

The Sky is the Limit

いつでも、誰でも、簡単に
ゲノム編集技術「CRISPR/Cas9」の改良に挑む



総合研究機構プロジェクト研究 ゲノム編集動物作製基盤技術の確立と病態解析モデル作製への応用

INDEX

01

総合研究機構
プロジェクト研究：
ゲノム編集動物作成基盤
技術の確立と病態解析
モデル作成への応用

02

NEWS

03

イベント報告

遺伝子工学的手法による遺伝子の改変は、医学・農水学などを含むさまざまな生命科学研究に欠くことのできない技術のひとつである。2012年に初めて発表されたCRISPR/Cas9ゲノム編集法は、先行技術と比べ扱いが簡便で、より多くの研究者が、より多様な生物種に対して遺伝子改変を試みることができる可能性を秘めている一方で、これを自在に使いこなせる研究施設・研究室は未だ多くはない。医学部医学科基礎医学系の太塚正人准教授が研究代表を務める研究ユニットは、CRISPR/Cas9技術の改良と発展を通じて、東海大学にゲノム編集生物の作製基盤を設置することを目指している。技術の開発と応用、検証に取り組む太塚准教授、三橋講師、中川講師に話を聞いた。



遺伝子工学の常識を変えた

ゲノム編集技術「CRISPR/Cas9」とは

太塚 CRISPR/Cas9を使ったゲノム編集技術の応用と改良を行っています。CRISPR/Cas9は、ゲノムDNAの任意の位置を切断することができる技術で、それを利用して自分の興味のある遺伝子を狙って改変することが可能です。これは2012年に初めて発表されました。

遺伝子の改変自体はそれまでにも、主にマウスを中心に行われており、目的の遺伝子を破壊したマウス、外来遺伝子を挿入したマウスなどが作られて、遺伝子機能解析やヒト疾患のモデルとして使われてきました。しかし、当時の遺伝子改変はとても難しく、特別な技術がなければ行うことができないものでした。CRISPRの登場によって初めて、誰でも、簡単に遺伝子进行操作できる時代が来たと言えます。

私たち3人は、CRISPRを使って何ができるのか、どう使うべきなのかを考え、東海大学の中でゲノム編集の基盤技術を確立、普及させたいと考えています。私は主にマウスで研究していますが、三橋先生はゼブラフィッシュという熱帯魚を使われており、また、他生物種への応用の可能性もあります。より洗練された疾患モデル動物づくりや、将来的には新規遺伝子治療法の開発などに繋げることが目標です。

三橋 CRISPR/Cas9の研究は、医学への応用を目指してマウスで行われる方が多いのですが、ゼブラフィッシュは毎回100個ほど卵を産むので、マウスと比べて1度に得られる遺伝子改変個体の数が多いという利点があります。また、ゲノム編集は主に受精卵を対象として行いますが、マウスの受精卵は母マウスの胎内にあるうえ、とても小さいので扱うのが大変です。ゼブラフィッシュは、



大塚 正人 (Masato Ohtsuka)
東海大学 医学部 医学科 基礎医学系 准教授
(2019年4月より教授)

『ゲノム編集動物作製基盤技術の確立と病態解析モデル作製への応用』研究代表。ゲノム編集マウス作製技術の確立と、遺伝子発現制御技術開発への応用をめざす。



三橋 弘明 (Hiroaki Mitsuhashi)
東海大学 工学部 生命化学科 講師
(2019年4月より准教授)

専門は分子生物学、分子遺伝学、骨格筋生物学。ゼブラフィッシュを対象として、ゲノム編集小型魚類作製技術の確立と、同技術を用いた疾患モデル魚類の作製・解析を行っている。



中川 草 (So Nakagawa)
東海大学 医学部 医学科 基礎医学系 講師

ゲノム科学のほか、分子進化とバイオインフォマティクスが専門。次世代シーケンシングによる、ゲノム編集生物の遺伝子解析および評価を担当する。

体外に1mmほどの大きさの卵を産卵するため、光学顕微鏡で見ることができるので、比較的容易に必要な操作を行うことができます。教材としても扱いやすく、経験の浅い学部学生にマウスを触らせることは難しいですが、ゼブラフィッシュなら学生自身にゲノム編集をおこなってもらうことができるため、教育効果も高いと考えています。

中川 私の専門はお二人とは違い、ゲノムを構成するDNAの遺伝情報の解析です。DNAはA・G・C・T（アデニン・グアニン・シトシン・チミン）の四種類の塩基からなり、その組み合わせで生物を形作するために必要な遺伝情報をコードしています。例えばヒトゲノムはおおよそ30億塩基もあり、ほんの10年前までは、配列をただ読むだけでも膨大な時間と費用がかかりました。しかし、配列解析の技術は飛躍的に進歩しており、今ではヒトゲノムくらいであれば、10万円ほどで読めるようになっています。

ゲノム解読が高価だった時代には、それぞれの研究者が自分の持っているサンプルのゲノムを読むということは事実上不可能でした。今はコストが下がったことにより配列データ自体は比較的容易に手に入るようになりましたが、その配列に変異が起きているかいないかについて、いかに効率良く調べるかが次の課題になっています。ゲノムデータは膨大な情報のため、コンピュータを活用して情報処理技術を駆使して変異などを調べます。

今回のプロジェクトでは、CRISPR技術を用いてゲノム編集を施したターゲット領域に、狙い通りの編集が行われているかどうかを確認するため、また、ターゲット領域以外の場所に意図しない編集が行われていないことを確認するための全ゲノムシーケンスを担当しています。

研究者同士の出会いの場

「研究交流会」と総研プロジェクト

大塚 今回の研究は、医学部の私と中川先生、工学部の三橋先生の三名でユニットを組んで進めているものです。ユニット作りのきっかけは、東海大学が2015年から開始した「研究交流会」でした。研究交流会とは、その名のとおり、学内の研究者が自身の研究内容や課題などを発表、議論するなど、研究者間の交流機会として研究推進部が開催しています。

また、東海大学には、総合大学のメリットを生かして、複数の学部へ渡る共同研究を促進し、大型競争的資金等外部資金獲得

を目指した研究グループを支援する、学内研究助成制度「総合研究機構プロジェクト研究（総研プロジェクト）」があります。研究交流会で新しくできたユニットは、総研プロジェクトへ応募し、採択されることでキックオフの資金援助が受けられます。

三橋 共同研究のパートナーが見つかるのではないかと2015年の研究交流会に参加した際に大塚先生にお会いしました。私も大塚先生も、自分の研究を紹介するポスターをその場に出して、お互いにそれを見て興味を持ちました。

大塚 私の目標は、CRISPR技術を、より簡単に且つより複雑な遺伝子操作が行えるものに改良することです。遺伝子工学が専門なので、当時は既にマウスを用いてゲノム編集技術を立ち上げていたところでした。三橋先生からは、ゼブラフィッシュで遺伝子操作を始めたいというお話を伺いました。

三橋 私はもともと、筋ジストロフィーという遺伝子の異常が原因で起こる筋肉の病気の研究をおこなっていました。筋ジストロフィーはがんや糖尿病などと比べると患者さんの数が少ないため、患者さんの検体を直接使って研究することが難しく、研究があまり進んでいない病気です。今回の研究では、大塚先生がマウスで培ってこられたゲノム編集の知識と技術をゼブラフィッシュに転用し、筋ジストロフィーの患者さんと同じ遺伝子異常を持たせたゼブラフィッシュを作ることを目指して実験を重ねています。遺伝子異常を持つゼブラフィッシュで患者さんと同じ症状が観察できれば、薬の試験などに使えます。

中川 私と大塚先生は同じ医学部所属ですが、このプロジェクトのお話を伺ったのは、大塚先生とともに学生実習の指導をしていた時でした。

大塚 ゲノムの塩基配列を操作する以上、操作の前後でゲノムDNAのどこがどう変化したのかを知る必要があります。ゲノムの解析に強い中川先生に参加していただけたら、メリットがとても大きいと考えました。

三橋 研究交流会のお陰で、このような形で研究できることになりとても感謝しています。良い制度だと思うので、今後とも是非続けていただきたいですね。

編集効率の向上から遺伝子治療まで、ゲノム編集の目標と夢

大塚 ゲノムの編集技術は今後間違いなく、人間の遺伝子治療への応用に進んでいくと思います。ヒトへの遺伝子治療を行うにあたり、どのような変化をゲノムDNAに

与えることが望ましいか、いかに効率改善につなげられるのかを、実際に実験によって確かめていきたいと考えています。

三橋 筋ジストロフィーという病気は、今のところ不治とされています。そのような病気を治そうという夢を持って研究をしています。小さな熱帯魚から始まった研究が治療に繋がる、人の役に立つとなったらそれは一層大きな夢で、叶ったらとても嬉しいです。

大塚 臨床への適用を考える際は、望まない変異が起きる可能性を可能な限り減らさなければなりません。ゲノムDNA中には類似した塩基配列が実はたくさんあり、目的の配列だけを探して切断するはずのCRISPR/Cas9が、よく似た配列の別の場所を誤って切断してしまうことがあります。ターゲットとした配列以外の場所に、望まない変異が生じる場合があるのはこのためです。この非特異的な変異の挿入をいかに減らすか、回避するかについては、今盛んに研究が行われているとてもホットなテーマになっています。

中川 ゲノムは無駄なく論理的に設計されて今の配列になっている、というわけではないようです。進化の過程で今の形が作られてきたことは確かなのですが、全てが巧く噛み合っているわけではなく、色々問題を抱えながらも何とか生きているというのが実情に思えます。同じ配列の繰り返しや、何の役割を持っているのかよく分からない配列も多くあります。よく似た配列だと思っていたら全く別の何か重要な機能を持っている場合もあり、重要な遺伝子が何度もコピーされ、遺伝子群のような状態で保持されていることもあります。

大塚 DNAはタンパク質を合成する設計図だと考えられてきましたが、タンパク質を直接指定している塩基配列は実はゲノムDNA全体の1.5~2%しかありません。

タンパク質を指定していない領域は非コード領域と呼ばれ、タンパク質を合成する量を調整したり、RNAとして機能する配列を持っていたりなど、何もしていない訳ではなく、生命活動に何らかの役割を果たしている場合もあることが分かってきています。タンパク質を指定している場所だけでなく、非コード領域に人工的に手を加えることが、病気の治療に結びつく可能性があるかもしれません。

中川 塩基配列が読める、というだけでは今は不十分です。大塚先生の開発されているような技術で、遺伝子に手を加え、壊したり付け足したりしながら、それぞれの構成要素がどんな機能を持っているのかを解き明かす研究が今まさに進みつつあります。ゲノム、遺伝子というものが我々の体にどう関わっているのかがダイナミックに分かる時代に研究ができることに幸せを感じます。

大塚 私たちの研究室は、個々の研究室としてはそれぞれ小規模ですが、研究ユニットとしての共同研究を通じ、世界中にインパクトを与えられるような画期的な技術やモデル動物を開発したいという気持ちで研究しています。

新しい技術の開発・改良に取り組むような研究は、営利目的の企業では行われにくいのではないかと思います。既に確立した技術を活用するのが企業だとすれば、自由な発想やアイデアで試行錯誤して、巧く行くかまだ分からない技術の開発に取り組むことができるのはアカデミアならではの強みです。

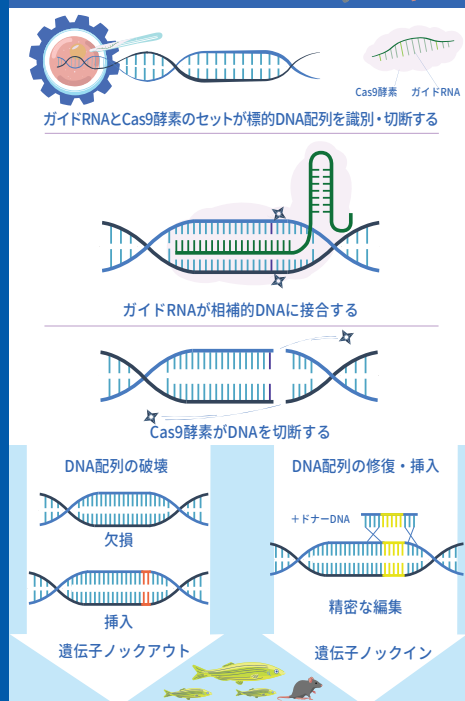
総研プロジェクトとしての研究期間は今年度いっぱい、既にある程度の成果も上がっているのですが、折角こうして一緒に組んで研究できる機会が得られたので、疾患モデルの作成や解析など、引き続き協力して進めたいと考えています。

目的の配列を探してハサミで切る CRISPR/Cas9によるゲノム編集

CRISPR/Cas9（クリスパー・キャスナイン）…

大腸菌などの細菌が持つ免疫システムをヒントとして開発されたゲノム編集技術。DNAの中から特定の塩基配列を探し出し、DNAの二本鎖をその位置で切ることができる。

ゲノム編集技術の最先端 CRISPR/Cas9



一部の細菌は、ファージ（細菌に感染するウイルス）などの外敵に遭遇すると、相手のDNAの一部を自分自身の塩基配列^{*1}の中に取り込んで記憶する。外敵が再度侵入した場合、保存されていたDNAと対になる塩基配列を持つRNAが合成され、新たな外敵のDNAに、記憶したDNAと同一の塩基配列が含まれているかどうかを識別する。同一の塩基配列が仮に含まれていた場合、RNAはDNAを切断するタンパク質（酵素^{*2}）をその配列に誘導し、酵素がDNAを切断することで、ファージの細菌への感染が阻止される。

CRISPR/Cas9法では、標的とするDNAの塩基配列に合わせて人工的にデザインしたRNA（ガイドRNAと呼ぶ）と、DNAを切断する酵素（Cas9）のセットを、微細な針や電気等を用いて、生物の受精卵などに導入する。細胞の中でDNAが切れること自体は自然にも起こる現象であり、切れた二本鎖は細胞が持つ修復機能により修復される。しかしこの時、一部の塩基が欠損するなどの修復エラーが起こったり、または切断部分に別のDNA配列を挿入することも可能であり、それによってDNAが持っていた遺伝情報が改変される。人工的に塩基を欠損させる操作をノックアウト、挿入する操作をノックインと呼ぶ。

ゲノム編集の成功率は生物種や細胞、目的とする操作などによっても異なるが、ノックアウトを目的とした場合、マウスで5~10割、ゼブラフィッシュでは5割ほどである。

^{*1}、^{*2}：細菌の塩基配列のうち、ファージの遺伝情報が保存される箇所をCRISPR座位、ファージのDNAを切断する酵素をCas9タンパク質と呼んでいる。



東海大初の社会連携講座「腎臓病総合病態解析講座」を開設し、協和発酵キリン株式会社との共同研究を開始

東海大学は2018年12月1日付で、医学部医学科内科学系腎・代謝内科学に社会連携講座「腎臓病総合病態解析講座」を開設。2022年3月までの3年4カ月にわたる共同研究を協和発酵キリン株式会社と開始した。社会連携講座は、民間企業などからの共同研究経費を受け、学術と社会の発展の推進および大学における教育研究の進展・充実を図る取り組みで、本学における設置は初めてとなる。

内科学系腎・代謝内科学では、同社の資金提供を受けて15年12月から18年11月まで同名の寄付講座を設置し、駒場大峰 (Hirotaka Komaba) 講師を中



社会連携講座の駒場大峰講師

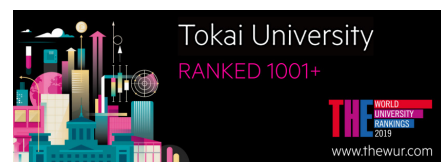
心に、骨・ミネラル代謝異常を中心とした慢性腎臓病の病態解明に取り組んできた。社会連携講座では寄付講座で得られた知見をさらに発展させ、創薬や治療法の開発につながる共同研究を進めていく。

世界大学ランキング（分野別）で私立大学4位

毎年注目を集める英国の「Times Higher Education: THE」による世界大学ランキングの分野別ランキングにおいて、東海大学は「医学」「生命科学」「物理科学」「コンピュータ科学」「工学」の計5分野にランクインし、総合ランキング*では私立大学で国内4位となった。

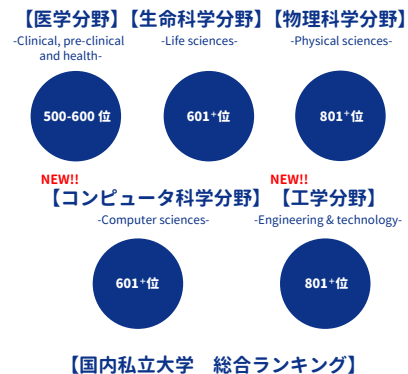
本ランキングは、世界の大学を各学術分野別に評価し、ランク付けしたもので、「Arts&humanities (人文学)」「Education (教育学)」「Business & Economics (経営・経済学)」「Clinical, pre-clinical&health (医学)」「Computer Science (コンピュータ科学)」「Life sciences (生命科学)」などの11分野について世界の大学を評価している。

評価指標はTHE世界大学ランキングと同じ「教育」「研究」「論文の被引用数」「国際性」「産業界からの収入」の5領域13項目で厳しい基準が課され、ランキング形式で発表されている。



Times Higher Education Rankings 2019 (2018年11月30日付)

THE世界大学ランキング（分野別）において、本学は「医学分野」「生命科学分野」「物理科学分野」「コンピュータ科学分野」「工学分野」の計5分野にランクインしました。総合ランキング*では、本学は私立大学で国内4位に輝きました。



- | | |
|-------------|-------------|
| 1 位 (10 分野) | 早稲田大学 |
| 2 位 (7 分野) | 慶應義塾大学 |
| 3 位 (6 分野) | 立命館大学 |
| 4 位 (5 分野) | 東海大学、東京理科大学 |
| 6 位 (4 分野) | 近畿大学 |

*総合ランキング：各大学がランクインした分野数を集計してランキング化したもの

イベント報告

「アグリビジネス新技術説明会」を開催

東海大学は、2018年11月20日（火）に「アグリビジネス新技術説明会」を開催し、農学部バイオサイエンス学科の木下英樹 (Hideki Kinoshita) 講師が講演した。

本イベントは、玉川大学・東京農業大学・日本大学・明治大学・東海大学で構成する首都圏農学系私立五大学が行う、産官学連携によるアグリビジネスの創出を目指した活動の一環として実施しているものである。今回幹事校となった東海大学は、各大学の農学系シーズ紹介とマッチングを目指す場とするべく、本イベントを運営した。



当日は企業関係者が約100名来場し、木下講師の講演後には個別相談にも対応するなど、今後の産学連携につながる可能性を見出すことができた。

総合医学研究所が第14回研修会を実施

東海大学総合医学研究所は2018年12月1日（土）、2日（日）に「いこいの村あしがら」（神奈川県大井町）で、第14回研修会を実施した。本研究所は、本学医科学先端研究の中核拠点として、「ゲノム」「再生医療」「創薬」における基礎・応用研究を一体化させたトランスレーショナルリサーチを推進している。



この研修会は、研究成果の学内外への広報や若手研究者の育成、医科学分野に関連した他の学部や研究機関との連携を促進するため、毎年開いているもので、ここ数年は伊勢原キャンパスで1日のみの開催となっていたが、研究所員らの強い希望により1泊2日の研修会が再開されるはこびとなった。

本年度は基調講演や一般講演が行われ、医学部をはじめ工学部や理学部の教員、大学院生ら約70名が参加した。2日間にわたって実施した一

般講演では10名が研究成果を発表。各テーマについて活発な質疑応答や意見交換が行われた。



デンマーク工科大学研究推進担当者と東海大学研究推進部職員が意見交換を実施

2018年11月21日（水）に開催されたデンマーク工科大学とのジョイントシンポジウムに関連して、同大学・アカデミックオフィサーのMie Morthorst 氏 (Research Support DTU, Research and Relations) と、本学の研究推進部職員が意見交換を行った。

本交流は、Mie氏が本シンポジウムに来日されたことを機に実現したもので、Mie氏からはデンマーク工科大学における研究推進体制やデンマークやEUにおける競争的研究資金に関する施策やその獲得のための支援が紹介された。本学から研究推進体制および特徴的な研究や産学連携事例等を紹介した後、お互いの取り組みについて質疑を交わした。