

要 旨

近年、目的の遺伝子を自在に改変する技術として、人工 DNA 切断酵素を基盤としたゲノム編集 (Genome Editing) が注目されている(山本, 2020)。ゲノム編集は、DNA の 2 本鎖切断(DSB)の修復過程を利用して遺伝子を改変する技術で、これまで改変が難しかった微生物や動物、植物においても遺伝子への変異導入 (ノックアウト) や外来遺伝子の挿入 (ノックイン) が可能である。人工 DNA 切断酵素としては、ZFN や TALEN に加えて、2012 年に CRISPR-Cas9 システムが発表され、その簡便かつ効率の高さに多くの研究者が驚かされた。CRISPR-Cas9 は細菌の獲得免疫システムを利用した方法で、短鎖の RNA(ガイド RNA)が標的配列に結合し、ガイド RNA と複合体を作る Cas9 スクレアーゼが DNA を切断する。ZFN や TALEN に比べて CRISPR-Cas9 の設計と作製は非常に簡単で、同時に複数の遺伝子改変も可能である。実際、この 8 年の間で CRISPR-Cas9 は誰もが使えるゲノム編集ツールとなり、ライフサイエンス研究の進め方を大きく変えている。

我々のグループでは、およそ 10 年前から第一世代の人工 DNA 切断酵素である ZFN の作製に取組み、ZFN を用いた動物胚での遺伝子発現の可視化法の開発を行ってきた(Ochiai *et al.*, 2012)。2012 年から、高活性型の TALEN(Platinum TALEN)を開発し、微生物や様々な動植物、培養細胞での遺伝子破壊や遺伝子ノックインを報告してきた。最近では、CRISPR-Cas9 システムとマイクロホモロジー媒介末端結合(MMEJ)経路を利用した新規の遺伝子ノックイン法(PITCh法)の開発 (Sakuma *et al.*, 2016)および MMEJ 経路のエフェクターを集積する LoAD システム(Nakade *et al.*, 2018)によって培養細胞において複数の遺伝子座に同時に遺伝子を挿入すること、エフェクター集積による効率的な転写活性化システムとして TREE を開発してきた(Kunii *et al.*, 2018)。さらに、MMEJ ノックインの傾向を明らかにするための NGS 解析パイプラインとして“MMEJ-assisted chromosomal integration analysis tools (MaChIAto)”を開発した。MaChIAto は、既存の変異解析汎用ツール CRISPResso と連携してより包括的な変異解析および数百種にわたる特徴解析を可能とした。

本講演では、ゲノム編集の基本原則と技術開発の動向について紹介し、ゲノム編集技術の様々な分野での基礎研究と応用研究 (バイオ燃料開発や品種改良、創薬や遺伝子治療) での可能性について議論する。

参考文献

1. 山本 卓. ゲノム編集とはなにか, 講談社ブルーバックス(2020).
2. Ochiai, H. *et al.* Zinc-finger nuclease-mediated targeted insertion of reporter genes for quantitative imaging of gene expression in sea urchin embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 10915-10920 (2012).
3. Sakuma, T. *et al.* Microhomology-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-

Cas9 with PITCh systems. *Nat. Protoc.* **11**, 118-133(2016).

4. Kunii A. *et al.* Three-component repurposed technology for enhanced expression: highly accumulable transcriptional activators via branched tag arrays. *CRISPR J.* **1**(5):337-347 (2018).
5. Nakade, S. *et al.* Biased genome editing using the local accumulation of DSB repair molecules system. *Nat. Commun.* **9**, 3270 (2018).