

# 未来を変えるゲノム編集

前原 佳代子

畿央大学健康科学部健康栄養学科、大学院健康科学研究科 (〒635-0832 奈良県北葛城郡広陵町馬見中4-2-2)

## A versatile technology for targeted genome editing has an impact on our lives.

Kayoko MAEHARA

Department of Nutrition, Faculty of Health Sciences, Kio University

Graduate School of Health Sciences, Kio University

(4-2-2 Umami-naka, Koryo-cho, Kitakatsuragi-gun, Nara 635-0832, Japan)

**要約** ゲノム編集とは、動物や植物、培養細胞において、ゲノム上の標的遺伝子の破壊や一塩基置換、レポーター遺伝子のノックインなどを可能にする遺伝子改変技術である。核酸を切断する酵素(ヌクレアーゼ)により二本鎖DNAを切断し、それに続く修復反応によって遺伝子改変を行う。広範囲にわたる生物種に利用でき、これまでの遺伝子組換えによるモデル生物・モデル細胞の作製に比べて簡易で効率よく遺伝子の改変ができるため、生命科学の基礎研究、医学研究、産業への利用と様々な分野で急速に広まっている。本稿ではゲノム編集の基本的な原理、研究・医療・産業での利用、利用に際しての倫理的な問題について解説する。

キーワード：ゲノム編集、ZFN、TALEN、CRISPR-Cas

### 1. ゲノムとは

一般的に生物種の遺伝情報は、DNAに書き込まれている。DNAの基本構造はデオキシリボース、リン酸、塩基の3つから構成され、これが鎖状に伸びたものが2本組み合わさり、二重らせん構造をとっている。4種類の塩基の並び順(塩基配列)が生物固有の遺伝情報として、子孫に継承される。生物がもつすべての塩基配列情報をゲノムと呼び、ヒトがもつすべての塩基配列情報はヒトゲノムという。タンパク質の設計図になる塩基配列は遺伝子と呼ばれ、ヒトの場合、直接タンパク質の情報になっている塩基配列(エキソン)はゲノムの1.5%である。

DNAのはたらきには、タンパク質を指令する(設計図をもとにタンパク質をつくる)、自分自身のコピーを作る(複製する)、少しずつ変化する、の3つがあげられる。DNAは放射線、紫外線、化学物質によって切断されるが、生物にはDNAに生じる損傷を修復する機構が備わっていて、生物の生存に必要な遺伝的安定性を保っている。しかし、ときに修復がされずDNAのヌクレオチド配列の変化が永続的にDNA上に

固定された場合は突然変異(変異)になる。変異は長い時間経過の過程で生物の多様性を生み出す進化の原動力として作用するが、個体にとっては病気をおこす原因になることもある。

### 2. ゲノム編集の基本的な原理

ゲノム編集では核酸を切断する酵素(ヌクレアーゼ)により標的配列特異的な二本鎖DNA切断を引き起こし、それに続く修復反応によって遺伝子改変を行う。ゲノム編集には、1996年に初めて報告されたゲノム編集技術であるジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN: zinc finger nucleases)<sup>1)</sup>、2010年に報告されたTALEヌクレアーゼ(TALEN: transcription activator-like effector nuclease)<sup>2)</sup>、そして2012年に報告されたクリスパー-キャス(CRISPR-Cas: clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated protein)がある<sup>3)</sup>。それぞれのシステムはヌクレアーゼと、標的配列にヌクレアーゼを導く案内役のDNA結合ドメインまたはガイドRNA(gRNA)からなる(表1)。ヌクレアーゼとはヌクレオチド間の結合を加水分解し、核酸を切断する酵素である。

2017年3月28日 投稿

2017年4月18日 受理

表1 ゲノム編集ツールの比較

ゲノム編集	ヌクレアーゼ	標的配列への案内役
ZFN	<i>Fok I</i>	Zinc finger protein
TALEN	<i>Fok I</i>	TALE タンパク質
CRISPR-Cas9	Cas9	guide RNA

DNAを切断する酵素としては制限酵素がよく知られている。多くの制限酵素はDNAの特定の二本鎖配列を認識し、その認識部位やその近傍でDNA二重らせんの両方の鎖のリン酸ジエステル結合を切断する酵素である。ゲノム編集のZFNやTALENで使用されるヌクレアーゼは、真正細菌*Flavobacterium okeanokoites*由来の制限酵素*Fok I*のDNA切断ドメインである<sup>1) 2)</sup>。*Fok I*のDNA切断ドメインは特定の認識配列を持たず、しかも二量体で働くため、ZFNやTALENでは近接した2つの標的配列に対してDNA結合ドメインとDNA切断ドメインを連結した人工ヌクレアーゼをペアで作成し、2つの標的配列の間に*Fok I*のDNA切断ドメインの二量体を形成させて二本鎖DNA切断を入れる。標的配列にヌクレアーゼを導く案内役として、ZFNではDNA結合ドメインとして多くの転写因子にあるジンクフィンガーと呼ばれるタンパク質ドメインが使われている。TALENでは植物病原菌*Xanthomonas*由来のTALEタンパク質を利用している。TALEタンパク質にはTALEリピートと呼ばれる33～35アミノ酸からなる繰り返し構造があり、TALEリピートの12番目と13番目の可変領域(RVD: repeat variable di-residue)のアミノ酸の並びが結合する塩基を決定している<sup>4) 5)</sup>。つまりRVDのアミノ酸の並びがアスパラギンとイソロイシン(NI)であればアデニン(A)、アスパラギンとアスパラギン(NN)であればグアニン(G)、ヒスチジンとアスパラギン酸(HD)であればシトシン(C)、アスパラギンとグリシン(NG)であればチミン(T)に結合する。

2012年、ダウドナ博士とシャンパンティエ博士らの共同研究により報告されたCRISPR-Casは細菌がもつ獲得免疫系を利用した技術である<sup>3)</sup>。真正細菌や古細菌は、ファージ(細菌に感染するウイルス)などの外来DNAが侵入すると外来DNAを断片化し自らのCRISPRと命名されたゲノム領域に取り込む。再び外来DNAが真正細菌や古細菌に侵入すると、真正細菌や古細菌のCRISPR領域が転写され、外来DNAと相同な配列を有するRNAが生成される。生成されたRNAは切断されてCRISPR RNA(crRNA)となり、crRNAはヌクレアーゼ活性をもつCasタンパク質と複合体を形成し、複合体は外来DNAに結合して外来DNAを切断する。このような仕組みで、細菌は外来DNAの侵入を防いでいる。細菌が備えているCRISPR-Casシステムは、crRNAと複合体を形成し切

断にはたらくエフェクタータンパク質が複数個あるクラスIとエフェクタータンパク質が単独であるクラスIIに分類される。また、3つのCasタンパク質、すなわちCas3、Cas9、Cas10のいずれを含むかで、タイプI、タイプII、タイプIIIに分けられる<sup>6)</sup>。現在、ゲノム編集技術に応用されているのは、クラスIIに分類されるタイプIIのCRISPR-Cas9である。Cas9はRuvC様のドメインとHNHドメインという2つのヌクレアーゼ活性を有するドメインを持つ(図1)。2つのヌクレアー

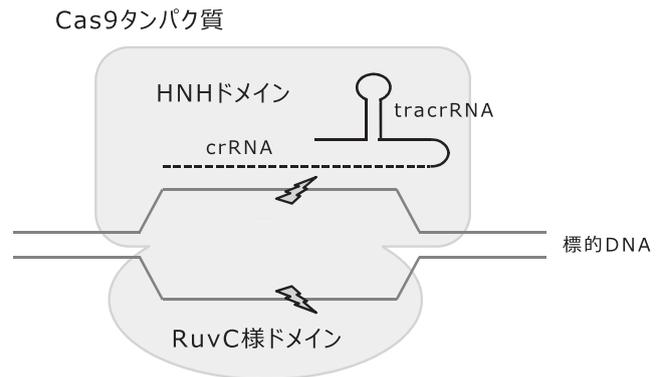


図1 CRISPR-Cas9による二本鎖DNA切断

ゼ活性を有するドメインが、標的配列の二本鎖DNAのそれぞれの鎖を切断する。細菌の獲得免疫系ではcrRNAとtrans-activating CRISPR RNA(tracrRNA)が二本鎖RNAを形成するが、ゲノム編集ではcrRNAとtracrRNAをつなげたsingle guide RNA(sgRNA)を標的配列への案内役として利用する<sup>3)</sup>。人工ヌクレアーゼのZFNやTALENの作成は煩雑な作業や多大な費用を要するが、CRISPR-Cas9はCas9とsgRNAの2つを細胞に導入することで簡単に安価にゲノム編集を行うことができる。2013年にCRISPR-Cas9が哺乳類に利用できることが報告され<sup>7) 8)</sup>、急速にその利用が広がっている(図2)。

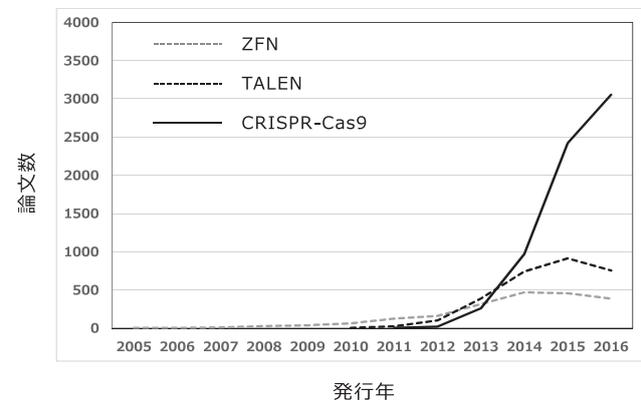
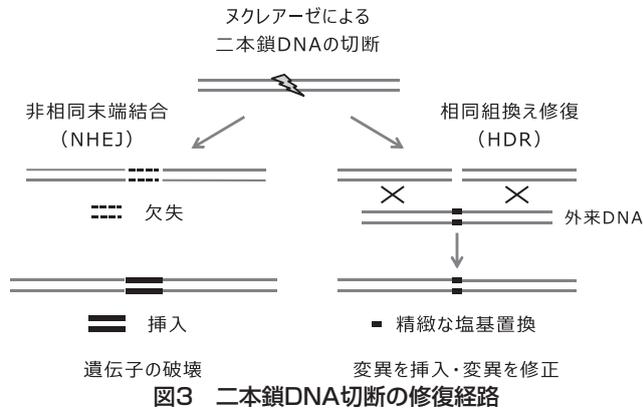


図2 ゲノム編集の論文数と発行年

PubMedCentral (PMC)で“ZFN”、“TALEN”、“CRISPR-Cas9”で検索して得られた論文数を発行年ごとに表示した。

ゲノム編集で行うゲノムの書き換えは、二本鎖

DNA切断後にどのような修復過程で修復されるかによって異なる。修復経路としては、非相同末端結合 (NHEJ : non-homologous end-joining) と相同組換え修復 (HDR : homology-directed repair) がある (図3)<sup>9) 10)</sup>。



NHEJでは鋳型になるDNAに頼らずに切断断片を結合するため、微細な欠失や挿入が生じる。タンパク質の情報をコードする領域に微細な欠失や挿入によりフレームシフト変異 (アミノ酸に翻訳する3文字の読み枠がずれる変異) を生ずれば、もともとの遺伝子の設計図にコードされているアミノ酸の配列とは異なるアミノ酸に翻訳され正常なタンパク質が生成されない、あるいはもとの設計図ではアミノ酸に翻訳されるコドンが終始コドンに置換されて翻訳が途中で止まり、不完全なタンパク質が生成されるなど、機能的な遺伝子破壊が可能になる。さらに同一染色体上の2か所でDNAを切断すれば、より大きな欠失変異を導入でき、確実に遺伝子を破壊することができる。また、複数の遺伝子領域を標的配列としてDNAを切断すれば、複数の遺伝子破壊を同時に行うこともできる<sup>11)</sup>。一方、HDRは鋳型DNAを利用したDNA修復である。標的配列と相同な配列を持つDNAを外部から導入することで、外から導入したDNAを鋳型として修復ができる。標的配列と比べて1塩基だけ配列を変えた外来DNAを用いれば、1塩基置換を導入できる。また、短いタグ配列や蛍光タンパク質GFPをコードする配列などをゲノムの標的配列と相同配列をもつ外来DNAに挿入しておくと、タグやGFPの配列をゲノムにノックインすることができる<sup>8)</sup>。標的遺伝子の配列と読み枠がずれないようにタグやGFPのDNA配列を連結・挿入すれば、タグあるいはGFPが標的遺伝子産物と融合したタンパク質を生成することができる。

### 3. ゲノム編集の問題点

ゲノム編集は、モデル生物としてよく使用されている微生物、昆虫、魚類、両生類、哺乳類、植物など様々な生物種に利用されている。DNAの組換え効率が低

いヒトの細胞ですら、従来の遺伝子改変の方法よりも格段に高い効率でゲノムの書き換えができ、画期的な技術であるが、オフターゲット作用 (off-target effect) やモザイク性という問題がある。オフターゲット作用とは、本来の標的 (on-target) とは異なる別の分子 (off-target) を阻害、あるいは活性化してしまう作用のことである。1998年にRNA干渉 (RNAi : RNA interference) という短い二本鎖RNAが配列特異的に遺伝子発現を抑制する現象が線虫で報告された<sup>12)</sup>。遺伝子をノックダウンする有用な方法としてRNAiは広く利用されているが、RNAiには外来から導入した small/short interfering RNA (siRNA) や short hairpin RNA (shRNA) と類似配列を持つRNAの転写や翻訳が阻害されるといふオフターゲット作用がみられる。ゲノム編集で生じるオフターゲット作用とは、ゲノム上に標的配列と類似の配列が存在すると、本来特異的な配列を切断するように設計されたヌクレアーゼが、類似した配列を切断し、その後の修復反応により標的配列以外にも変異を導入することである。TALENでは人工ヌクレアーゼをペアで作成し、それぞれの人工ヌクレアーゼにはTALEリピートが15~20個含まれ、標的配列に対して合計30~40塩基を認識して切断が生じるため配列特異性が高くオフターゲット作用は低いとされている。しかし、ガイド役にRNAを利用するCRISPR-Cas9では標的配列が20塩基と短く、また2~3塩基のミスマッチを許容してしまうため、オフターゲット作用が生じやすいとされている。オフターゲット作用を抑えるために、できるだけ配列特異性の高いユニークな配列を利用することが肝要であるが、それに加えてCas9の変異体を利用したダブルニッキング法<sup>13)</sup> や dead Cas9 (dCas9) の利用<sup>14)</sup> が報告されている (図4)。

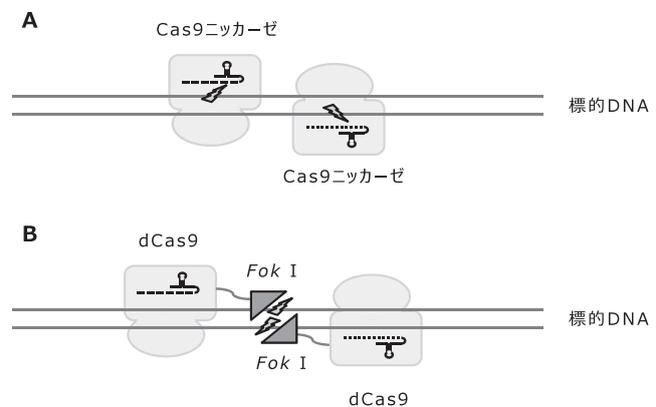


図4 Cas9変異体を利用したオフターゲット作用の抑制  
A. Cas9ニッカーゼ (D10A変異体) を利用したダブルニッキング法  
B. Fok I融合dCas9 (D10A/H840A変異体) を利用した方法

一本鎖DNA切断のことをニック (nick) といい、一本鎖DNA切断をおこす酵素をニックアーゼ (nickase、またはnicking enzyme) というが、ダブルニックング法では、Cas9ニックアーゼ (D10A変異体) を利用する。Cas9の10番目のアミノ酸をアスパラギン酸 (D) からアラニン (A) に変えるとCas9に2つあるヌクレアーゼドメインのうちRuvC様ドメインのヌクレアーゼ活性が消失する。そのため、D10A変異体はニックアーゼとして作用し、二本鎖DNA切断ではなく、一本鎖DNA切断 (ニック) を生じる。ダブルニックング法では、二本鎖DNAの標的配列に対して各々の鎖まで案内する2つのsgRNAとCas9ニックアーゼを作用させる。sgRNAとCas9ニックアーゼの複合体がペアで標的配列に結合した場合に、標的配列内の近接した場所で各々の一本鎖DNAが切断され、結果として二本鎖DNA切断を生じ、二本鎖DNA切断後の修復により標的配列特異的な変異を導入する (図4A)。仮に類似配列にsgRNAとCas9ニックアーゼの複合体が単独で作用してもニックを生じるだけであり、ニックはもう片方の切断を受けていないDNA鎖を鋳型にして正確に修復されるので、オフターゲット作用を抑制できる。

dCas9 (D10A/H840A変異体) は、10番目のアミノ酸がアスパラギン酸 (D) からアラニン (A) に、840番目のアミノ酸がヒスチジン (H) からアラニン (A) に置換されている。そのため、Cas9のRuvC様ドメインとHNHドメインのヌクレアーゼ活性がともに不活性化されてDNAを切断できない。このdCas9にZFNやTALENなどの人工ヌクレアーゼに使用されているFok IのDNA切断ドメインを融合させる。二本鎖DNAの標的配列の各々の鎖まで案内する2つのsgRNAとdCas9融合Fok I DNA切断ドメインを作用させると、sgRNAに導かれたdCas9融合Fok I DNA切断ドメインが標的配列上で二量体を形成して二本鎖DNAを切断する (図4B)。TALENやダブルニックング法と同様に、Fok IのDNA切断ドメインを融合したdCas9の利用はオフターゲット作用を抑制する有効な方法である。

モザイクとは、一人のヒトに異なる染色体構成を有する細胞が複数存在する状態をいい、モザイクの一般的な原因は受精後早期の体細胞分裂時における染色体不分離である。ゲノム編集のモザイク性とは、ひとつの個体内に、ゲノム情報が異なる様々な細胞が混在することをいう。CRISPR-Cas9では、直接受精卵にCas9とsgRNAを導入することで、遺伝子を破壊した個体が短時間で簡易に作成できる、さらに同時に複数の遺伝子をノックアウトさせた個体の作成ができるなど<sup>11)</sup>、従来から行われている一般的なノックアウトマ

ウスの作成に比べて多くの利点があげられる。ちなみに従来から行われている一般的なノックアウトマウスの作成では、散発的な低頻度のDNA傷害をたよりに相同組換えが生じることを利用するために、組換え効率がCRISPR-Cas9に比べて格段に低く、遺伝子改変した胚性幹細胞をマウスの胚盤胞に注入し、キメラマウスを作成し、さらにキメラマウスを交配させてようやく両アレルともに遺伝子を破壊した個体を得るなど、時間と手間がかかる。簡易に短時間で遺伝子破壊した個体作成ができるゲノム編集だが、ゲノム編集を施された受精卵が卵割 (細胞分裂) する過程で、割球ごとに異なるゲノムの書き換えが生じる可能性や、割球によってはゲノムの書き換えが生じない可能性があり、そのような場合にはゲノム情報が異なる細胞や組織で構成された個体になる。モザイク性の問題を減らすために、受精卵に直接Cas9タンパク質を注入して、できるだけ発生の早期に変異導入するなどの工夫がされている。

#### 4. ゲノム編集の研究への利用

ゲノム配列が明らかにされている生物種であれば、ゲノム編集を利用した標的配列のゲノム改変が可能である。ヒトをはじめ、研究室でモデル生物として使用されているゼブラフィッシュ、メダカ、アフリカツメガエル、ネッタイツメガエル、線虫、ショウジョウバエ、マウス、さらにはサル、ゴリラ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌなど大型哺乳類のゲノムプロジェクトが完了し、多くの生物種についてゲノムの配列情報が明らかにされている<sup>15) 16)</sup>。従来の遺伝子組換えなどではゲノムの改変が難しい生物種にもゲノム編集は利用でき、多くの遺伝子の機能の解析などが精力的に行われている。特にNHEJによって簡易に遺伝子破壊ができ、またHDRにより、精緻な一塩基置換などを導入することができるゲノム編集は、ヒト疾患を忠実に再現するモデルの作成や新しい治療法の提示など、生命科学の基礎研究のみならず医学研究に利用されている。現在精力的に進められている研究のうち、根治療法がない単一遺伝子疾患やがんの研究、ヒトに近い大型哺乳類を用いた疾患モデルの開発、ヒトの人工多能性幹細胞 (iPSCs: induced pluripotent stem cells)<sup>17)</sup> とゲノム編集を組み合わせた研究など、いくつかを紹介する。

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD: Duchenne muscular dystrophy) は、約3,500 ~ 5,000人に1人の頻度で伴性劣性遺伝様式をとり主に男児に発症する単一遺伝子疾患である。筋細胞膜に存在し細胞膜の裏打ちをするジストロフィンタンパク質が、遺伝子の異常

により作られず、筋細胞が非常に脆弱になる。DMDは根治的な治療法が確立されていない疾患である。ゲノム編集を利用してDMD患者から採取された培養細胞の変異を*in vitro*で修正できること<sup>18)</sup> 19)、DMD疾患モデルマウスにCas9とgRNAを投与して*in vivo*で骨格筋や心筋のジストロフィンタンパク質を回復させることができることが報告された<sup>20)</sup>。このように、ひとつの遺伝子に生じた変異が原因で発症する単一遺伝子疾患で変異が特定されている場合には、ゲノム編集は疾患の原因である変異を正常な塩基配列にまたは機能するタンパク質を生成できる塩基配列に書き換えることができるため、将来、ゲノム編集を利用した遺伝子改変は根治療法となりうる。

がんの発症には、がん原遺伝子やがん抑制遺伝子の変異が関与している。ゲノム編集を利用して複数の遺伝子の変異（がん原遺伝子を活性化させる変異やがん抑制遺伝子の機能を喪失させる変異）を導入してがんのマウスモデルが作成されている。血液の悪性腫瘍である白血病患者では、*NPM1*、*TP53*、*NRAS*、*DNMT3*、*RUNX1*、*TET2*など遺伝子変異が多く認められる<sup>21)</sup>。マウスの造血幹細胞に*Dnmt3*、*Runx1*、*Tet2*、*Nfi*（ニューロフィブロミンをコードする遺伝子でニューロフィブロミンはRASタンパク質の機能を負に制御する）など複数の遺伝子変異を導入し、これらの造血幹細胞を放射線照射したレシピエントマウスに移植すると白血病を発症することが報告された<sup>22)</sup>。また、肺の腺がん患者では、*TP53*、*KRAS*、*STK11* (*LKB1*)の遺伝子変異が多いが<sup>23)</sup>、ゲノム編集を利用してマウスの体内で*p53*、*Lkb1*遺伝子を破壊し機能を喪失させて*Kras*<sup>G12D</sup>の変異を導入すると、ヒトの腺がんと同様に、*in vivo*でマウスの肺に腺がんが形成される<sup>24)</sup>。このようにヒトで報告されているがんに関連した遺伝子変異を導入し、がんを発症させたマウスモデルが開発されている。

マウスはヒトの疾患モデルとしてよく利用されているが、ヒトの疾患が必ずしもマウスで再現できるわけではない。ゲノム編集は、従来あまり使用されることがなかった大型動物をヒト疾患モデルとして利用することに道を開いた。フォンウィルブラント病(VWD: von Willebrand disease)はフォンウィルブラント因子(VWF: von Willebrand factor)の量的・質的異常を来す遺伝性出血性疾患であり、*VWF*遺伝子の変異が原因である。マウスではVWDを再現できないが、ゲノム編集を利用してブタでVWD疾患モデルが作成された<sup>25)</sup>。また、ヒトにより近い霊長類を使用した疾患モデルも作成されている。Rett症候群は、methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) というDNA結合タンパ

ク質をコードする遺伝子の変異が原因で生じる疾患であり、X連鎖優性遺伝様式をとる。胎児が男性の場合、そのほとんどが出生前に死に至る。TALENを利用してアカゲザルやカニクイザルの受精卵に*MECP2*遺伝子の変異を導入し、変異のある受精卵を代理母ザルに戻して着床した胎仔の経過を追跡したところ、胎仔の性別が女性の場合は出産に至ったが、男性の場合には妊娠中にすべて流産した<sup>26)</sup>。ゲノム編集を利用してRett症候群のX連鎖優性遺伝様式が霊長類で再現された。

ゲノム編集のヒトへの利用には、不死化細胞・がん細胞、患者から採取した初代細胞（分裂寿命がある）や患者から採取した細胞を初期化（分化した細胞が、全能性あるいは多能性を再獲得する現象）したiPSCsなどが用いられている。患者から採取した初代細胞の疾患原因である遺伝子変異をゲノム編集により修正して、変異の修正による治療効果を*in vitro*で調べることができる<sup>18)</sup>。しかし初代細胞には分裂寿命があるため、治療に必要な細胞数の確保に限界があるなど、将来、治療につなげることも難しい。一方、幹細胞は、自分と同じ細胞を作る（自己複製、self-renewal）能力と、別の種類の細胞に分化する（differentiation）能力を持ち、際限なく増殖できる細胞である。この幹細胞の特徴に着目したヒトiPSCsとゲノム編集を組み合わせた研究が進んでいる。患者の採取しやすい場所（たとえば血液や皮膚）から細胞を取り出し、まずは初期化する。患者iPSCsは特殊な培地で無限の増殖を行うことができ、培養条件を変えることで様々な組織特異的な細胞への分化が可能である。患者iPSCsは疾患原因である遺伝子変異を持っているので、このiPSCsをある特定の組織に分化させれば、疾患の特定の組織における病態形成の過程を調べることができる。また、ゲノム編集で変異を修正した患者iPSCsは、*in vitro*での疾患の治療効果の評価や、安全性が確認できれば患者自身の治療にも利用できる。*in vitro*ではあるが、DMDの患者から採取し樹立したiPSCsを使用して、ゲノム編集によりiPSCsの遺伝子変異を修正し、ジストロフィンタンパク質が生成されることが示された<sup>19)</sup>。ヒトiPSCsでは、がん細胞に比べオプターゲット作用が低いことが報告されており<sup>27)</sup> 28)、将来、治療への応用が期待できる。

ゲノム編集はゲノムの書き換えだけにとどまらない。標的配列への案内役であるZinc finger、TALEタンパク質、あるいはヌクレアーゼ活性を失活させたdCas9に、転写因子や、ヌクレアーゼ以外の様々な酵素を融合することで、遺伝子の転写活性を上昇させる、ヒストンの修飾状態を変える、DNAの修飾（DNAメ

チル化など) 状態を変えるなど、エピゲノム編集技術も開発されている<sup>29)</sup>。

## 5. ゲノム編集の医療への利用

海外では、エイズ患者を対象としたゲノム編集による治療の臨床治験が行われている<sup>30)</sup>。エイズの原因ウイルスであるhuman immunodeficiency virus (HIV) は、ヒト白血球のCD4陽性T細胞にあるhuman chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5) というコレセプターを介して感染する。CCR5をコードする遺伝子欠損やCCR5の阻害分子がHIV感染の抵抗性を高めることにヒントを得て、エイズ患者から採血したCD4陽性T細胞のCCR5遺伝子をZFNにより破壊し、CCR5遺伝子が破壊されたT細胞を患者に戻すという治療が行われた。ゲノム編集による治療を受けた患者では、通常エイズ患者ではその減少が著しいCD4陽性T細胞が増加し、ほとんどの患者で血液中のHIVのDNA量が減少するという治療効果が得られた。ゲノム編集は研究室のベンチからベッドサイドへ、すでにその利用が開始されている。

## 6. ゲノム編集の産業への利用

これまでの品種改良は、ヒトにとって都合のよい特徴をもつ生物を交配させる、自然に発生した突然変異を見出して利用する、放射線や化学物質を使って突然変異を誘発する、などの方法を用い、多大な時間と労力を要した。ゲノム編集を利用するとこれらの品種改良も簡易に短時間で行える。京都大学と近畿大学の共同研究で、筋肉の成長を抑制するミオスタチンを破壊したマダイをCRISPR-Cas9を利用して作成し、通常の養殖マダイの約1.5倍の重量のマダイを得ている<sup>31)</sup>。乳牛の角は、ウシどうしや作業者の怪我の原因になるため、酪農家は乳牛の角を切る必要がある。この手間を省くためにTALENを利用して角のない乳牛が作成された<sup>32)</sup>。ジャガイモの芽にはソラニン、チャコニンというステロイドグリコアルカロイド (SGA: steroid glycoalkaloid) が蓄積されて、濃度が高いと食中毒の原因になる。そのため、収穫後のジャガイモは暗所・低温の環境で萌芽を抑制し、SGAの濃度が増加しないように管理される。SGAの濃度を低下させるために、SGAの前駆体のコレステロールの生合成に関わるsterol side chain reductase 2 (SSCR2) という酵素をTALENで破壊したジャガイモが作成された<sup>33)</sup>。このTALENを利用して作られたSSCR2破壊ジャガイモは生育に影響を受けることなく、コレステロールと有害物質のSGAのレベルが極めて低いことが示された。ジャガイモ以外に、シロイヌナズナ、イネ、ダイズ、

タバコなどの植物でゲノム編集が利用されている<sup>34)</sup>。海産物、畜産物、穀物へのゲノム編集の利用は将来の食料問題の解決に役立つであろう。

## 7. ゲノム編集の倫理的な問題

大変に有用なゲノム編集ではあるが、本稿の最後にゲノム編集の使用に際しての倫理的な問題について触れる。ひとつはゲノム編集を利用して作成された生物の扱い、もうひとつはゲノム編集のヒト受精卵への利用である。ゲノム編集が革新的で、急速に普及し、さらに派生した技術が次々と開発されているため、ゲノム編集技術とその技術を用いて作成された生物の評価が定まっておらず、いずれの問題も結論は出ていない。

遺伝子組換え生物等の使用等に関しては、国内ではカルタヘナ法 (正式名称: 遺伝子組換え生物等の使用の規制による生物の多様性の確保に関する法律) で規制されている。カルタヘナ法では、遺伝子組換え生物等を「細胞外において核酸を加工する技術、異なる分類上の科に属する生物の細胞を融合する技術によって得られた核酸またはその複製物を有する生物」と定義し、遺伝子組換え生物等の使用等に際して執るべき拡散防止措置が定められている。ゲノム編集を利用して作成された生物には、遺伝子組換え生物等に該当するものと、遺伝子組換え生物等の範疇から外れる可能性があるものがある。ゲノム編集を利用して作成された生物をどのように扱うべきか、議論されている<sup>35)</sup>。

ヒト受精卵でのゲノム編集の利用について、2015年4月に中国の中山大学のグループがヒトの異常な受精卵 (1つの卵子に2つの精子を受精させた3倍体) にゲノム編集を用いて遺伝情報の改変を行ったことを報告した<sup>36)</sup>。この論文は当初NatureやScienceに投稿されたが、倫理的に問題があるという理由で雑誌社から掲載を拒否された<sup>37) 38)</sup>。その後も2016年4月に中国の広東医科大学などのグループがヒトの異常な受精卵で行ったゲノム編集の研究を<sup>39)</sup>、さらに2017年3月には中国の北京放射医学研究所などのグループがヒトの正常な受精卵にゲノム編集を施した研究を報告した<sup>40)</sup>。ヒト受精卵のゲノム編集を巡っては、2015年12月に米国科学アカデミー (NAS: National Academy of Sciences)、米国医学アカデミー (NAM: National Academy of Medicine)、中国科学院、英国王立協会が主催するヒトゲノム編集国際サミットが開催されて、声明が出された<sup>41)</sup>。声明には、初期のヒト胚もしくは生殖細胞系列へのゲノム編集を伴う基礎研究は適切な法的、倫理的なルールと監視のもとで、研究がなされるべきであること、臨床利用については多くの問題があるので、安全性や効果が確認され、社会的なコンセ

ンサスを得るなどのある一定の条件を満たさない限り、臨床利用をすることは無責任であること、持続的な議論の場として国際フォーラムが必要であることなどが盛り込まれた。2017年2月にNASとNAMが、遺伝性疾患で他に代替治療がないなどいくつかの基準を満たした場合に限り、適切な規制と厳しい監視のもと、将来的にはゲノム編集をヒト受精卵へ利用することを容認するという報告書をまとめた<sup>42)</sup>。日本では、内閣府の総合科学技術・イノベーション会議の生命倫理専門調査会が2016年4月に「ヒト受精胚へのゲノム編集技術を用いる研究について」(中間まとめ)<sup>43)</sup>、2016年12月には、「ヒト受精胚へのゲノム編集技術を用いる研究について」-中間まとめ後の検討結果及び今後の対応方針-を公表した<sup>44)</sup>。中間まとめでは、ゲノム編集技術を用いるヒト受精胚の臨床利用については現時点では容認できないとの立場を明確に示し、その一方で「胚の初期発生や発育(分化)における遺伝子の機能解明」に係る基礎研究において、容認される場合があるとしている。中間まとめ後の検討結果及び今後の対応方針では、容認される基礎的研究が備えるべき条件や具体的な管理方法について検討がなされ、各倫理審査委員会で判断できるようなガイダンス等の作成やさらなる検討など今後の対応方針が示されている。しばらくは、ゲノム編集を施した受精卵を母胎に戻さないことを条件に基礎研究が進められると思われる。

## 文献

1. Kim Y.-G. et al.: Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *Fok* I cleavage domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 1156–1160, 1996
2. Cristian M. et al.: Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics 186: 757–761, 2010
3. Jinek M. et al.: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337: 816–821, 2012
4. Boch J. et al.: Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science 326: 1509–1512, 2009
5. Moscou M. J. and Bogdanove A. J.: A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science 326: 1501, 2009
6. Makarova K. S. et al.: Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nat. Rev. Microbiol. 9: 467–477, 2011
7. Cong L. et al.: Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339: 819–823, 2013
8. Mali P. et al.: RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339: 823–826, 2013
9. Joung J. K. and Sander J. D.: TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 14: 49–55, 2013
10. Gaj T. et al.: ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends Biotechnol. 31: 397–405, 2013
11. Wang H. et al.: One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell 153: 910–918, 2013
12. Fire A. et al.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391: 806–811, 1998
13. Ran F. A. et al.: Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell 154: 1380–1389, 2013
14. Guilinger J. P. et al.: Fusion of catalytically inactive Cas9 to *Fok* I nuclease improves the specificity of genome modification Nat. Biotechnol. 32: 577–582, 2014
15. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) の「Organisms: Complete Genomes」のホームページ (ゲノムプロジェクトが完了した生物種の一覧  
[http://www.genome.jp/kegg/catalog/org\\_list.html](http://www.genome.jp/kegg/catalog/org_list.html))
16. NCBIの「Genome Information by organism」のホームページ  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>
17. Takahashi K. et al.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131: 861–872, 2007
18. Ousterout D. G. et al.: Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. Nat. Commun. 6: 6244, 2015
19. Li H. L. et al.: Precise correction of the dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. Stem Cell Rep. 4: 143–154, 2015
20. Nelson C. E. et al.: In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Science 351: 403–407, 2016

21. The Cancer Genome Atlas Research Network: Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 368: 2059–2074, 2013
22. Heckl D. et al.: Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol.* 32: 941–946, 2014
23. The Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 511: 543–550, 2014
24. Platt R. J. et al.: CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell* 159: 440–55, 2014
25. Hai T. et al.: One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res.* 24: 372–375, 2014
26. Liu. H. et al.: TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. *Cell Stem Cell.* 14: 323–328, 2014
27. Smith C. et al.: Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell.* 15: 12–13, 2014
28. Veres A. et al.: Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *15: 27–30, 2014*
29. Thakore P. I. et al.: Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. *Nature Methods* 13: 127–137, 2016
30. Tebas P. et al.: Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 370: 901–910, 2014
31. NHK「ゲノム編集」取材班：ゲノム編集の衝撃、NHK出版、p27–45, 2016
32. Carlson D. F. et al.: Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nat. Biotechnol.* 34: 479–481, 2016
33. Sawai S. et al.: Sterol side chain reductase 2 is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, the common precursor of toxic steroidal glycoalkaloids in potato. *Plant Cell* 26: 3763–3774, 2014
34. 山本卓編：ゲノム編集入門、裳華房、p160–183, 2016
35. 全国大学等遺伝子研究支援施設連絡協議会の「ゲノム編集技術を用いて作成した生物の取り扱いに関する声明」のホームページ  
<http://www1a.biglobe.ne.jp/iden-kyo/genome-editing1.html>
36. Liang P. et al.: CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell* 6: 363–372, 2015
37. Lanphier E. et al.: Don't edit the human germ line. *Nature* 519: 410–411, 2015
38. Cressey D. and Cyranoski D.: Publishing Policy. Gene editing poses challenges for journals. *Nature* 520: 594, 2015
39. Kang X. et al.: Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J. Assist Reprod. Genet.* 33: 581–588, 2016
40. Tang L. et al.: CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol. Genet. Genomics* 2017, DOI 10.1007/s00438-017-1299-z
41. ヒトゲノム編集国際サミットの声明 (On Human Gene Editing: International Summit Statement) の全文が記載されているホームページ  
<http://www8.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?RecordID=12032015a>
42. 米科学アカデミー (NAS : National Academy of Sciences) の報告書についてのホームページ  
<http://www.nasonline.org/news-andmultimedia/news/Human-Genome-Editing-Report.html>
43. 内閣府の生命倫理専門調査会 「ヒト受精卵へのゲノム編集技術を用いる研究について」(中間まとめ)  
<http://www8.cao.go.jp/cstp/tyousakai/life/chukanmatome.pdf>
44. 内閣府の生命倫理専門調査会 「ヒト受精卵へのゲノム編集技術を用いる研究について」-中間まとめ後の検討結果及び今後の対応方針-  
<http://www8.cao.go.jp/cstp/tyousakai/life/houshin.pdf>
35. 全国大学等遺伝子研究支援施設連絡協議会の「ゲ