

RNA を介した正確な遺伝子変異修復法の開発

大阪大学大学院基礎工学研究科物質創成専攻機能物質化学領域

鈴木 啓一郎

近年、ゲノムの標的配列のみを特異的に切断・改変するタンパク質『人工DNA切断酵素（ヌクレアーゼ）』が登場し、標的遺伝子の破壊（遺伝子ノックアウト）や、外からの遺伝子挿入（遺伝子ノックイン）など、様々な細胞種・生物種でゲノム配列をデザイン・改変する新規遺伝子工学技術『ゲノム編集』が開発された。特に最新の人工ヌクレアーゼであるCas9タンパク質を用いたCRISPR-Cas9（クリスパー・キャスナイン）はゲノム編集に必要不可欠なツールであり、特別な技術や設備がなくても作製可能なため、様々な分野の研究者がこの技術を活用するようになり、生命科学研究全般に多大な影響を及ぼした。今後更なる周辺技術の発達により、健康医療研究やグリーンバイオ研究などへの応用を通して、健康・食料・エネルギー等様々な分野に多大なる利益をもたらす技術としても期待されている。しかしながら既存のゲノム編集技術は標的部位1カ所のみを局所的に不正確・低効率で改変する技術であり、ゲノムを自由に設計し人工的に多種多様な有用細胞を作製することに必要不可欠な大規模な遺伝子操作や、がんや遺伝病などの治療応用に向けては根本的な技術革新が必要不可欠である。

こういった背景の中、研究助成金受領者の最新の研究成果として新規ゲノム編集技術の開発に成功した。ゲノム編集技術は、細胞が持つ主として2通りのDNA二本鎖切断修復機構（相同組換えと非同末端結合）を利用する事で、標的配列の改変する技術である(図1a, b)。数塩基の欠失や挿入などのエラーが起こりやすい非同末端結合経路（NHEJ）による修復を利用する事で、標的遺伝子の破壊『遺伝子ノックアウト』が可能となるが、その変異パターンはランダムである。一方、ゲノムの標的部位に相同性をもつ外来DNAを人為的に細胞核内に導入しておくと同組換え経路によりゲノムに取り込まれることがあり、これを利用して標的配列を自由自在に改変する『遺伝子ノックイン』が可能となる。しかしながら、相同組換えは細胞の分裂に伴っておきるDNA修復機構であるため、分裂の盛んな細胞にしか用いることができない欠点があった。更に相同組

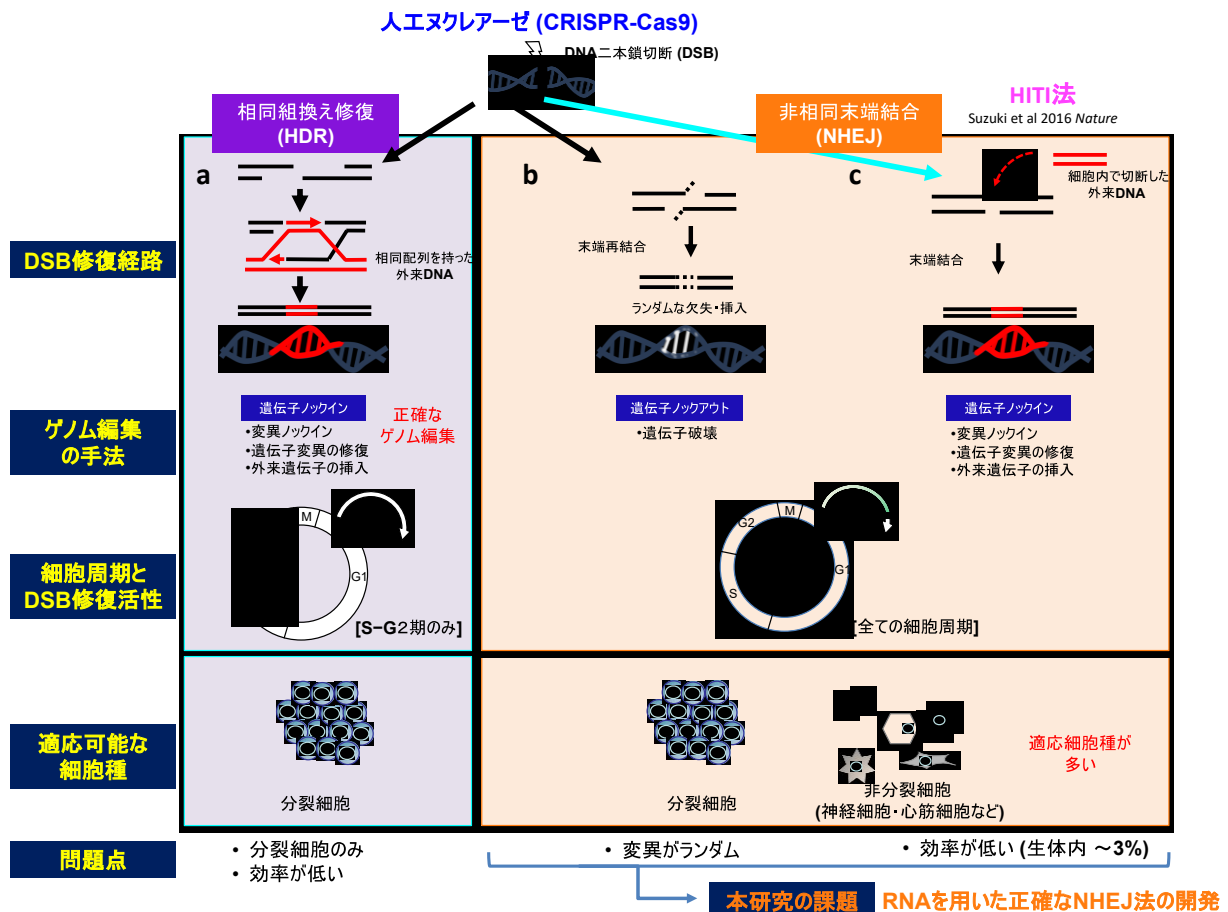


図1 ゲノム編集技術とその原理

換えによる遺伝子ノックインは数kb以下の比較的小さなDNAのみ挿入可能であり、大規模なゲノム配列の改変には適さない技術であった。研究助成金受領者は、CRISPR/Cas9を用いて、従来の遺伝子ノックインには用いられないことのなかった、相同組換え活性のない非分裂細胞内でも活性を有する「NHEJ経路」を利用した新規ゲノム編集技術を開発し、相同配列を必要としない標的部特異的な遺伝子ノックイン技術、HITI (Homology-Independent Targeted Integration) と名付けた (図1c)。

本技術はあらゆる細胞種に有効な技術であるため、これまで困難であった生きたマウスの脳・筋肉など生体内の様々な組織にて標的ゲノム配列を自由に改変する世界初の技術であった。また、生体内の病変部位で疾患変異を直接修復することが可能となり、実際に遺伝性疾患である網膜色素変性症モデルラットの視覚機能障害の治療や病的に老化が促進する早老症マウスの治療に成功した (Suzuki et al. Nature 2016; Suzuki et al. Cell Res 2019)。しかしながら、生体内での遺伝子修復効率は未だ細胞あたり3%以下と低いため十分な治療効果が得られておらず、根本的な効率改善が求められている。

本研究課題では、研究助成金受領者がこれまでに習得・開発してきたゲノム編集技術に関する知見を生かし、原理的観点から既存のゲノム編集技術の問題点 (不正確かつ低効率な技術) の解決を目指した。具体的には不正確な非同源末端結合経路 (NHEJ) を制御し、ゲノム編集技術に応用することで、正確かつ高効率な新規ゲノム編集技術の開発を行った。

NHEJは切断された標的ゲノムを直接再結合する修復経路であり、切断された標的ゲノムを結合時に挿入・欠失変異を高頻度で生じさせる。上述したようにこれを利用してCRISPR-Cas9で切断した標的遺伝子内にランダムな変異を導入し、遺伝子ノックアウトを起こすことが可能となる。また研究助成金受領者の開発したHITI法により遺伝子ノックインも可能となる (図1参照)。しかしながら、遺伝子ノックアウトにおいては挿入される変異がランダムなため任意の配列に改変できないことが問題であり、遺伝子ノックインにおいては効率が低いことが現在の課題である。これらの問題点を解決するため、NHEJ機構の原理的観点から正確なNHEJ効率を上昇させるメカニズムを探索し、新規ゲノム編集技術の開発を目指した。

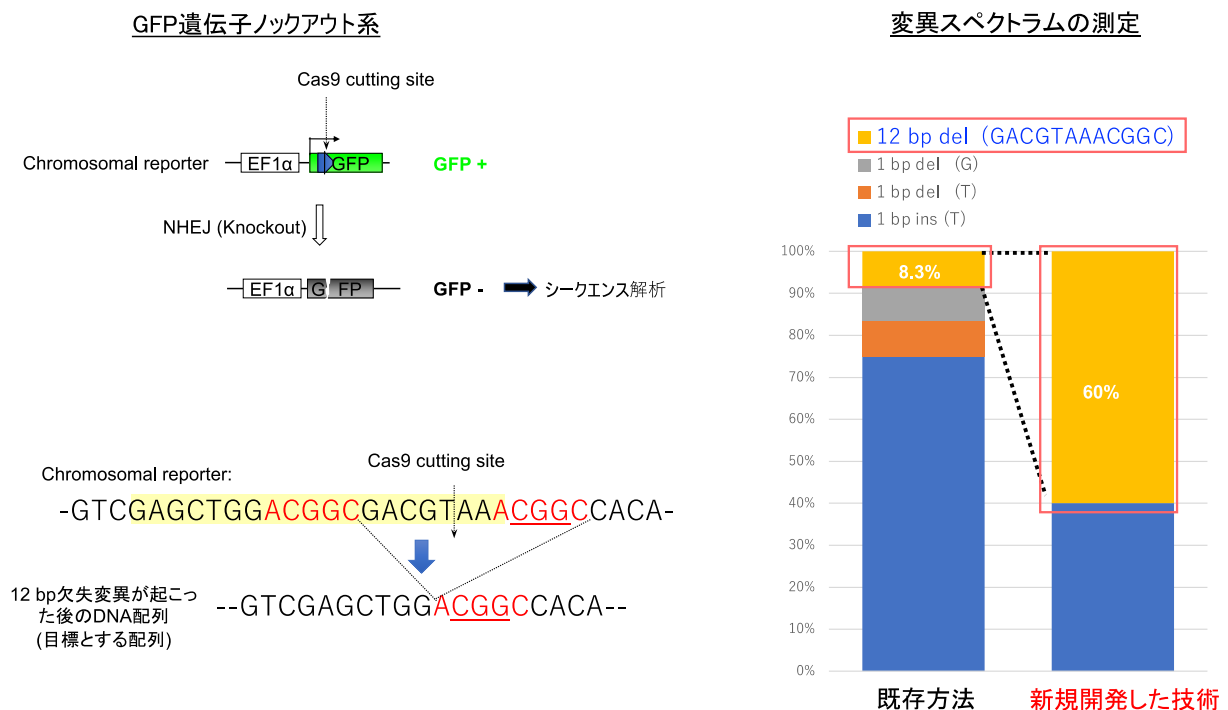


図2 RNA assisted NHEJ 法: 遺伝子ノックアウト

まず初めにHEK293細胞に組み込んだGFP遺伝子内をCRISPR-Cas9を用いて切断し、NHEJを用いてランダムに変異を導入した。切断の際にある一定の割合 (8.3%) で生じる12 bp欠失変異を目的の変異 (12 bp欠失変異) とし、この任意の配列への変異率を測定し、NHEJを制御できる因子の探索を行なった。その結果、ある特定のRNAを共発現させた結果、これまで全くランダムであったNHEJによる導入される変異パターンを目的の変異 (12 bp欠失変異) に誘導することが可能になった (図2)。更に、これまで困難であった大規模ゲノム欠失が容易にできるようになった (図3)。次に、RNAを用いたHITI法による遺伝子ノックインを試みた。この結果、ノックインカセットとの接合部に相補的なRNAを付加する事で従来法より3-5倍効率良く遺伝子ノックインを起こせる技術の開発に成功した (図4)。

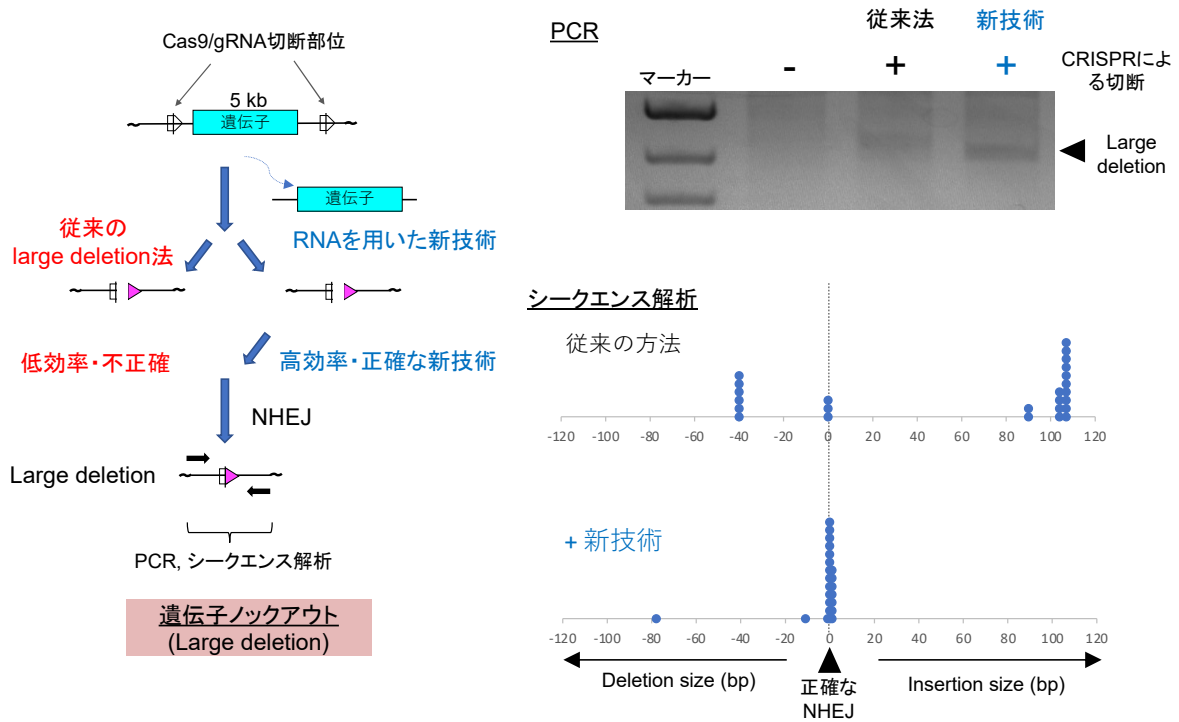


図3 RNA assisted NHEJ 法: Large deletion

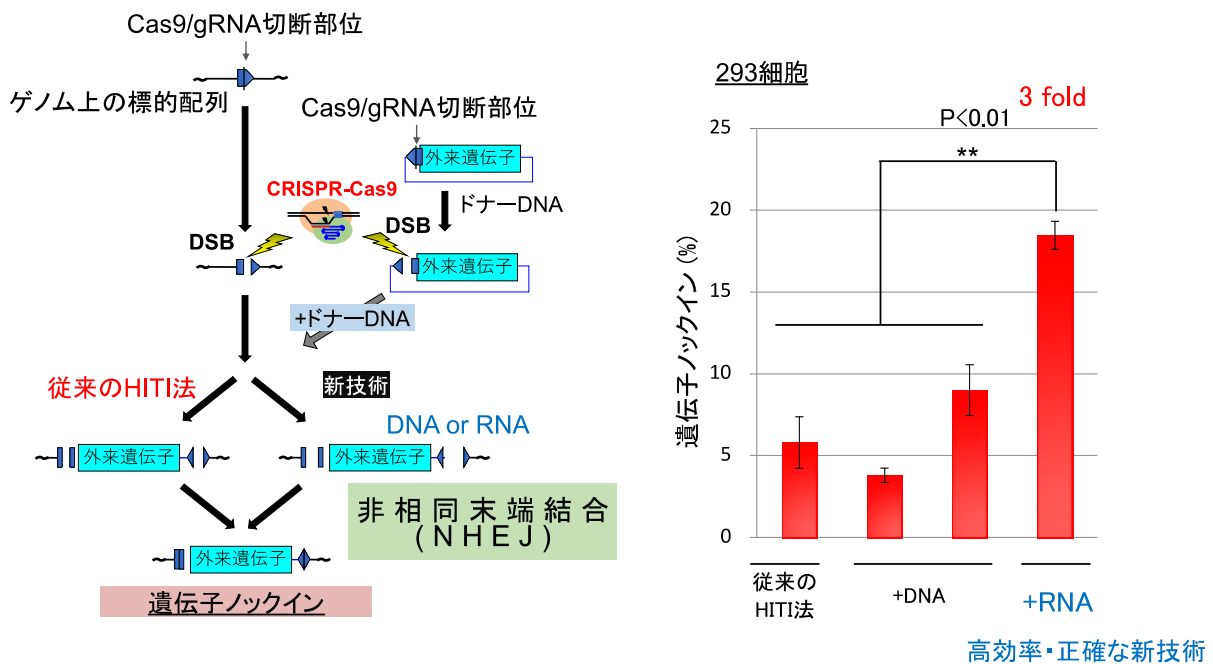


図4 RNA assisted NHEJ 法: 遺伝子ノックイン

このように本研究では、RNAを用いることで、これまで制御不能であった非相同末端結合（NHEJ）をコントロールすることが可能となり、ゲノム編集技術の精度や効率を上昇させることに成功した。今後更に改良を重ねることで、高精度・高効率なゲノム編集技術として既存のゲノム編集技術をより汎用的なものとし、2019年に認可された「ゲノム編集技術応用食品」の作出、新しいバイオ燃料の開発、ゲノム編集治療法の確立など、様々な医療・産業応用を期待している。