

文Ⅱ 令和元年10月よりゲノム編集食品が販売可能になった。ゲノム編集(genome editing)とは、DNAを人工的に切断し、細胞のもつDNA修復機能を巧みに利用して、目的の遺伝子を正確に改変する(破壊したり、別の配列を導入したりする)技術である。この技術は、その作業に用いる配列と酵素の名前からCRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas9(CRISPR-associated protein 9)システムとよばれる。CRISPR-Cas9システムを応用することで、これまでマウスなどES細胞株が樹立された種においてのみ可能であった遺伝子改変動物作製が、理論上あらゆる生物種・植物種で、しかも短期間で行えるようになった。

DNA切断人工酵素は、任意のDNA配列に特異的に結合して切断する酵素のことで、“人工制限酵素”と“RNA誘導型ヌクレアーゼ”に大別される。人工制限酵素は、転写因子のDNA結合ドメインを利用して標的配列を認識し、切断する。一方、RNA誘導型ヌクレアーゼはガイドRNAとよばれる短いRNAを利用して標的配列と結合し、DNA配列を切断する。このようなRNA誘導型ヌクレアーゼとして今日最も有名なのがCas9である。

CRISPR-Cas9システムはもともと、バクテリオファージなどの外来DNAを切断するための、細菌の獲得免疫機構である(図15.1)。細菌は、バクテリオファージなどを介して外部から侵入したDNAをCasによって断片化し、その一部をCRISPRとよばれるゲノム領域に取込んで記憶する。Casが認識する配列をPAM(proto-spacer adjacent motif)配列とよぶ。こうして、CRISPR領域には過去に侵入したファージDNAの情報が蓄積される。その後、取込んだ外来DNAを鋳型としてクリスパーRNA(crRNA)を生成する。crRNAはさらに、トランス活性クリスパーRNA(trans-activating CRISPR RNA, tracrRNA)とよばれるもう一つの短いRNAと融合する。この細菌にファージが再び侵入すると、Cas9とcrRNA-tracrRNA複合体がファージDNAの相補配列に結合して、CasがファージDNAを二本鎖切断する。このシステムを簡略化し、狙ったDNA配列を簡単に切断できるようにしたのがゲノム編集技術である。原核生物のCRISPR-Casシステムでは、外来DNAの取込み、crRNAの転写、tracrRNAの転写と融合まで、DNA切断の準備に複数のステップを踏む。ゲノム編集技術では、あらかじめtracrRNAなどを含むscaffold(足場)配列とCas9の遺伝子を組み込んだベクターを利用する。このベクターに標的配列を組み込むことで、標的配列とscaffold(足場)配列が融合したシングルガイドRNA(single guide RNA, sgRNA)が転写される。これを細胞に導入して発現させるだけで、標的配列を切断するDNA切断酵素として機能する。

問6 CRISPR-Cas9を用いたゲノム編集技術により、狙った遺伝子に効率良く、欠失やフレームシフトなどの変異を導入できるようになった。以前は半年から1年以上かかっていたノックアウトマウスの作製が、早ければ数カ月で実施できるようになった。sgRNAとCas9を受精卵に発現させて標的配列を二本鎖切断し、それに伴う非相同末端結合によ

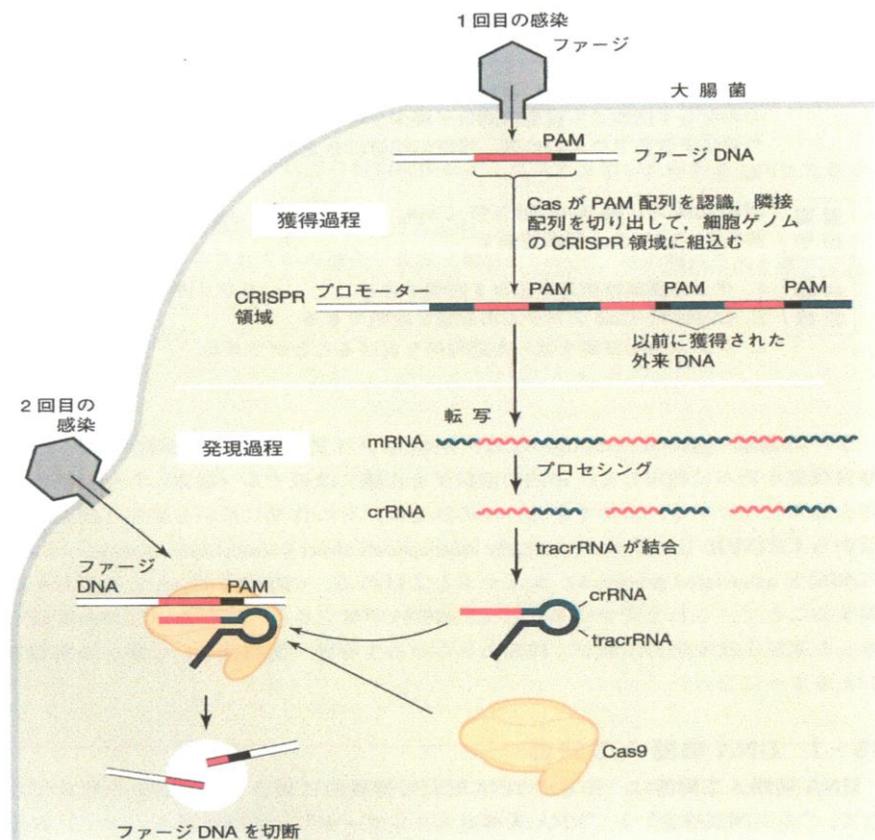


図15・1 細菌の獲得免疫機構としてのCRISPR-Cas9システム

*1 Casにはいくつかの型のアイソフォームがある。外来遺伝子を切断してCRISPR領域に取込む段階ではCas9とは別なアイソフォームが働く。

る鋳型なしの修復機構を利用して、ゲノム編集する。ゲノム編集した受精卵を偽妊娠マウス（仮親）の子宮に移植しノックアウトマウスを作成する。

従来の ES 細胞を用いた遺伝子改変マウス作製法では、長い時間と多大な労力が必要だったその理由を説明せよ。

問7 sgRNA と Cas9 と同時に、1000 塩基以上の DNA 配列を導入すれば、二本鎖切断された部位に、相同組換えで任意の塩基配列をノックインすることもできる。ノックアウトした生物は食料として安全性審査を受けなくてもよいがノックインした場合は安全性試験は必要か？その理由とともに答えよ。