改善するのはもちろん、遺伝病の治療などへの応用にも大きな前進をもたらすと考えられています。

また、もうひとつ大きな利点に挙げられるのが、使用が簡便で、費用も安価であるということです。ZFNやTALENは、ベクター\*の構築を行うのに結合ドメインと切断ドメインの融合タンパク質を作るための知識と技術が必要で、それができる人材も限られていました。さらに材料の調達に時間がかかることもしばしばです。しかしCRISPRは、標的の配列に対応するようにガイドRNAの末端の塩基を変更するだけでよいため、比較的誰でも使用することができ、すぐに準備することができます。早ければ1週間で用意し、2週間後には実験を開始することも不可能ではありません。ES細胞からノックアウトマウスを作製する期間も、これまでは半年から1年かかっていたのが数ヶ月に短縮できます。

## 日本での普及への課題

CRISPRはこのように非常にメリットの高い手法ですので、今後さらに爆発的に普及していくことが予想されます。特に米国と欧州のほか、中国や韓国では普及が進んでいます。多くの人口を抱える中国では、食品の品種改良研究で積極的に使用されています。韓国も国をあげてバイオ研究を進めています。

一方で、残念ながら日本のゲノム編集研究は立ち遅れているのが現状です。そこには様々な問題が複雑に絡んでいるのですが、いくつか要因を挙げるすることができます。そのひとつは、日本が日本発、つまりオリジナルの技術を生み出すことができていないことです。もちろんオリジナリティは重要なことで、このCRISPRに関しても今後特許や使用料の問題が浮上してくることが予想されます。しかし、CRISPRはかつてのPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法のように、確立した技術として広がりつつあるので、これからはCRISPRをいかに使うかという点にも目を向けていく必要があると感じています。基本特許の行方は現段階では不明確ですが、周辺特許の確立を狙うなど戦略の幅を広げる時期に来ています。

さらに、日本での普及には、安全性の確立と正確な情報提供も鍵になると考えています。例えば農作物の品種改良について言えば、前述のとおりゲノム編集は編集による残滓を残しませんので遺伝子組換えよりも安全な手法と考えられます。こうした情報が歪曲されたイメージを伴わずに、正確に消費者や患者に伝えられることが重要です。一般の方々の正しい理解が得られれば、ゲノム編集は人間の健康や生活にメリットの有る技術としてさらに普及していくと思われます。

\* ベクター：遺伝子組換えやゲノム編集において、組換えDNAを挿入するために様々な機能を付与された媒体

1) Science. 2012 Aug 17;337(6096):816-21.

2) Cell. 2013 May 9;153(4):910-8.

3) Nat Commun. 2014 Jun 26;5:4240.

図2



白色アルビノラットを母親に持つF1ラット。父親由来のアレル遺伝子だけを編集したラットは白色の体毛が一部に遺伝したが(右)、母親由来のアレル遺伝子だけを編集したラットはすべて変異が修復され、野生色の仔(左)が生まれた。

Shared from Yoshimi K et al, Allele-specific genome editing in F1 rats by the CRISPR/Cas system. Nat Commun. 2014 Jun 26;5:4240. / CC BY 4.0 [http://www.nature.com/ncomms/2014/140626/ncomms5240/fig\\_tab/ncomms5240\\_F2.html](http://www.nature.com/ncomms/2014/140626/ncomms5240/fig_tab/ncomms5240_F2.html)

## 日本での先進的研究

CRISPRを実際に用いた研究では、京都大学の真下知士准教授(現大阪大学)らのグループが、白色アルビノのラットを用いて経路突然変異の修復を行いました<sup>3)</sup>。この操作の過程では一塩基多型(SNP)の編集が行われており、高い精度が求められるアレル特異的なゲノム編集\*に成功しています(図2)。マウスの改変では、大阪大学の伊川正人教授、筑波大学の高橋智教授、群馬大学の畑田出穂教授が、CRISPRを使った成果を次々と出されています。

また、東京大学の佐藤守俊准教授らの研究グループは、光スイッチタンパク質を用いてCas9の切断活性を制御する技術を開発しました<sup>4)</sup>。この手法では、青色光の照射をオン/オフすることにより、Cas9の活性/不活性が切り替わります。すなわち、CRISPRで切断を行うタイミングが自由にコントロールできるようになるため、よりピンポイントでの編集が可能になり、off-target作用の問題を回避できる可能性を秘めています。

さらに、京都大学iPS細胞研究所(CIRA)の畑田秋津助教らのチームは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者に由来するiPS細胞に対してゲノム編集を行い、ジストロフィン遺伝子\*の修復を行いました<sup>5)</sup>。この手法では、off-target作用を防ぐために配列データベースや各種の解析を活用しています。iPS細胞はその性質からゲノム編集との相性が良いと考えられるので、今後も活発に研究が行われるでしょう。

新技術に関する研究も進められています。東京大学の濡木理教授らのグループは、化膿レンサ球菌(*Streptococcus pyogenes*)よりも分子量の小さい黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)のCas9の結晶構造の解明に成功しており<sup>6)</sup>、細胞導入効率を改善することでさらなるゲノム編集の効率化を目指しています。

神戸大学の西田敬二特命准教授らは、ヌクレアーゼの代わりにデアミナーゼを塩基配列の編集に用いる方法(TargetAID)

を開発し、第67回日本生物工学会大会(2015年)で発表しています。この方法ではCRISPRでのCas9が担う「はさみ」の機能を用いず、切断せずに点変異によってDNAの編集を行います。DNA二本鎖の切断が困難な生物種での活用が期待されています。

また、九州大学の中村崇裕准教授らはpentatricopeptide repeat (PPR) タンパク質を用いた、従来法の改良にあたる技術の開発を進めています。この研究には私たちも参加しており、ベンチャー企業を立ち上げて国産技術としての実用化を目指しています。

このように、ゲノム編集は日々進歩しており、より精密で、かつ多様な生物種に対する遺伝子改変が可能となっています。



\*ゲノム編集: 片側のアレル(対立遺伝子)のみに行われたゲノム編集 \*ジストロフィン遺伝子: デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子

4) Nat Biotechnol. 2015 Jul;33(7):755-60.

5) Stem Cell Reports. 2015 Jan 13;4(1):143-54.

6) Cell. 2015 Aug 27;162(5):1113-26.

## ゲノム編集と倫理的問題

2015年4月に中国の中山大学の研究グループが、ヒトの受精卵に対してCRISPRを用いてゲノム編集を行った研究を*Protein & Cell*誌に発表しました<sup>7)</sup>。正常に発生しない3倍体の受精卵を使用したと述べられているのですが、ヒトの生殖細胞にゲノム編集を行ったことは大きな議論を巻き起こし、正当な研究の進展に悪影響を与えると非難する声明も多数出されています。前提として、ヒトの受精卵や胚へのゲノム編集は、技術的問題と倫理的問題を含んでおり簡単に容認されるものではありません。近年ではデザイナーベビーという言葉も生まれていますが、生まれてくる子どもの形質を操作(エンハンスメント)するためにゲノム編集を使うべきではないと考えています。それでは治療目的であれば許容されるかという点、現状では、ゲノム編集にはまだそれに足るだけの技術的な信頼性が確立されていないと考えています。何度も述べたoff-target作用に加え、世代を経てゲノム編集による想定外の影響が起らないとは言いきれません。特に懸念されるのがモザイク効果\*という現象で、受精卵の遺伝子に対してゲノム編集を行った場合、様々な変異が導入されたモザイク状態の胚ができてしまうこととなります。

2015年末には、米国、英国、中国のアカデミー主導で、この倫理的問題を主なトピックとする国際サミット(International Summit on Human Gene Editing)が開かれました。サミットで採択された声明では、ヒトゲノムに対するゲノム編集について、基礎研究と臨床使用に分けて指針が提示されました。臨床使用に関しては、厳密な評価を前提としながらも、体細胞の研究では鎌状赤血球症やがんの治療への応用の期待が示されています。その一方で、生殖細胞への適用についてはエンハンスメントのために技術が用いられることを明確に懸念し、安全性および効果が十分に立証され、かつ社会的なコンセンサスが確立されるまでは行うべきでないと記載しています。今後このコンセプトをもとに、各国で技術の乱用を規制するための法整備を行う方向に進んで行くでしょう。

ゲノム編集、特にCRISPRは人類に大きな恩恵をもたらす技術です。これまでの医療では治療できなかった疾患に治療法をもたらしたり、食品の品質改良によって食糧問題を解決できる可能性を持っています。だからこそ、この方法が適正に使われ、人々に受け入れられるよう普及の道筋をつけていくことも、先駆的に研究に取り組んでいる研究者の使命ではないかと考えています。



やまもと たかし

### 山本卓先生

広島大学理学部、広島大学大学院理学研究科卒。

現在は広島大学大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻教授。

両生類の精子形成機構に関する研究から初期発生の遺伝子ネットワーク構造の研究を経て、ゲノム編集技術の開発研究に取り組む。

### インタビューを終えて

山本先生へのインタビューは予定の1時間を大幅に超えて2時間以上に及びました。CRISPRの革新性だけでなく、ゲノム編集という技術への期待、そして普及への熱意が強く伝わってくるインタビューでした。

\*モザイク効果：単一の個体の中で、遺伝的に異なる複数の細胞が混在している状態  
7) *Protein Cell*. 2015 May;6(5):363-72.



科学誌 *Science* に論文が掲載された日本人著者に、論文の内容、普段の研究内容についてわかりやすく解説していただきました。



## 両染色体に *RORC* 変異を有するヒトでのカンジダ菌と抗酸菌に対する免疫不全 Impairment of immunity to *Candida* and *Mycobacterium* in humans with bi-allelic *RORC* mutations

Satoshi Okada, Janet G. Markle, Elissa K. Deenick, Federico Mele, Dina Averbuch, Macarena Lagos, et al.

*Science* 07 August 2015; Vol. 349, no. 6248

### ● 今回の論文についての解説をお願いします。

#### 宿主免疫反応における IL-17 と IFN- $\gamma$ の役割

慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMCD) は、皮膚粘膜に慢性、反復性のカンジダ感染を呈する原発性免疫不全症です。また、メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症 (MSMD) も同じく原発性免疫不全症ですが、抗酸菌などの細胞内寄生菌に易感染性を示します。宿主のカンジダに対する粘膜免疫の制御には Th17 細胞が産生するサイトカイン IL-17 が関与しており、IL-17 シグナル伝達が先天的に障害されると CMCD を発症します。一方で、宿主の抗酸菌の排除には IFN- $\gamma$  が必須で、IFN- $\gamma$  の産生障害や作用障害により MSMD が発症します。CMCD と MSMD は全く異なった疾患ですが、IL-12 と IL-23 のシグナル伝達が同時に障害される IL-12p40 や IL-12R $\beta$ 1 の異常では、CMCD と MSMD が同一個体で発症することが知られていました。

#### 常染色体劣性遺伝を呈する *RORC* 異常症の発見

今回、CMCD と MSMD を合併し IL-12p40 や IL-12R $\beta$ 1 に異常がない近親婚家系 3 家系を対象にエクソーム配列解析\*を行いました。その結果、*RORC* のホモ接合性変異が原因遺伝子変異として同定されました。*RORC* は、Th17 のマスター転写因子である ROR $\gamma$ T をコードする遺伝子なので、CMCD の発症は非常に納得できるものでした。一方で、*RORC* の異常でなぜ MSMD が発症するのかは大きな疑問点になりました。*RORC* 欠損マウスの作製に携わり、この分野のパイオニアであったニューヨーク大学の Dan Littman 教授に意見を伺ったところ、われわれ同様、抗酸菌に対する易感染性は予想外の表現型だとの見解でした。そこで、同定した変異の機能解析を行ったところ、患者で認められた *RORC* 変異は機能喪失型変異で、野生型 *RORC* の遺伝子導入により機能が回復することが確認されました。MSMD 発症に IFN- $\gamma$  の機能障害が重要であることから、わ

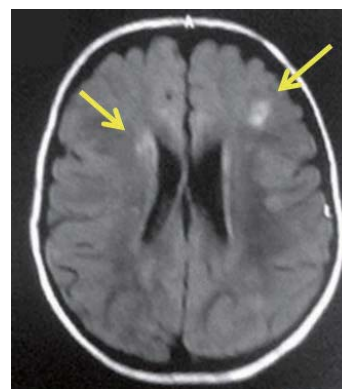
\* 全ゲノムのうち、エクソン領域の配列に絞り込んで解析する手法。



広島大学大学院  
医歯薬保健学研究院 小児科学  
岡田 賢 先生

れわれは IFN- $\gamma$  に着目してさらなる検討を行いました。その結果、患者の末梢血単核球では BCG、結核菌といった抗原刺激に対する IFN- $\gamma$  の産生能が障害されており、これが MSMD 発症の分子基盤となることを見出しました。

今回の発見で、ヒトにおいて ROR $\gamma$ T が、IL-17 産生を介したカンジダに対する粘膜免疫と IFN- $\gamma$  産生を介した抗酸菌に対する全身反応の双方に重要な役割を果たすことが明らかとなりました。今後はこの所見からさらなる病態解明が進み、マイコバクテリア感染に対する IFN- $\gamma$  投与を含め、有効な治療法の確立につながることを期待しています。



*RORC* 異常症患者の頭部 MRI 画像

頭蓋内に多発性の肉芽腫性病変を認め、生検組織からの培養で *Mycobacterium bovis* BCG が検出された。(矢印)

### ● 編集部より

慢性カンジダ症とマイコバクテリア感染症を合併した症例の遺伝子解析を行ったところ、共通して *RORC* という遺伝子に変異が生じていました。それぞれ別の免疫不全が関連している疾患ですが、*RORC* が両方の免疫機構を司っていることが分かりました。この研究では、患者に正常な *RORC* 遺伝子を導入して免疫機能が回復することを確認しており、新たな治療法の解明に役立つと期待されます。

### ■ サイエンス日本語版ホームページ

サイエンス日本語版ホームページがリニューアルされ、さらに使いやすいデザインとなりました。*Science* 等に掲載された最新の研究論文へ簡単にアクセスできます。メールマガジンの登録もこちらから! [www.sciencemag.jp](http://www.sciencemag.jp)

ASCAは、*Science* を発行する米国科学振興協会 (AAAS) からの委託を受け、Science Japan Customer Service Office としてカスタマーサービスを担当しています。