

CRISPR/Cas

～その発見からゲノム編集技術への応用まで～

石野 良純

「ゲノム編集」という言葉が世の中を賑わしており、生命科学者でなくとも気になるこの頃である。汎用性のあるゲノム編集技術の開発は生命科学に新たな革命をもたらしたといってもよい。ゲノム編集とは、生物のゲノムDNAの任意の位置を切断して、狙った遺伝子を人工的に操作する技術である。これはまさに現代生命科学が求める技術であり、その開発は昨今始まったわけではなく、人工ヌクレアーゼを用いてゲノムDNAを目的の位置で切断する技術開発が長年にわたり粘り強く続けられてきた。最近、脚光を浴びているRNA誘導型ヌクレアーゼCRISPR/Cas9システムは、その簡便性の高さにより急速に普及し、多くの研究者にゲノム編集を身近なものとして感じさせることになった。このシステムで重要なCRISPRは、筆者が大腸菌の遺伝子解析をしていた1986年にたまたま発見したもので、当時は機能が不明な奇妙な繰り返し配列であったが、これが30年の時を経てゲノム編集技術に応用されたことには感慨深いものがある。本稿ではCRISPRの発見当時から、ゲノム編集技術への応用までを概説したい。

ゲノム編集技術開発を目指して

ある遺伝子の機能を知りたい時に、その遺伝子が改変された変異体が得られれば、野生型生物と比較して表現型がどのように変化するかを調べることができる。そのために、ゲノムDNA上の狙った遺伝子領域を切断して、特定の遺伝子に対して人工的に置換、削除、挿入などの操作をする技術があれば都合が良い。生物が有する相同的DNA組換え能を利用して標的の遺伝子を改変するジーンターゲットング技術は、それが比較的容易な微生物の一部のモデル生物で盛んに用いられてきた。この方法を高等真核生物にも利用したノックアウトマウス作製技術が1989年に開発されると、作製までに煩雑な操作と長い時間を要するにも関わらず、その有用性により多くの研究に利用されてきた。この技術は2007年ノーベル賞授賞の対象になった。しかし、ゲノム上の特定部位を狙って二本鎖切断を起こすことができれば、ノックアウトマウス技術に比べて遥かに簡単に遺伝子操作が行え

るという考えにより、新たな遺伝子操作技術の開発努力は続けられてきた。制限酵素のFokIはヌクレアーゼドメインとDNA認識ドメインが分離した構造をもつため、この酵素のDNA認識ドメインをジンクフィンガーモチーフに置換したZFN (zinc-finger nuclease) やキサントモナスの転写エフェクターであるTALE (transcription activator-like effector) タンパク質のDNA認識モジュールに置換したTALEN (TALE nuclease) という人工ヌクレアーゼが開発され、その応用が「ゲノム編集」技術として広く認識されるようになった¹⁾。その後を追うように登場したCRISPR/Cas9の利用によって「ゲノム編集」は、操作が大幅に簡略化されて利用範囲が広がり、実用的遺伝子操作技術として一気に開花した。

CRISPRへの接近

塩基配列解読技術の発展によって、微生物程度の大きさの全ゲノム配列が比較的容易に解読されるようになる。原核生物のゲノム中に多くの繰り返し配列 (short sequence repeats; SSRs) が広く存在することが明らかになってきた²⁾。繰り返し配列には、繰り返し単位が連続的につながっているものと、繰り返し単位間に保存性のないスペーサー配列が存在するものがある。これらのSSRsは同じ細菌でも株ごとに多様である。SSRsは一般的に遺伝子の転写や翻訳の制御に関わり、その違いによって表現型に多様性をもたらすことが、細菌の環境適応に寄与しているのではないかと想像されてきた。CRISPRは原核生物のSSRsの一種であり、clustered regularly interspaced short palindromic repeatsから生まれた略称である³⁾。この配列は1980年代後半に筆者が行った、大腸菌のリン酸代謝に関わるアルカリホスファターゼ (AP) に関する研究の過程で見つかった⁴⁾。APは核酸鎖の末端のリン酸を切除する酵素として遺伝子工学にも利用されている有名な酵素である。この酵素はホモ二量体で構成され、サブユニットタンパク質のN末端のアルギニン (Arg) の有無により3種類のアイソザイムが存在する (図1)。すなわち、両サブユニットともにArgを保有しているものがアイソザイム1、片方だけの

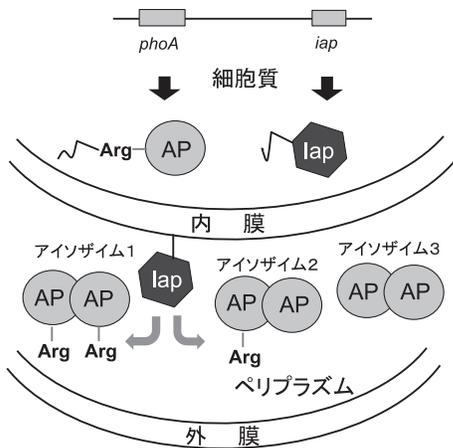


図1. 大腸菌のアルカリホスファターゼのアイソザイム形成機構。シグナル配列を有するアルカリホスファターゼ (AP) は、細胞質で合成された後ペリプラズムに分泌される。Iapタンパク質もシグナル配列を有するが、完全に分泌されずに、内膜に結合したままAPに作用し、N末端に存在するArgを切断する。APはホモ二量体なので各分子のN末端Argの有無で3種類の分子 (アイソザイム1, 2, 3) が形成される。

ものはアイソザイム2、そして両方ともArgがないものはアイソザイム3と呼ばれる。アイソザイム間でのホスファターゼ活性は変わらないので、このアイソザイム形成の生理的意味は不明であるが、アイソザイム形成が起こらない(1型のみ産生される) 変異株が単離されたことから、アイソザイム形成の原因遺伝子が存在すると予想して *iap* (isozyme conversion of alkali phosphatase) と名付けられた⁵⁾。そして、野生株のDNAを用いて作製した遺伝子ライブラリーを *iap* 変異株に導入してアイソザイム2, 3が産生されたクローンを選択することによって *iap* 遺伝子が同定された。この遺伝子がコードする Iap タンパク質は、シグナル配列を有するタンパク質で内膜に入り込むが、完全に通過できずに内膜に結合したままペリプラズム中のAPに作用してN-末端のArgを切断するアミノペプチダーゼであった⁴⁾ (図1)。この *iap* 遺伝子の塩基配列解読実験がCRISPRとの出会いにつながった。

CRISPRの発見

プラスミドベクター上にクローニングされたDNA断片の解読を進め、*iap* 遺伝子の翻訳領域を推定することができた。翻訳読み枠の終止コドン (TGA) はクローニングされたDNA断片の末端から300ヌクレオチドほど上流に見つかった。しかし、その下流も転写調節に関わる可能性があったため、クローニングされたDNAの末端までの解読を進めてみた。するとそこには奇妙な配列が載っていた。この領域は、高次構造をとりやすい鋳

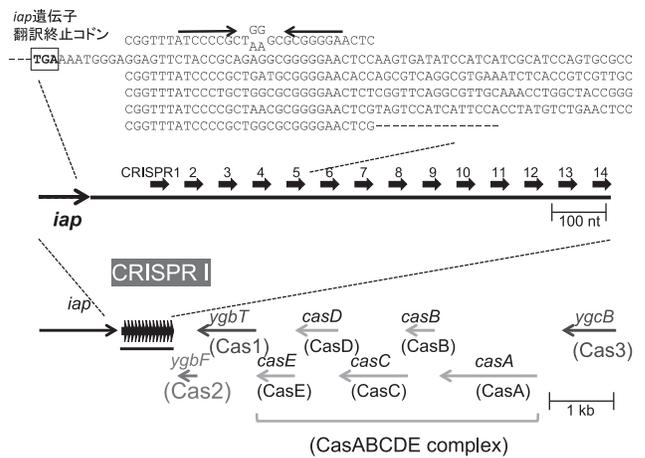


図2. 大腸菌の *iap* 遺伝子の下流に存在するCRISPR-Casの遺伝子構成。 *iap* 遺伝子解析により発見された繰り返し配列は5個までだったが(上段)、その後のゲノム解析で14回繰り返されていることが分かり、また、その下流には *cas* 遺伝子群も同定された(括弧内はコードされるタンパク質)。

型のために、当時の方法で配列決定するのは大変な骨折り作業であった。種々の工夫を加えて何とか解読された配列は顕著に特徴的で、ステムループ構造形成が可能なパリンドロミック配列の下流に、29ヌクレオチドからなる規則正しい繰り返し配列 (共通配列は2回対称性の14ヌクレオチド配列を含む5'-CGGTTTATCCCGCTG GCGCGGGGAAGTCT-3') が存在し、この配列は32ヌクレオチド長のスペースを挟んで5回繰り返されていた (図2)。これが生理的に何を意味しているのか不明であったが、あまりに特徴的な繰り返し配列であったので、論文を書くときに、図を一つ作成して取り上げて、当時知られていたバクテリアに保存された2回対称のREP (repetitive extragenic palindromic) 配列がmRNAの安定性に寄与するという例をあげて転写制御の可能性を議論した。これが最近一躍有名になったCRISPR発見の論文である⁴⁾。この繰り返し配列は、その後の解析により大腸菌のゲノムの中でさらに連続しており、合計14回繰り返される事 (図2)、また同様の特徴を有する繰り返し配列が大腸菌のゲノム中にもう一か所存在すること、さらに、これがサルモネラや赤痢菌にも存在することが示された⁶⁾。

CRISPR配列は一般的なもの?

大腸菌で発見された、相同性を持たないスペーサーを挟んだ奇妙な繰り返し配列は、その後1990年代に入って、*Heloferax mediterranei*, *H. volcanii*⁷⁾, *Streptococcus pyogenes*⁸⁾, *Anabaena* sp. PCC7120⁹⁾, *Mycobacterium tuberculosis*¹⁰⁾などの、他の原核生物ゲノム中からも相

次いで発見された。繰り返し配列の長さは21–40 bp, またスペーサーは20–58 bpと多様であったが, スペーサーを挟んだ繰り返し配列という共通性を有しており, この特徴的な配列は, 真正細菌とアーキアのゲノム上に広く存在するのではないかと予想されるようになった。全ゲノム配列の中でこの繰り返し配列が調べられた最初の例は, 1998年にアーキアとして初めて全ゲノム配列が発表された好熱メタン菌の一種の *Methanocaldococcus* (*Methanococcus*) *janaschii* である¹¹⁾。このアーキアのゲノム中には独特の繰り返し配列が18コピーも存在した。その後, この特徴的な繰り返し配列に対して, SPIDR (spacers interspaced direct repeats), SRSR (short regularly spaced repeats), LCTR (large cluster of 20-nt tandem repeat sequences) などと種々の名称が提唱されたが, 論文を出していた二つの研究グループが相談して, 2002年にCRISPRという名称が提唱されて定着した³⁾。

特徴的な繰り返し配列が多くの中核生物ゲノムに共通に存在すると認識されはじめた2000年当時のデータベース検索では, 真正細菌の半数, アーキアのほとんどのゲノム中に, そのような配列が検出された。特に, 超好熱性アーキアの *Pyrococcus*, *Aeropyrum*, *Sulfolobus* や, 超好熱真正細菌の *Aquifex*, *Thermotoga* などにより多く, またより長い配列が存在する傾向にあるということが指摘され, この繰り返し配列が高熱環境適応と関係する可能性を想像させたことは筆者にとってはたいへん興味深かった。しかし, ゲノム配列解析が進むにつれて, CRISPRはより広く保存されており, 進化的にどの系統に多いという傾向はなく, むしろ菌種によって異なることがわかってきた。たとえば, 同属の抗酸菌でも *M. tuberculosis* にはCRISPRが存在するが, *M. leprae* にはない。また, 系統的に関係の遠い *E. coli* と *M. avium* が同じCRISPRを有している。また, 一つのゲノム中に存在するCRISPRは1コピー (*M. tuberculosis*) から18コピー (*M. jannaschii*) と多様であり, 一つのCRISPRの繰り返し数も2から124回までさまざまである。塩基配列解読技術の進歩によって, 原核生物のゲノムサイズ程度なら比較的簡単に全ゲノム配列が解読できるようになり, 利用可能なゲノム配列データは日々急速に増えている。パリ第11大学の運営するCRISPRの情報を集めたデータベースによると (<http://crispr.u-psud.fr/crispr/>), 2014年8月の時点で(費用の関係でその後更新されていない) 全ゲノム配列解析がなされているアーキア150種のうちの126種(84%), 真正細菌2612種のうちの1176種(46%)に推定CRISPRが存在する。

CRISPRと連動した *cas* 遺伝子の発見

ゲノム上のCRISPRの近傍には保存された遺伝子クラスターが存在することがわかってきた。これらの遺伝子はCRISPRを有するゲノム中にすべて揃っているとは限らず, また並ぶ順番やCRISPRとの相対的な位置関係もさまざまではあるが, CRISPRを有するゲノムにのみ保存され, CRISPRを有しないゲノム中にはまったく見つからないことから, 機能的にCRISPRと連動している遺伝子と予想され, *cas* (CRISPR-associated) geneと名付けられた³⁾。複数のCRISPRを有するゲノム中にはそれぞれ異なる *cas* 遺伝子が存在するので, CRISPRと *cas* は機能的に連動しながら進化してきたと予想された。バイオインフォマティクスによる詳細な配列比較の結果, さらに多くの *cas* 遺伝子が見つかり, 現在45種のファミリーが提唱されている¹²⁾。

CRISPR/Casの機能予測と実証

ゲノム中の機能未知遺伝子の中に, ヘリカーゼやスクレアーゼと相同性を示すRAMPs (repeat-associated mysterious proteins) と名付けたタンパク質ファミリーが報告されていた¹³⁾。何かのDNA修復経路に関係すると予想されたこれらのタンパク質が, 後にCasタンパク質であることがわかった。これらはCas5, 6, 7に分類される¹⁴⁾。また当初, Casタンパク質が, DNA複製後の分配¹⁵⁾, 高熱適応¹⁶⁾, 染色体DNA再編¹⁷⁾, などに関わっていることが提唱されたが確証はなかった。

CRISPR領域のより詳細な配列解析が進み, CRISPRには既知のバクテリオファージやプラスミドに相同な配列が含まれていることがわかってきた。その結果, CRISPRの機能はこれらの侵入物から細胞を守ること, すなわち, 原核生物の生体防御システムに関係するのではないかと提唱がなされ, 真核生物で知られているRNA干渉(RNAi)のようなしくみが原核生物にも存在するのではないかと想像された^{18–20)}。この仮説は2007年に乳酸菌の一種である *Streptococcus thermophilus* ゲノム上のCRISPRのスペーサー領域にファージの配列を人工的に挿入すると, その株がファージ感染に抵抗性を示すようになること, さらに, ファージ配列を欠失させるとファージ感染の抵抗性が消失することを実験的に示したことで証明された²¹⁾。同様のことが *S. mutants* 株でも証明された。さらに, CRISPRがプラスミドの接合や形質転換能にも関与していることが実験的に示され, CRISPRは原核生物の獲得免疫システムとして広く知られるようになった^{22,23)}。

CRISPR/Casの機能は獲得免疫である

CRISPR/Casが獲得免疫システムとして機能するための作用機作を解明する過程で、スペーサー配列やCasタンパク質の役割がわかってきた。このシステムは、獲得(adaptation)、発現(expression)、切断(interference)という3段階で進行すると理解されている^{24,25)}(図3)。獲得過程で、外来DNAが断片化されてスペーサー領域に取り込まれ、その配列が細胞に記憶される。DNAの断片化はCas1-Cas2タンパク質が担っており、スペーサー領域に挿入されるためにはDNA中に数ヌクレオチドの短い特定の配列モチーフPAM(proto-spacer adjacent motifs)が必要である。PAMはCRISPR/Cas

システムの違いによってさまざま異なる。

このようにして細胞が免疫されると、同じ配列のDNAが侵入した際に、CRISPR領域が転写されて、そのDNAと相同な配列を有するRNA鎖(pre-crRNA)が生成される。これがCasタンパク質やその付随タンパク質の特異的エンドヌクレアーゼ活性によって切断されてCRISPR RNA(crRNA)となる。これが発現過程である。そして、Casタンパク質と複合体を形成したcrRNAが、自身と相同な配列を有する外来DNAに結合して、その位置で外来DNA鎖を切断し(切断過程)、CRISPR/Casシステムによる自己細胞防御機構が完成する(図3)。

CRISPR/Casシステムの分類

CRISPR/Casが原核生物の獲得免疫システムに関係することが分かると、その詳細な分子機構解明が急速に進んだ。CRISPR/Casは、関連するCasタンパク質の違いによって大きく三つのタイプ(I, II, III)に分類することができる。前述のように、獲得過程で働くCas1, Cas2はどのタイプにも共通に存在するが、タイプI, II, IIIを区別する際には、それぞれのタイプに特有のCas3, Cas9, Cas10が指標となる。タイプIではpre-crRNAのプロセッシングにCascade(CRISPR-associated complex for antiviral defense)と呼ばれる複合体が関わる。これにはCas5, 6, 7, 8などのタンパク質が含まれ、Cas8がPAMを認識する。切断過程ではCas3が標的DNA鎖の切断を担う。Cas3はスーパーファミリー2のヘリカーゼと一本鎖ヌクレアーゼ様の配列を有する。また、タイプIIIではCas6を含むRAMPタンパク質複合体が主としてpre-crRNAのプロセッシングを行い、Cas10-Csm複合体が切断過程で標的DNA鎖の切断を担う。しかし、Cas10-Cmr複合体はDNA鎖だけではなくRNA鎖を切断標的とすることから、標的の違いによってそれぞれタイプIII-A, タイプIII-Bと分類される。タイプI, タイプIIIが少々複雑なシステムであるのに対して、タイプIIの場合はcrRNAの生成とその後の標的DNA鎖の切断にCas9だけで十分である。そして、pre-crRNAのプロセッシングには、単純にCasタンパク質やCascadeがRNA鎖を切断するのではなく、ゲノム上のCRISPRとは別の領域から転写されてきたRNA鎖が必要である点が特徴的である。このRNA鎖はtracrRNA(trans-acting CRISPR-associated RNA)と名付けられており、ステム-ループ構造を有する。これがpre-crRNAの相同配列を見つけて二本鎖RNAを形成すると、そこにCas9が結合して複合体が形成される。この二本鎖RNA領域のpre-crRNAを、宿主菌のハウスキープ酵素の一種

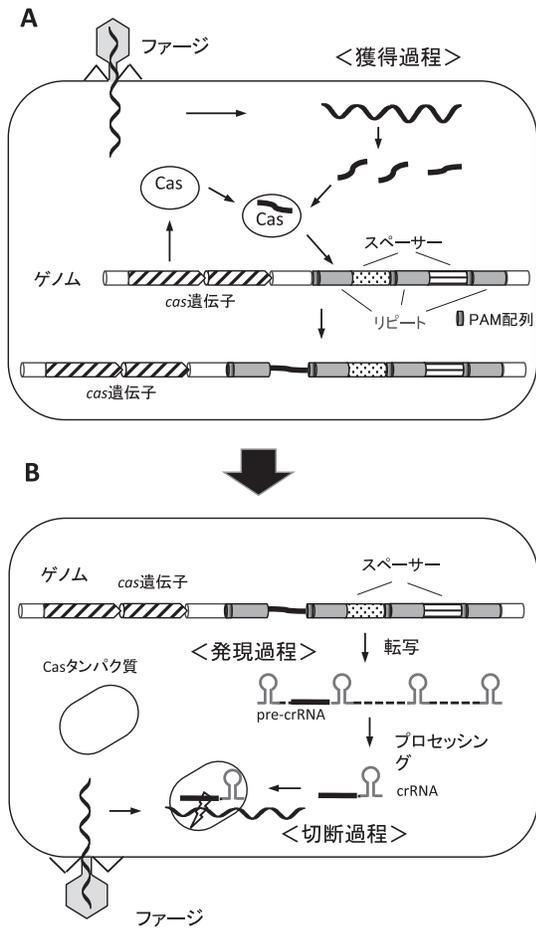


図3. CRISPR-Cas獲得免疫システムの進行過程。
A) 獲得過程 (adaptation) : 侵入したDNAが断片化され、CRISPRのスペーサー領域に組み込まれてゲノム上に記憶される。
B) 発現過程 (expression) : CRISPR領域の転写によってpre-crRNAが生成され、それがプロセッシングを受けてcrRNAになる。切断過程 (interference) : crRNAに存在するスペーサー配列の相同性を利用して外来DNAを捕らえ、ヌクレアーゼ活性を有するCasタンパク質との複合体がDNAを切断する。

であるRNaseIIIが切断することにより、Cas9-crRNA-tracrRNA複合体が形成される。この状態で外来DNAをスキャンして、相同配列を見つけたら結合する。その際に、外来DNAに含まれるPAM配列が重要であり、PAMに結合したCas9は二本鎖のDNAを開裂させ、crRNAと外来DNAとの二本鎖形成を誘導する。PAMはCRISPRごとに異なるが、もっともよく研究されている*S. pyogenes*のCas9による認識に必要なPAM配列は5'-NGG-3'(Nは任意の塩基)であることが分かっている。Cas9は組換え中間体解消酵素のRuvC様のドメインと制限酵素やホーミングエンドヌクレアーゼに見られるようなH-N-Hドメインを有する。それぞれのドメインのヌクレアーゼ活性が、標的のDNAのそれぞれの鎖を切断することにより二本鎖切断が起こる。実際に*S. thermophiles*由来のタイプII CRISPR-Casをコードする遺伝子領域をクローニングして、大腸菌に導入することによって、その大腸菌がファージの感染やプラスミドによる形質転換に対して抵抗性を示すということが報告され、さらに、標的DNAの切断にはCas9だけで十分であり、他のCasタンパク質は必要ないことが示唆された^{26,27)}。その後、この切断様式として、crRNAと二本鎖を形成している方のDNA鎖がCas9のH-N-Hドメインによって切断され、もう片方のDNA鎖は、RuvCドメインによって切断されることが証明された²⁸⁾(図4)。

この分類分けに注目して、これまでに真正細菌とアーキアのゲノム中に検出されているCRISPR/Casを比べてみると、その分布には明らかに偏りがある²¹⁾。顕著な特徴としてタイプIIは真正細菌だけに存在し、アーキアにはまったく見つからない。また、タイプIIIは明ら

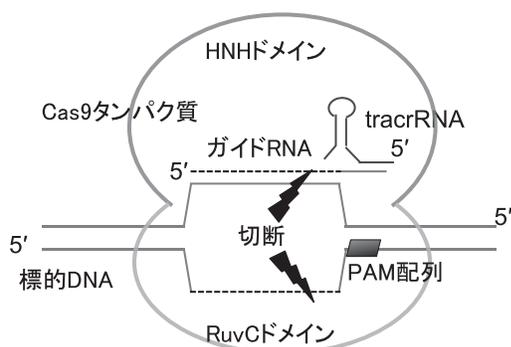


図4. ゲノム編集に応用されたcrRNA-tracrRNA-Cas9による標的DNAの二本鎖切断機構。Cas9-crRNA-tracrRNA複合体がPAMを含む外来DNAに結合する。その際、PAMに結合したCas9は二本鎖の外来DNAを開裂させ、crRNAと外来DNAとの二本鎖形成を誘導する。crRNAと二本鎖を形成している側のDNA鎖がCas9のH-N-Hドメインによって切断され、もう片方のDNA鎖は、RuvCドメインによって切断されて、外来DNAに二本鎖切断が起こる。

かにアーキアに多く存在する。タイプIに関してはどちらにも存在する。さらに特徴的なのは、多くのアーキアが一つのゲノムの中に異なるモジュールからなる複数のCRISPR/Casを有しているということである。なお、*Acidithiobacillus ferrooxidans*のゲノム上には、CRISPRとCas1, Cas2遺伝子が存在しないのに、他のCasタンパク質を有するので、crRNAを介さずにDNA/Casの相互作用によって外来DNAを認識する可能性が予想されており、これをタイプIVとすることが最近提唱されている³⁰⁾

CRISPR/Casのゲノム編集への応用

CRISPR/Casの作用機構が明らかになるにつれ、それをゲノム編集に応用するアイデアが生まれた。タイプIIのCRISPR/Cas9は、標的DNAの二本鎖を特定の位置で切断することができるうえに、ヌクレアーゼ活性の供給源としてCas9のみでよいので、ゲノム上の狙った位置に二本鎖切断を入れる反応系をもっとも簡単に構築できる。実際に*in vitro*で特定のDNAを切断するためには、その配列と相同配列を有するcrRNAとtracrRNA、Cas9があれば十分であることが*S. pyogenes*、*S. thermophiles*のタイプII CRISPR-Casを用いて実験的に証明された^{28,31)}。さらに、*S. pyogenes*のタイプII CRISPR-Casをヒトの腎臓細胞やマウスの神経細胞内で発現させて、標的のDNAを切断することに成功した^{32,33)}。この実験において、crRNAとtracrRNAを人工的につなげてしまって一本のRNA鎖(guide RNA; gRNA, またはsingle guide RNA; sgRNA)にしてしまっても機能に影響がないということが証明された。また、pre-crRNAのプロセッシングには哺乳類細胞が有するRNaseが機能しており、*S. pyogenes*由来のRNase IIIを同時に発現させる必要はなかった。すなわち、タイプIIのCRISPR/Casシステムは、高等真核生物の細胞内で、ゲノムDNAを特定の位置で切断する技術として実用的であることが示されたわけである。CRISPR/Cas9による標的配列の認識・切断機構は、標的配列とguideRNAとの塩基対形成という単純な機構によるので、ゲノム編集技術として開発されてきたZFN、TALEN人工ヌクレアーゼが、標的配列ごとに作製しなければならないのに比べて²⁸⁾、圧倒的に簡便であることから、実用的なゲノム編集技術として現在急速に普及している。

CRISPR/Cas9のその他の応用

CRISPRは多くの真正細菌とアーキアのゲノム上に存在し、しかも顕著に多様性に富んでいるので、これを遺

伝子マーカーとして、菌種の同定に利用することは、CRISPR/Casの機能解明以前から行われていた。たとえば結核菌のタイピングは診断や疫学的に役に立つ³⁴⁾。CRISPRを利用したタイピングはペスト菌^{35,36)}、サルモネラ菌³⁷⁾、ジフテリア菌³⁸⁾などにも利用されている。また、CRISPR/Casによる標的DNA配列の特異的切断を、病原菌の配列切断に利用すれば、新たな作用機序による抗菌薬として利用できる。既存の抗生物質に対する耐性菌感染の貴重な治療薬開発につながる。たとえば、マウスの皮膚に感染するブドウ球菌の抗生物質耐性菌をCRISPR/Cas9を用いて選択的に死滅させたり³⁹⁾、病原性大腸菌の腸内感染を防いだ実験がすでに報告されている⁴⁰⁾。治療薬として実用化するためには、デリバリー方法など解決すべき課題は残っているが、今後の研究が大いに期待される。また、CRISPR/Casによって特定の菌株にファージ耐性を付与することができるので、発酵食品産業で利用される種々の有用菌を、製造過程におけるファージ感染から防御する有用な手段となる。

CRISPR/Cas9はガイド配列に依存して、ゲノム上の狙ったところにCas9を結合させることができるので、分子生物学における実験ツールとして多くの応用が可能である。Cas9のDNA鎖切断活性はH-N-HヌクレアーゼドメインとRuvCヌクレアーゼドメインが担っているので、それぞれの活性中心のアミノ酸を置換して切断活性のないCas9 (dCas9) を得ることができる。CRISPR/dCas9は、標的DNA配列に結合することができるが、そこに留まって切断をすることはできない。したがって、dCas9に蛍光タンパク質 (GFP) を融合させておくと、sgRNA配列に依存してCas9が標的配列に結合するので、その特定位置を標識することができる。この生細胞内部位特異的標識法⁴¹⁾の利用範囲はきわめて広い。また、CRISPR/dCas9の標的DNA配列への特異的結合を利用して、人工的に遺伝子発現を制御することができる。実際にある遺伝子のプロモーター領域や、オープンリーディングフレーム内へdCas9を結合させることによって、その遺伝子の発現を2桁減少させることができている⁴²⁻⁴⁴⁾。dCas9を転写の活性化因子と融合させたり、真正細胞のRNAポリメラーゼのωサブユニットと融合させて、特定のプロモーターに結合させるようにガイド配列を設定するなどにより、転写を促進させることも試みられている⁴⁵⁾。

以上のような応用例はどれもこの1-2年の間に報告されたものであり、今後も続々とCRISPR/Cas9を応用した実験例が発表されると予想される。

おわりに

筆者が大腸菌のゲノム中に独特の繰り返し配列を見つけてから、間もなく30年になる。学位を取り立てのポスドクだった筆者は、CRISPR発見の後にアメリカに留学して別の研究テーマを始めた。帰国後に超好熱菌のDNA複製と修復を研究しながら、全ゲノム解析時代に入った生命科学の発展を自分の目で見続けてきたが、今日までCRISPRを研究の主題にすることはなかった。CRISPRは、真正細菌とアーキアのゲノム上に広く保存されるものであることがわかり、Casタンパク質と合わせた生理的な機能が、原核生物にとっての獲得免疫であることがわかったのも、配列データの蓄積によるところが大きい。原核生物の獲得免疫の解明そのものにも、大きなインパクトがあるが、さらに、CRISPR/Cas9がゲノム編集技術に応用されたことは、遺伝子工学の発展への大きな貢献である。CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術は、PCRが登場した時によく似ている。制限酵素や核酸修飾酵素が知られるようになって、試験管内遺伝子操作技術が生まれた頃は、種々の煩雑な操作を続けて遺伝子をクローニングしていた (*iap* 遺伝子研究もその頃である)。操作に慣れた腕のいい研究者でないと、成功しなかった実験が、PCRの出現によって大きく変わった。PCRは正に遺伝子操作技術の革命だったが、それはPCRの発明そのものではなく、耐熱性DNAポリメラーゼをPCRに利用することによって操作が簡略化され、実用化されたことによる。ゲノム編集の場合も同様に、方法論ができているところに、CRISPR/Cas9を利用することによって、一気に一般的な技術にまで広がったことが革命である。

筆者はCRISPR発見当時、この繰り返し配列があまりに特徴的であったため、それは偶然に発生したものではなく、生命にとって何か意味があるものであろうと想像したが、当時は一つの遺伝子の塩基配列を解読するのに何か月もかかり、配列情報がきわめて少なく、比較する配列データが乏しかったので、CRISPRの機能を予測することは不可能であった。しかし、知られていなかった何か特徴的なものを見つけた時には、根気よく地道に研究を続けることが研究には必要で、その結果が大発見、大発明につながると思う。何の役に立つかわからないものに拘りをもって研究を続けられる環境こそが、科学の発展に欠かせないものであることをCRISPRは我々に教えてくれる。

本稿では紙面の関係で多くのCRISPR/Casに関する優れた研究を紹介しきれなかったことをお詫びしたい。

文 献

- 1) Wood, A. J. *et al.*: *Science*, **333**, 307 (2011).
- 2) van Belkum, A. *et al.*: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 275 (1998).
- 3) Jansen, R. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **43**, 1565 (2002).
- 4) Ishino, Y. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **169**, 5429 (1987).
- 5) Nakata, A. *et al.*: *Gene*, **19**, 313 (1982).
- 6) Nakata, A. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **171**, 3553 (1989).
- 7) Mojica, F. J. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **36**, 244 (2000).
- 8) Hoe, N. *et al.*: *Emerg. Infect. Dis.*, **5**, 254 (1999).
- 9) Masepohl, B. *et al.*: *Biochem. Biophys. Acta*, **1307**, 26 (1995).
- 10) Groensen, P. M. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **10**, 1057 (1993).
- 11) Bult, C. J. *et al.*: *Science*, **273**, 1058 (1996).
- 12) Haft, D. H. *et al.*: *PLoS Comput. Biol.*, **1**, e60 (2005).
- 13) Makarova, K. S. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **30**, 482 (2002).
- 14) Makarova, K. S. *et al.*: *Biol. Direct*, **6**, 38 (2011).
- 15) Mojica, F. J. M. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **17**, 85 (1995).
- 16) Riehle, M. M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 525 (2001).
- 17) DeBoy, R. T. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **188**, 2364 (2006).
- 18) Mojica, F. J. M. *et al.*: *J. Mol. Evol.*, **60**, 174 (2005).
- 19) Pourcel, C. *et al.*: *Microbiology*, **151**, 653 (2005)
- 20) Bolotin, A. *et al.*: *Microbiology*, **151**, 2551 (2005).
- 21) Barrangou, R. *et al.*: *Science*, **315**, 1709 (2007).
- 22) Horvath P. and Barrangou, R.: *Science*, **327**, 167 (2010).
- 23) Wiedenheft, B. *et al.*: *Nature*, **482**, 331 (2012).
- 24) Jiang, W. *et al.*: *Annu. Rev. Microbiol.*, **69**, 209 (2015)
- 25) Rath, D. *et al.*: *Biochimie*, **117**, 119 (2015).
- 26) Sapranaukas, R. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9275 (2011).
- 27) Magadán, A. H. *et al.*: *PLoS ONE*, **7**, e40913 (2012).
- 28) Gasiunas, G. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E2579 (2012).
- 29) Makarova, K. S. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 467 (2011).
- 30) Koonin, E. V. and Krupovic, M.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **16**, 184 (2015).
- 31) Jinek, M. *et al.*: *Science*, **337**, 816 (2012).
- 32) Cong, L. *et al.*: *Science*, **339**, 819 (2013).
- 33) Mali, P. *et al.*: *Science*, **339**, 823 (2013).
- 34) Kamerbeek, J. *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 907 (1997).
- 35) Pourcel, C.: *Microbiology*, **151**, 653 (2005).
- 36) Cui, Y. *et al.*: *PLoS ONE*, **3**, e2652 (2008).
- 37) Liu, F. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 1946 (2011).
- 38) Mokrousov, I. *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 1662 (2005).
- 39) Bikard, D. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **32**, 1146 (2014).
- 40) Citorik, R. J. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **32**, 1141 (2014).
- 41) Chen, B. *et al.*: *Cell*, **155**, 1479 (2013).
- 42) Bikard, D. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **41**, 7429 (2013).
- 43) Qi, L. S. *et al.*: *Cell*, **152**, 1173 (2013).
- 44) Gilbert, L. A. *et al.*: *Cell*, **154**, 442 (2013).
- 45) Bikard, D. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **41**, 7429 (2013).