

革新的 RNA 編集技術の開発

岡山大学 学術研究院ヘルスシステム統合科学学域

世良 貴史

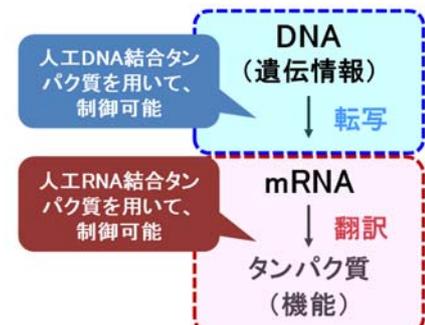
1. はじめに

ヒトを含め、生体内では、生命の設計図である 2 本鎖 DNA から、1 本鎖 RNA に遺伝情報が転写され、さらにその核酸情報がアミノ酸に翻訳される。この遺伝情報の流れにより、様々な生命現象が制御されている。特に、疾患との関連では、この遺伝情報の流れの異常で生じることが知られている。たとえば、がん増殖に関与する遺伝子発現の異常な亢進により、がんが生じる。また、塩基の変異により、多くの疾患が生じることが知られている。さらに、ウイルス感染においては、感染個体内でのウイルス増殖により疾患が引き起こされている。もし、がん増殖遺伝子発現のみを特異的に抑制できれば、がん患者の QOL を大幅に向上させることができるし、mRNA 上の変異を修復できれば、多くの疾患を治療することが可能となる。

2. 人工核酸結合タンパク質

以上のような治療を実現するためには、DNA 上あるいは RNA 上の標的配列を識別できる高性能の人工の結合タンパク質が必要である。研究代表者は、そのような人工核酸結合タンパク質および様々な機能ドメインを融合させた誘導体をテイラーメイドに創出する方法を確立した。例えば、望む標的の DNA 配列に強く、特異的に結合できる人工 DNA 結合タンパク質 (図 1) のデザイン・創出法を開発した (参考文献 1)。この手法では、開発した「DNA 認識コード表」に基づいて、標的配列塩基に合わせて認識アミノ酸を選ぶだけで、目的の人工 DNA 結合タンパク質を簡単に創出できるよう工夫した。このタンパク質の応用例として、植物ウイルスの感染阻害がある (参考文献 2)。この応用では、ウイルス複製に必須の、植物ウイルスの複製タンパク質のウイルスゲノム DNA への結合をデザインした人工 DNA 結合タンパク質により阻害することを考えた。実際、この人工 DNA 結合タンパク質遺伝子を組み込んだ植物を創出し、標的の植物ウ

“遺伝情報の人為的操作ツール”
としての人工核酸結合タンパク質



遺伝情報の人為的操作テクノロジーの構築

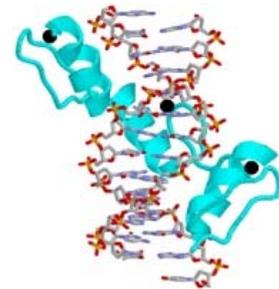


図 1. 人工 DNA 結合タンパク質



図 2. ウイルス接種後の植物。開発した植物は、感染症状を全く示さない。

ウイルスを接種しても、複製阻害のためウイルスが増殖できず、ウイルス感染を防ぐことに初めて成功した（図2）。この人工DNA結合タンパク質に、別の機能ドメインを融合させることにより、様々な応用が可能である。その一例として、人工DNA結合タンパク質に転写調節ドメインを融合させた「人工転写因子」がある（参考文献3）。この人工転写因子は、人のゲノム上の1箇所の標的DNA配列に特異的に結合でき、ヒトの2～3万個あるといわれている遺伝子のうち標的の遺伝子の発現を望み通りに活性化したり、あるいは抑制したりすることが可能である。例えば、がんを増殖させる遺伝子の発現をこの人工転写因子を用いて抑制することが可能である。肺がんのドライバー遺伝子のSOX2遺伝子の発現を抑制する人工転写因子を用いると、図3に示すように、移植したがん細胞の増殖を完全に防ぐことに成功している（参考文献4）。さらに、研究代表者は、標的RNA配列に結合する人工RNA結合タンパク質を開発中である。この人工RNA結合タンパク質も、別の機能ドメインを融合させることにより、様々な応用が可能である。例えば、ヒトに感染するウイルスの不活性化への応用である。ヒトに感染するウイルスもゲノムの種類により、DNAウイルスとRNAウイルスが存在する。ヒトパピローマウイルス（HPV）も子宮頸がんを引き起こす重篤なウイルスであるが（研究代表者は、人工DNA結合タンパク質にDNA消化酵素を融合させた「人工DNA切断酵素」を用いて、HPVゲノムの特異的切断によりHPVの増殖阻害にも成功している。参考文献5参照）、古くはパンデミックを引き起こしたインフルエンザウイルス、エイズウイルス、世界を恐怖に落として入れたエボラウイルス、新しくはコロナウイルスと世界的に問題となった重篤なウイルスにはRNAウイルスが多く知られている。そこで、開発中の人工RNA結合タンパク質にRNA消化酵素を融合させた「人工RNA切断酵素」を用いて、インフルエンザウイルスのゲノムRNA切断にも成功している（参考文献6）。そこで、本申請研究では、後述する遺伝病克服への応用を目指すため、「人工RNA編集酵素」の開発を目指した。

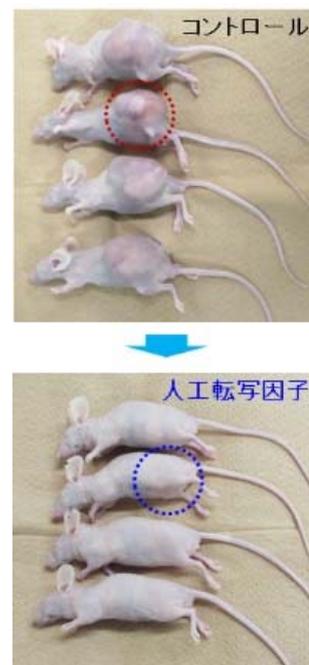


図3. 人工転写因子による腫瘍形成の阻害

3. 遺伝病克服のこれまでの研究と課題

遺伝的な原因でゲノムDNA上の塩基の変異により、ハンチントン病や筋ジストロフィーなどの遺伝病・神経変性病・ガンなどの多種多様な病気により、古くから現在に至るまで多くの患者さんたちが苦しめられてきた。もし、この変異を元の正しい塩基に戻すことができれば、これら遺伝子変異に基づく病気に苦しめられてきた患者さんの命を救い、生活の質を向上させることが可能となる。現在までに様々な手法が試みられてきたが、有望視され臨床研究も実施されている技術が、2020年にノーベル化学賞が授与されたCRISPRによるゲノム編集技術である。この手法は、数多くの研究において、非常に高い効率でゲノム上の標的の塩基を編集することが可能である。しかしながら、(すべての技術に当てはまるが)臨床応用で問題となるのが、標的以外の場所で編集が起きてしまう、オフターゲットでの編集である。多くの研究グループが、それを減少させるべく技術改良

に注力しているが、依然としてオフターゲットの問題は解決されておらず、ゲノム編集で意図せぬ別の個所での変異が生じてしまうと、ゲノム DNA レベルの編集なので、細胞分裂後の全ての細胞に引き継がれ、その意図せぬ編集を治療しなければならず、遺伝病の治療への応用には解決すべき重要な問題である。そこで、注目されているのが、(ゲノム DNA ではなく) mRNA での RNA 編集である。mRNA レベルでは、たとえオフターゲット編集が起きたとしても、その望ましくない mRNA はいずれ分解されるため、その影響は(一旦導入された、望ましくない変異がゲノムに固定されてしまうゲノム編集とは異なり)永続されることはないため、mRNA での編集が最も現実的ではないかと考えられている。もしすべての変異された塩基を元の正しい塩基に戻すことができれば、遺伝病に苦しんでいるすべての患者さんたちの福音となり、その恩恵は計り知れない。

4. RNA 編集法の設計と構築

知財の関係から現時点での詳細な記述は省略するが、概略は以下のとおりである。

まず、スタートの目的の機能を有する遺伝子の探索を行った。論文で報告されていた RNA 編集技術では具体的なアミノ酸配列が記述されておらず、論文で言及されていた情報を基に、ジーンバンクから該当する情報をサーチすることを行った。しかしながら、得られた情報から相同性解析により目的の機能を有する遺伝子配列の絞り込みを試みたが、あまりに配列情報が多すぎるのか相同性がばらついていて、うまく絞り込むことができなかった。また、その機能で重要な部分的な配列に着目し、得られた配列情報の相同性から絞り込みを試みたが、その領域においても相同性が分散しており、絞り込むことが困難であった。そのデータ解析に時間を費やしてしまい、まず最初にコンセプトを実証するためのスタートの遺伝子を得ることができなかったため、目的の RNA 編集剤の開発はいったん断念し、既存の配列情報が得られる既存の編集酵素を利用し、コンセプトの検証を行い、実証できれば、そのあとに進化工学的な手法を駆使して、新しい編集技術の開発にシフトすることにした。関連する論文を入念に調べ上げ、どの酵素がいいかの絞り込みを行った。その酵素の特性に基づき、コンセプトを実証するための方針をまず確定し、その実施スキームを考察した。さらに、検証法を再度見直し、その実施に必要な各プラスミドを設計した。各プラスミドの構築に必要な遺伝子および DNA オリゴマーを発注した。届き次第、各プラスミドのクローニングに着手する。

5. 今後の方針

今回当初の計画の遂行に時間がかかり、うまく進まず、途中で別のアプローチに変更した。方針を見直したため、目的を達成するための方針、実施スキームおよびその実施に必要な各プラスミドの設計に時間がかかり、各プラスミドの構築に必要な遺伝子および DNA オリゴマーを発注した。届き次第、各プラスミドのクローニングに着手する。今後、当該コンセプトの有効性の実証のため、まず必要なプラスミドをすべて大腸菌に導入し、狙った場所での変異導入による、表現型を示す大腸菌を得ることを目指す。その際、人工 RNA 編集酵素の発現量をウェスタンブロットで評価しておく。最初の予備検討実験で、効率はわずかでも、目的の表現型が得られれば、その効率を上げるために、各プラスミド

の量比を様々に変えることを検討する。もし、量比をいろいろ検討しても目的の表現型が得られない場合は、別途標的 RNA 配列を変更して、それぞれの評価系に必要なプラスミドを構築して、上記と同様の実験を実施する。最初の表現型が得られるまで、このプロセスを繰り返す。この中で表現型出現の割合が最も高い組み合わせを選び出し、今後の条件最適化に用いる。条件の最適化では、各プラスミドの導入量や反応時間のほかに、人工 RNA 編集酵素発現ベクターのプロモーターも検討する予定である。当該コンセプトの有効性を大腸菌で確認できれば、さらなる効率の向上を目指して、DNA Shuffling 法を用いた RNA 編集酵素の進化を試みる。大腸菌を用いて、コンセプトの有効性の実証及び改善を試みたのち、本アプローチの動物細胞での検証につなげていきたいと考えている。

得られた研究成果は、知財を押さえつつ、様々な手段を用いて、研究分野だけでなく、わかりやすく広く一般市民にも伝え、共有する予定である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、貴財団より多大なご支援を頂きました。この場をお借りして心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) T. Sera* and C. Uranga, "Rational design of artificial zinc-finger proteins using a nondegenerate recognition code table," *Biochemistry*, vol. 41, pp. 7074–7081, 2002.
- 2) T. Sera*, "Inhibition of virus DNA replication by artificial zinc-finger proteins," *J. Virol.*, vol. 79, pp. 2614–2619, 2005.
- 3) K. Tachikawa, O. Schröder, G. Frey, S. P. Briggs, and T. Sera*, "Regulation of the endogenous VEGF-A gene by exogenous designed regulatory proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 101, pp. 15225–15230, 2004.
- 4) E. Yokota, T. Yamatsuji, M. Takaoka, M. Haisa, N. Takigawa, N. Miyake, T. Ikeda, T. Mori, S. Ohno, T. Sera*, T. Fukazawa*, and Y. Naomoto, "Targeted silencing of SOX2 by an artificial transcription factor showed antitumor effect in lung and esophageal squamous cell carcinoma," *Oncotarget*, vol. 8, pp. 103063–103076, 2017.
- 5) T. Mino, T. Mori, Y. Aoyama, and T. Sera*, "Gene- and protein-delivered zinc finger–staphylococcal nuclease hybrid for inhibition of DNA replication of human papillomavirus," *PLoS One*, vol. 8, pp. e56633, 2013.
- 6) T. Mori, K. Nakamura, K. Masaoka, Y. Fujita, R. Morisada, K. Mori, T. Tobimatsu, and T. Sera*, "Cleavage of influenza RNA by using a human PUF-based artificial RNA-binding protein–staphylococcal nuclease hybrid," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 479, pp. 736–740, 2016.