

切れないハサミも使いよう

田中 晃一

2012年に報告されたCRISPR/Cas9法¹⁾によりゲノム編集技術の進歩は加速し、ついに全生物のゲノムを自由自在に改変できる時代の幕が開かれようとしている。それ以前のゲノム編集は、標的ごとに別々の人工ヌクレアーゼ (ZFN, TALEN) を設計する必要がある、煩雑で時間やコストがかかることが難点であった。それに対しCRISPR/Cas9法は、ガイドRNA (guide RNA; gRNA) 配列を変更するだけで任意のDNA配列を切断できる汎用性と、非常に高い編集効率を併せ持つツールとして大きな注目を浴び、早くもノーベル賞最有力候補との呼び声も高い。現在、連日のように関連論文が発表され、生物学分野でもっともホットな領域となっている。CRISPR/Cas9法の基本原理や遺伝子欠損マウス作製への応用などは、最近の総説²⁾や水野氏の稿³⁾を参照いただくとして、本稿ではこの技術のゲノム編集以外への応用について紹介したい。

CRISPR/Cas9の実体はgRNAとエンドヌクレアーゼ (Cas9) の複合体である。Cas9はgRNAに相補的な配列を有する標的DNAと結合し、隣接のPAM配列上流に二本鎖切断を導入する (図1A)。これまでCas9は二本鎖DNAにしか反応しないと考えられていたが、一本鎖RNAを認識させる新たな手法が見いだされた⁴⁾。Cas9が二本鎖DNAと結合して切断するためには、gRNAの認識領域だけでなく、すぐ下流の相補鎖に存在するPAM配列が必要である。O'Connelらは類似の構造を構築すれば、Cas9が一本鎖RNAにも作用できるようになるのではないかと考えた。そこで、PAMに相当する領域と相補的な一本鎖DNA (PAMmer) を系に加えたところ、予想通りCas9は一本鎖RNAと結合し、gRNA依存的に正確にRNAを切断することが明らかとなった (図1B)。さらにPAMmer配列の最適化が行われ、標的RNAの鋳型であるゲノムDNAは切断せず、転写された標的RNAのみを切断する技術が確立された。これま

で、任意のRNAを配列特異的に切断することは非常に困難であったが、この技術を用いれば、DNAと同様の機構で自由にRNAを切断できるようになる。また、Cas9の代わりに、活性中心に点変異を導入してヌクレアーゼ活性を欠損させた「不活性型Cas9」(dead Cas9; dCas9) を使うことで、この系はまったく新たなツールに早変わりする。つまり、標的RNAと結合しても切断しないdCas9は、狙った一本鎖RNAを標識する目的で利用可能である。従来、RNAの精製や細胞内局在解析には、主にオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせる方法が用いられてきたが、多くの場合、相互作用しているタンパク質の除去や細胞の固定、高温・高塩濃度での洗浄など、RNAの高次構造や生理活性を損なう処理が必要であった。それに対し、dCas9を用いる方法であれば、細胞粗抽出液からのRNA-タンパク質複合体の精製や生細胞内でのRNA局在観察など、より生理的な条件で解析できる。さらに、翻訳活性化因子や翻訳抑制因子との融合dCas9を用いた翻訳制御や、スプライシング因子との相互作用を変化させてスプライシングのタイミングやパターンを制御する用途も想定できる。

ゲノムDNA研究においてもdCas9は大きな可能性を秘めている。QiらはdCas9をゲノム上の遺伝子のプロモーター領域にリクルートすると、転写を強く抑制することを発見した⁵⁾。CRISPRi (CRISPR interference) と名付けられたこの方法は、特異性の高い転写抑制法としてさまざまな分野への応用が期待されている。さらに、GFPとの融合タンパク質を利用して特定DNA領域を可視化する技術や、エピトープタグを融合してゲノム上の特異的配列を精製する技術 (ChIP) への活用など、今後さまざまな技術への応用が見込まれる。現在、ゲノム編集技術としての注目度が非常に高いCRISPR/Cas9であるが、「切れないハサミ」を任意の核酸配列に自在に結合させるという活用法もまた、近い将来、生物学研究に欠かすことができない技術として、揺るぎない地位を獲得するのではないだろうか。

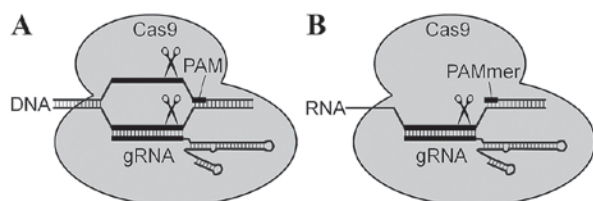


図1. CRISPR/Cas9によるDNA/RNAの切断様式。A：二本鎖DNAの切断。B：一本鎖RNAの切断。

- 1) Jinek, M. *et al.*: *Science*, **337**, 816 (2012).
- 2) Doudna, J. A. and Charpentier, E.: *Science*, **346**, 1258296 (2014).
- 3) 水野聖哉: *生物学*, **93**, 757 (2015).
- 4) O'Connel, M. R. *et al.*: *Nature*, **516**, 263 (2014).
- 5) Qi, L. S. *et al.*: *Cell*, **152**, 1173 (2013).