バイオ技術最前線②

ゲノム編集技術の発展と海外の実験教育

大藤道衛
専門学校東京テクニカルカレッジ・バイオテクノロジー科

ゲノム編集技術の根幹は、細胞内でDNAが切断された後、細胞がもつ修復機構による切断部位への変異導入あるいは相同組換えによるDNA断片の挿入による遺伝情報の改変である[1)]。この技術で重要な役割を果たす分子が、人工制限酵素でありゲノム編集ツールと呼ばれている。1996年に報告されたDNA結合ドメインとDNA切断ドメインをもつDNA人工制限酵素Zincフィンガータンパク質[2)]よりゲノム編集技術は生まれ（第一世代）、2010年に報告されたTALEN[3)]へと進展した（第二世代）。しかし、人工制限酵素の調製や実験の煩雑さから、なかなか普及には至らなかった。

一方、2012年に報告されたRNA誘導型酵素系であるCRISPR-Cas9[4)]により、ゲノム編集技術の汎用性が高まり、現在では生命科学研究の基礎技術のみならず、バイオテクノロジーの基盤技術として広く応用されている（第三世代）。RNA誘導型酵素は、DNA切断ドメインをもつCas9ヌクレアーゼであり、標的遺伝子に対するガイドRNAが認識するDNA配列を、特異的に２本鎖切断（DSB）することが可能である[1)]。DSB部位では、非相同性末端結合（NHEJ）で生ずる塩基の挿入・欠失などの修復エラーにより遺伝子のノックアウトが可能である。一方、外来遺伝子をドナーDNAとして共存させるとDSB部位での相同組換え（HR）による遺伝子ノックインも可能である。これは、遺伝子組換え実験と同じであるが、遺伝子の挿入部位が正確に決められる。実験では主に化膿性連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）由来のCas9が用いられてきたが、より低分子の黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）由来Cas9も使われている[5)]。

2020年、CRISPR-Cas系の開発者であるEmmanuelle CharpentierとJennifer A. Doudnaが、ノーベル化学賞を受賞している[6)]。

ゲノム編集技術は遺伝子改変によるモデル動物をはじめ、遺伝子ノックアウト動物の報告がなされている[1)]。また、NHEJで生ずる変異による遺伝子ノックアウトは、農作物の育種技術にも活用されている[7)]。2016年には、CRISPR-Cas9系によりポリフェノールオキシダーゼをノックアウトすることで作出した褐変しにくいマッシュルームが、米国農務省（USDA）の規制範囲外とされ流通が可能となった[8)]。我国においては、高濃度のγアミノ酪酸（GABA）を含むトマト（GABA高蓄積トマト）がCRSPR-Cas9を用いたゲノム編集技術により開発され[9)]、厚生労働省への届け出を経て、2021年より家庭菜園向け苗の提供、青果物の販売が開始されている。

一方、RNA誘導型酵素のCasファミリーのうちCas12a、Cas13、Cas3などは、１本鎖DNAをランダムに切断するコラテラル切断活性（collateral cleavage activity）を有する。このようなCasを用いたCRISPR-Cas系による核酸の高感度検出法が開発され、SARS-CoV-2検出法として活用されている。実際の検出では、まずウイルスのRNAを逆転写してDNAとして増幅する。続いてガイドRNAが目的とするウイルス塩基配列を捉えCas酵素が切断する際に、色素等が結合した１本鎖オリゴヌクレオチドプローブを共存させる。ここで、コラテラル活性により１本鎖プローブは切断され、オリゴヌクレオチドプローブならびに切断された低分子核酸となる。これらの核酸を認識する特異的な抗体を用いてイムノクロマトを行うことでプローブの切断が起こったか否か、すなわちウイルスの塩基配列の有無を簡便に検出できる[10, 11, 12)]。PCRを用いず等温増幅法を組み合わせた検出系には、Cas12aを用いたDNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter（DETECTR）[10)]、Cas13aを用いたSpecific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing（SHERLOCK）[11)]、Cas3を用いたCas3 Operated Nucleic Acid detectioN（CONAN）[12)]がある。

いずれもCasコラテラル活性を用いることで、短時間で微量の核酸を検出できる。

このようにゲノム編集技術が急速に発展する中、ゲノムリテラシー教育においても実体験を通じてゲノム編集を学ぶ教材が、米国バイオ企業で開発され学校教育で活用されている。このキットはBio-Rad Laboratories社[注]が開発し、Out of the Blue CRISPR kitとして、2020年より米国内で市販されている。

実験は、大腸菌の平板培養系にて実施する。実験ではβガラクトシダーゼ遺伝子（*LacZ*）ならびにCas9とDNA修復系を有する大腸菌に、*LacZ*の一部を標的とするガイドRNAを導入し、CRISPR-Cas9の系で特異的に*LacZ*を切断（DSB）する。このときDNA修復系によりストップコドンを含むドナー DNAが*LacZ*に相同組換え（HR）で挿入されると、*LacZ*はノックアウトされβガラクトシダーゼが不活化する。この実験は、βガラクトシダーゼの人工基質であるX-galが含まれた培地を用いて行っている。このためβガラクトシダーゼが正常に機能する場合は、X-galが分解され青色の色素が生成され青いコロニーが形成される。一方、相同組換え（HR）によりドナー DNAが挿入された*LacZ*からは活性型のβガラクトシターゼが発現しないため、白いコロニーが形成される（**図1**）。このように、コロニーの色の違いで、ゲノム編集による遺伝子ノックアウトの有無を判別できる。さらに、挿入されたドナー DNA断片の有無を、挿入部位を認識する特異的なプライマーを用いたPCR増幅と電気泳動解析により検出できる。本キットには、プライマーを始め全ての試薬が含まれているGenotyping Extension Kitがオプションとして市販されている。この製品は、電気泳動解析によりゲノム編集の分子メカニズムも学べる実験系である。

実際に本キットを用いた結果では、ガイドRNA添加系ではCas9による*LacZ*のDSB後、ストップコドンを含むドナー DNAの相同組換え（HR）による挿入を行った大腸菌のコロニーは青く発色せず、βガラクトシターゼがノックアウトしていることを視覚的に観察できた（**図2**）。さらに、ドナー DNAを認識する特異的プライマーをもちいたPCR増幅と電気泳動結果から～650 bp付近にドナー DNAの挿入が確認できた（**図2**、(←)）。この結果には再現性があり、キットに付属する生徒・学生用マニュアル、教師用マニュアルを用いることで実験を含む授業に容易に活用できることが示唆される。

米国では、このような教育キットが、大学等の高等教育機関ばかりでなく、高等学校や中等教育機関の実験授業において用いられ、ゲノム編集を身近な技術として理解する素地を作っている。

2022年6月27日のニューヨーク・タイムスは、“CRISPR in the Classroom”と題し、この製品を用いた現場の教員からの感想や評価が紹介され注目されている[13]。

新しいバイオ技術や遺伝子解析技術の普及は、医療、農業、産業に新たなイノベーションに繋がっている。これに伴い、一般市民のゲノムリテラシーの醸成には、新しい技術に触れ体感できる実験教育が重要である[14]。ゲノム編集技術は、医学研究や育種に貢献しているばかりでなく、新たな高感度検査方法の開発にも寄与している。そして教育現場にてゲノム編集実験を行うことは、生徒・学生、一般市民がゲノム編集技術の有用性を理解し、社会実装におけ

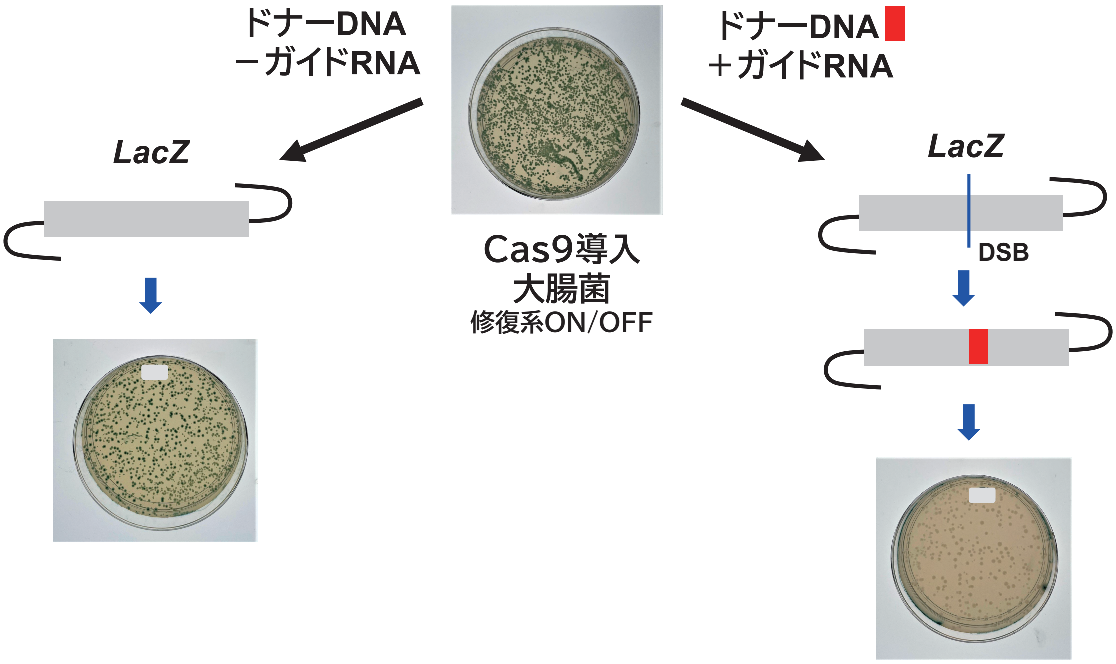
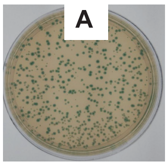
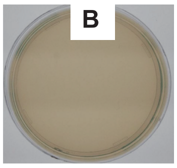
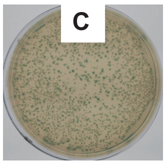
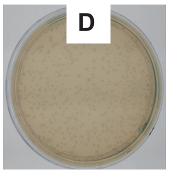


図1　大腸菌のゲノム編集

DNA修復系を含むCas9組換え大腸菌へのドナー DNA（ストップコドンを含むDNA断片）の挿入。培地には人工基質（X-gal）が含まれており、*LacZ*が発現するとコロニーは青くなる。一方、ガイドRNAを加えた系では、Cas9による*LacZ*の切断（DSB）、修復系によるドナー DNAの挿入（HR）が起こり*LacZ*はノックアウトされることで、*LacZ*の発現は抑制され白いコロニーとなる。

	A	B	C	D
プレート				
修復系	−	−	＋	＋
ガイドRNA	−	＋	−	＋
コロニー	＋	−	＋	＋

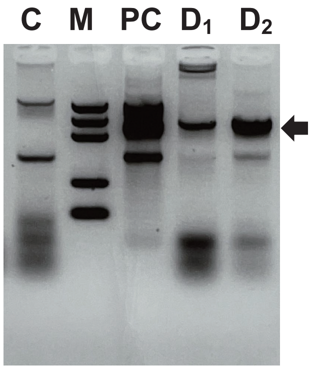


図２　実際のノックアウト実験とPCR-電気泳動の結果

修復系（＋）：修復酵素反応（HR）あり、修復系（−）：修復酵素反応（HR）なし、ガイドRNA（＋）：*LacZ*の切断（DSB）あり、ガイドRNA（−）：*LacZ*の切断（DSB）なし、コロニー（＋）：青色コロニー、コロニー（−）：白色コロニー

電気泳動実験サンプル

C：プレートCのコロニーから抽出したDNAサンプル（ドナーDNA断片未挿入。青コロニーの大腸菌）、M：塩基対マーカー（1,000、700、500、200、100 bp）、PC：陽性コントロール*（〜1,100、〜650、〜350 bp）、D_1、D_2：プレートDのコロニーから抽出したゲノム編集DNAサンプル（ドナーDNA断片挿入。白コロニーの大腸菌）

＊PCの各DNA断片サイズ：〜1,100 bp DNA断片は、ドナーDNA未挿入の対照実験、ドナーDNA配列挿入サイトのプライマーによる増幅産物；〜650 bp DNA断片は、ドナーDNA配列のプライマーによる増幅産物（図中←表示）；〜350 bp DNA断片は、PCR増幅の対照実験であり*LacZ*以外のゲノムDNA上のプライマーによる増幅産物。

る問題点を科学的な視点から議論できる素地を作ることになる。日本においてもゲノム編集技術は、医学研究や遺伝子検査、さらにはGABA高蓄積トマトを始め、ゲノム編集農作物の社会実装が始まっている。すでに先行している米国の教育事情に目を向け、我国の教育事情に適応したゲノムリテラシー教育を模索することが必要であろう。

（注）Bio-Rad Laboratories社は、教育機関向けの分子生物学実験教材シリーズとしてBio-Rad Explorerを1990年代から市販している[15]。同社からは、日本においても教育目的遺伝子組換え実験[16]として高等学校等の教育機関で実施できるpGLO Bacterial Transformation kit（GFP遺伝子を大腸菌に導入し、遺伝子発現を蛍光で観察できる遺伝子組換え実験キット）を始め、様々な教育キットが市販されている。

参考文献

1）永井慎 ゲノム編集 バイオテクニシャン 24(2)：5-9.（2016）

2）Kim YG, Cha J, and Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93: 1156–1160.（1996）
doi: 10.1073/pnas.93.3.1156

3）Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics 186:757-761.（2010）
doi: 10.1534/genetics.110.120717. Epub 2010 Jul 26.

4）Jinek M, Chylinski K, Fonfara I A, et al. Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. Science 337: 816-821.（2012）
doi: 10.1126/science.1225829

5）Ran FA, Cong L, Yan WX, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9 Nature 520: 186–191（2015）
doi: 10.1038/nature14299

6）The Nobel Prize in Chemistry
https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/summary/

7）江面浩：ゲノム編集食品の動向と高GABAトマトの開発・実用化について 野菜情報（独立行政法人 農畜産振興機構）2020年１月号：34-40.（2020）

8）Waltz E Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. Nature 532: 293.（2016）
doi: 10.1038/nature.2016.19754

9）Nonaka S, Arai C, Takayama M et al. Efficient increase of γ-aminobutyric acid（GABA）content in tomato fruits by targeted mutagenesis. Sci. Rep. 7:7057.（2017）
doi: 10.1038/s41598-017-06400-y

10）Broughton JP, Deng X, Yuet G, et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2 Nat. Biotechnol. 38: 870–874.（2020）
doi: 10.1038/s41587-020-0513-4

11）Patchsung M, Jantarug K, Pattama A, et al. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of

SARS-CoV-2 RNA. Nat Biomed Eng 4: 1140-1149.（2020）
doi: 10.1038/s41551-020-00603-x

12）Yoshimi K, Takeshita K, Yamayoshi S, et al. CRISPR-Cas3-based diagnostics for SARS-CoV-2 and influenza virus. iScience 25: 103830.（2022）
doi: 10.1016/j.isci.2022.103830. Epub 2022 Jan 30.

13）Lutz E. CRISPR in the Classroom The New York Times June 27, 2022.
https://www.nytimes.com/interactive/2022/06/27/science/crispr-anniversary-classroom-explainer.html

14）大藤道衛 遺伝子解析技術とゲノムリテラシー教育 医療と検査機器・試薬43:268-275.（2020）

15）Bio-Rad Explorer
http://explorer.bio-rad.com

16）高等学校等において教育目的で行われる遺伝子組換え実験の「遺伝子組換え 生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」における取扱いについて（文部科学省　平成16年２月18日）
https://www.biodic.go.jp/bch/download/law/notification_mext_E16021.pdf

◆著者紹介

大藤　道衛　Michiei Oto

専門学校東京テクニカルカレッジ・バイオテクノロジー科講師、1980年千葉大学園芸学部農芸化学科卒、医学博士（東京医科歯科大学）。日本バイオ技術教育学会顧問、日本電気泳動学会評議員、日本DNAアドバイザー協会理事。

主な著書：「ゲノム情報解析－次世代シーケンサーの最新の方法と応用－」共監訳NTS（2016)、「そこが知りたい！電気泳動なるほどQ＆A改定版」羊土社（2012)、「バイオ実験超基本Q&A 改訂版」 羊土社（2010）他。
専門分野：DNA診断技術、遺伝子リテラシー教育