

ゲノム編集技術が切り開く精神疾患研究の新時代

朴 秀賢

ゲノムワイド関連解析 (GWAS) は精神疾患に関連する一塩基多型 (SNP) を多数同定した。それらの SNP の多くは non-coding region や intron に存在しているため、その機能解析にはゲノム上の任意の部位に任意の変異を加えるゲノム編集技術が必要である。しかし、そのようなゲノム編集は非常に困難であったため大多数の SNP は単に疾患との相関が示されたにすぎず、疾患と SNP との因果関係は不明であった。1994 年の二本鎖 DNA 切断による相同組換え促進の発見を契機に、1996 年に zinc finger nuclease (ZFN) を用いた初めてのゲノム編集技術が開発された。しかし、DNA 認識様式の問題のために ZFN の発展・普及は進まなかった。ところが、2010 年に ZFN の欠点を解消した TAL effector nuclease (TALEN) が開発され数年のうちに普及した。さらに、RNA 誘導型ヌクレアーゼを用いた CRISPR/Cas9 が 2012 年に開発されたことによりゲノム編集技術が短期間に爆発的に進歩・普及し、細胞のみならず個体においてもゲノム上の任意の部位に任意の変異を容易に導入することが可能になり、CRISPR/Cas9 を用いた研究は世界の一流誌に多数掲載されている。そのため、精神疾患の生物学的研究を行っていくうえで CRISPR/Cas9 の知識は今後必須である。本稿では世界の一流誌の重要論文を理解するために必要なゲノム編集技術の基礎知識について CRISPR/Cas9 を中心に解説すると同時に、すでに GWAS により同定されている精神疾患と相関する SNP の機能解析への応用などゲノム編集技術が精神疾患研究に与える新たな可能性について論じる。

<索引用語：GWAS, ゲノム DNA 変異, 相同組換え, ゲノム編集, CRISPR/Cas9>

はじめに

近年の技術の進歩により、精神疾患の病態研究は大きく発展している。まずヒト血液由来のゲノム DNA を用いたゲノムワイド関連解析 (genome wide association study : GWAS) により、精神疾患に関連する一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) や大きなコピー数多型 (copy number variation : CNV) が多数同定された。続いて、次世代シーケンサー (next generation sequencing : NGS) を用いた全ゲノムシーケンスや全エクソンシーケンスにより、精神疾患に関連する SNP や CNV 以外のタイプのゲノム DNA 変異や GWAS では検出できない小さな

CNV などが今後新たに次々と発見されることが期待される。また、ゲノム DNA 変異に加えて、精神疾患と関連するエピジェネティックな状態 (DNA メチル化とヒストン修飾) の変化も次々と同定されてきている。しかし、これらの研究は、単にそれぞれのゲノム DNA 変異やエピジェネティックな変化と精神疾患の相関関係を示したにすぎず、それらのゲノム DNA 変異やエピジェネティックな状態の変化が実際に精神疾患の病態生理においてどのような機能的役割を有しているのかはまったく不明である。したがって、すでに得られているゲノム DNA 変異やエピジェネティクスに関する多くの知見を基に精神疾患の病態研

究をより発展させるためには、実際に動物モデルにおいてそれらのゲノム DNA 変異やエピジェネティックな変化を再現させたときに生じる表現型を検討することが不可欠である。

ゲノム DNA 変異の生体での実際の機能を調べるためには、遺伝子改変マウスの作製が不可欠である。しかし、従来の遺伝子改変マウスの作製方法では、目的の変異を導入するためのベクター作製に多大な労力と時間を要するうえに、受精卵や ES 細胞への目的の変異導入効率是非常に低い。そのため、遺伝子改変マウスの作製には多大な労力と時間、費用を要し、遺伝子改変マウスを用いた研究の大きな障壁となってきた。また、エピジェネティックな変化の遺伝子選択性の分子メカニズムはいまだに不明であるため、特定のゲノム上の領域に任意のエピジェネティックな状態の変化を誘導することは従来の技術では不可能であった。したがって、ヒト血液由来ゲノム DNA を用いた研究により同定された精神疾患に関連するゲノム DNA 変異やエピジェネティックな状態の変化の機能解析を行うためには、容易にゲノムを編集する技術の開発が不可欠である。

本稿では、従来の遺伝子改変マウス作製方法の概要と問題点について述べたうえで、その問題点を克服すべく開発された新規ゲノム編集技術について、今最も注目されている CRISPR/Cas9 を中心に紹介する。加えて、そのようなゲノム編集技術が可能にする精神疾患の病態研究の新展開について解説を行いたい。

I. 従来の遺伝子改変マウス作製方法の概要と問題点

遺伝子改変マウスは、作製方法の違いにより、トランスジェニックマウス (Tg マウス) と遺伝子ターゲティングマウスに大別される。遺伝子ターゲティングマウスには目的遺伝子を欠失させるノックアウトマウス (KO マウス) とゲノム上の特定の領域に目的の配列を挿入するノックインマウスがあるが、作製方法の原理は KO マウスとノックインマウスで同じである。以下では Tg

マウスと KO マウスの作製方法について述べる⁵⁶⁾。

Tg マウスは、目的遺伝子を強制的に発現させることにより、目的遺伝子の機能を解析するために使用されるものである。作製においては、目的遺伝子の cDNA を含む外来遺伝子を作製し、それをマウスの受精卵にマイクロインジェクションする。マイクロインジェクションされた外来遺伝子は一定の確率で受精卵のゲノムに組み込まれる。この外来遺伝子のゲノム DNA への組み込みが生じる確率は決して高くはない。また、組み込まれる外来遺伝子のコピー数は受精卵によって異なるうえに、組み込みはランダムに色々な部位で生じる。そのため、組み込まれても目的通りの適切な発現を得られない確率が高く、1つの外来遺伝子由来の Tg マウスにつき多数の系統マウス作製とスクリーニングが必要であり、作製においては多大な費用と労力、時間を要する。外来遺伝子のゲノム DNA への組み込みの確率の向上を目的としたレトロウイルスベクターを用いる Tg マウス作製方法もあるが、組み込まれる目的遺伝子のコピー数や挿入部位の多様さは変わらないため、根本的には外来遺伝子のマイクロインジェクションと同じ問題を有している。

KO マウスは、目的遺伝子の発現を強制的に欠失させることにより、目的遺伝子の機能を解析するために使用されるものである。作製においては、目的遺伝子の配列全体もしくはエクソンの一部を薬剤耐性遺伝子に置き換えるために作製されたターゲティングベクターを ES 細胞に導入し、抗生物質で選択することにより、ゲノム DNA 上の目的遺伝子を含む領域で相同組換え (Homologous Recombination Repair : HRR) が生じた ES 細胞を同定する。その HRR が生じた ES 細胞をマウスの胚盤胞胚に注入し、偽妊娠させた仮親の子宮に移植することで、生殖系列キメラマウス (生殖細胞が ES 細胞由来) を得ることができる。この生殖系列キメラマウスを野生型マウスと掛け合わせることでヘテロマウス (相同染色体の一方のみで HRR が生じている) が得られ、ヘテロマウス同士を掛け合わせることで、KO マウスが得ら

れる。このような KO マウスの作製過程において、ターゲティングベクターの作製と HRR が生じた ES 細胞の選択・単離にはかなりの労力と時間を要するうえに、HRR が生じる確率はかなり低い。さらに、生殖系列キメラマウスの作製にはまさに職人芸といえる特殊技術が必要であるうえに、生殖細胞がうまく注入した ES 細胞由来になる確率は低い。したがって、KO マウスの作製技術は確立しているものの、実際に作製するにはかなりの労力と時間、そして費用を要するのが現状である。

II. ゲノム編集技術への道 ——CRISPR/Cas9 革命前夜——

上述の通り、従来の遺伝子改変マウスの作製には多大な労力と時間、費用を要するため、より容易かつ短時間で安価に作製できる新たな遺伝子改変マウスの作製方法の開発が求められるようになった。そのような新規作製法による遺伝子改変マウスの効率的な作製は、技術の発達により次々に同定されている数々の疾患関連ゲノム DNA 変異の生体での機能の解明を促進することにより、疾患の病態生理の解明に大きく寄与することが期待される。

遺伝子改変マウスのなかでも、ゲノム DNA 上でランダムに目的遺伝子が組み込まれる Tg マウスよりも、ゲノム DNA 上の特定の領域で目的遺伝子を欠損・挿入させることができる遺伝子ターゲティングマウス (KO マウスとノックインマウス) の使用が、疾患研究において主流になっている。遺伝子ターゲティングマウスの作製過程における複数の困難さのうち、最も作製効率に影響を及ぼしているのは、HRR が生じる確率の低さである。そこで、より効率のよい遺伝子ターゲティングマウスを作製するためには、HRR の確率を上げるか、より生じる確率の高い別の DNA 修復機構を利用する必要がある。

DNA の塩基配列が互いに類似した部位 (相同部位) で生じる組換えである HRR は、放射線や化学物質により損傷された DNA の修復機構の 1

つとしてよく知られている。自然に HRR が生じる可能性は低いため、HRR の確率を上げるためには、ゲノム DNA に何らかの損傷を加える必要がある。1994 年に二本鎖 DNA 切断が HRR を促進することが見出された。また、固有の配列を認識して二本鎖 DNA を切断する酵素として、制限酵素 (ヌクレアーゼ) の存在は広く知られており、遺伝子工学の重要なツールとして汎用されている。これらのことから、ゲノム DNA 上の目的の領域をヌクレアーゼで切断することにより、目的の領域における HRR の確率を上げ、より容易にゲノム DNA を編集することができるのではないかと考えられた。また、HRR よりも生じる確率が高い DNA 修復機構として非相同末端結合 (Non-Homologous End-Joining: NHEJ) が存在している。NHEJ においては、修復の際に数塩基の欠損・挿入が高頻度に生じる。そのため、NHEJ を利用すれば、HRR により薬剤耐性遺伝子などに置換しなくても、目的遺伝子のエクソン内をヌクレアーゼにより切断することにより、NHEJ によりフレームシフトが生じてストップコドンが高確率に産生される結果、HRR を利用した従来の方法よりも KO マウスを効率よく得られる可能性が期待される。

そこで、転写因子由来で特定の DNA 配列を認識することができる zinc finger domain (ZF) と、認識配列が長く配列特異性が高いヌクレアーゼである Fok I を合体させて作製された人工ヌクレアーゼ zinc finger nuclease (ZFN) が、初めてのゲノム編集技術として 1996 年に開発された⁴⁾。この ZFN は革命的な技術であったが、目的の DNA 配列を認識する ZF を理論的に設計することが困難であるため、目的の DNA 配列を認識する ZF を選択するために ZF ライブラリーを用いたスクリーニングが必要であり、このスクリーニングにはかなりの労力と時間を要した。そのため、遺伝子改変マウス作製への応用にはかなり時間を要し、結局普及せず、ゲノム編集技術は沈滞していた。

このように ZFN の技術的限界のために沈滞していたゲノム編集技術の再発展のきっかけとなっ

たのが、2010年に開発された TAL effector nuclease (TALEN) である¹⁾。TALEN は ZFN と同様にヌクレアーゼとして Fok I を用いているが、DNA 認識には ZF ではなく TAL effector を用いている。TAL effector というのは、植物病原細菌のキサントモナス属由来の転写因子様蛋白である。その大きな特徴としては、TAL effector の DNA の認識部位がモジュール構造を有しており、認識させたい目的の DNA 配列に応じてモジュールを組み合わせるにより、多少手間は要するものの、ZFN よりもはるかに容易かつ理論的に DNA 認識部位を設計・作製することが可能になった。このため、TALEN の技術開発やその応用は短期間のうちに発展したが、DNA 認識を蛋白質が担っているため、モジュールの組み立てに労力と時間を要していた。

Ⅲ. CRISPR/Cas9

——ゲノム編集技術の革命児——

TALEN の技術開発や応用が発展しつつあった 2012 年、まったく異なる原理に基づくゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 が開発された。TALEN と CRISPR/Cas9 の最大の違いは、前者は DNA 認識を蛋白質が担っているのに対し、後者は DNA 認識を短い RNA が担っていることである。そのため、CRISPR/Cas9 においては認識させたい目的の配列に対応したオリゴ DNA を合成するだけで目的の部位にヌクレアーゼを誘導可能であり、TALEN で TAL effector のモジュールを組み立てることに比べるとはるかに簡便である。そのため CRISPR/Cas9 は驚異的な速さで普及し、関連する技術の開発も爆発的に発展し、ゲノム編集技術に大きな革命をもたらした。

九州大学の石野良純らによって行われた大腸菌の遺伝子解読により、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) という、謎の繰り返し配列が大腸菌のゲノム DNA に存在していることが 1987 年に見出された²⁾。続いて、CRISPR はさまざまな細菌に広く存在していることが示された。CRISPR の機能は長年不明

であったが、CRISPR 配列の近傍に細菌間で保存された遺伝子クラスター (CRISPR associated: Cas) の存在が明らかとなり、Cas ファミリー遺伝子として 45 個の遺伝子が同定された。これら 45 個の遺伝子のなかには、配列情報からヌクレアーゼ活性を有しているのではないかと予測されるものが多く含まれていた。さらに、CRISPR 配列同士の間には、バクテリオファージやプラスミドの配列が多数含まれていることが明らかとなり、CRISPR は細菌の獲得免疫に関与しているのではないかと推測されるようになった。これらの推測に基づいて多くの研究がなされた結果、最終的には、CRISPR/Cas は、細菌においてファージやプラスミドなどによる外来遺伝子の侵入を排除する獲得免疫機構であり、これらの外来遺伝子を分解するために Cas ファミリー遺伝子の多くがヌクレアーゼをコードしており、ヌクレアーゼ活性を有する Cas ファミリー遺伝子のなかで最も重要な遺伝子が RNA 誘導型ヌクレアーゼ Cas9 であることが示された。

これらの知見をもとに、2012 年に Doudna, J. A. と Charpentier, E. らは、CRISPR と Cas9 をうまく利用し、目的のゲノム DNA 上の部位に対応した短い DNA 配列と CRISPR に由来する DNA 配列から構成される guide RNA (gRNA) と Cas9 遺伝子を細胞に同時に導入することで、目的のゲノム DNA 上の部位に結合した gRNA に強制発現された Cas9 を誘導し、目的の部位を切断することにより、目的遺伝子の発現を抑制することに成功した³⁾。CRISPR/Cas9 においては細胞に核酸を導入するだけでよく、gRNA の部位特異性は 20 塩基程度の短い配列で決まるため設計も容易であり、とくに KO マウスを作製する場合には HRR よりも生じる頻度が高い NHEJ を利用できる。加えて、ES 細胞の培養や相同組換え体の単離、キメラマウスの作製など、KO マウスの作製において非常に労力と時間を要する過程がすべて不要となり、単に核酸を受精卵に導入して仮親に戻すだけである。このため、CRISPR/Cas9 による KO マウス作製が容易となり、1 ヶ月程度という短期間で

特殊技術を必要とせず誰でも気軽に KO マウスを作製できるようになった。ノックインマウスの作製には HRR を利用するため、CRISPR/Cas9 を用いても作製効率は KO マウスに比べると低くなってしまふ。それでも、KO マウスの場合と同様に、ES 細胞の培養や相同組換え体の単離、キメラマウスの作製など、KO マウスの作製において労力と時間を要する過程がすべて不要となるため、従来よりもはるかに効率が向上している。

このように、CRISPR/Cas9 は簡便なゲノム編集技術により遺伝子ターゲティングマウスを容易かつ迅速作製することを可能にしたため、爆発的に普及し、関連技術がもの凄い勢いで発展している。加えて、必要なベクター類の多くは Addgene にて安価で入手可能であるのも大きな魅力である。CRISPR/Cas9 は今後ゲノム編集技術の中核としてさらに発展していくことが期待される。

IV. CRISPR/Cas9 が切り開く 精神疾患研究の新時代

CRISPR/Cas9 の部位特異性は 20 塩基程度の短い配列により規定されているため DNA 認識に必要な gRNA の設計が非常に容易である。また、CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子ターゲティングマウス作製においては、非常に労力と時間を要する ES 細胞やキメラマウスの作製が不要で、受精卵に gRNA と Cas9 の配列を組み込んだベクターを直接注入するだけで目的の変異体を高確率で得ることが可能である。必要なプラスミドの入手も容易で安価であり、プラスミドの作製は非常に簡単である。そのため、専門家以外の研究者でも、遺伝子ターゲティングマウスの作製を 1 ヶ月程度という極めて短期間のうちに容易に行うことが可能になった。従来の作製方法による遺伝子ターゲティングマウスの作製は、遺伝子ターゲティングマウスの作製経験が乏しい精神科医および精神疾患の研究者にとってかなり敷居の高いものであった。しかし、CRISPR/Cas9 によりその敷居がかなり低くなり、以前に比べ気軽にヒトサンプルを用いて同定された精神疾患に関連するゲノ

ム DNA 変異の生体での機能解析を自ら行うことが可能になったと考えられる。このような精神疾患に関連するゲノム DNA 変異の生体での機能解析がより迅速に広範囲に行われることにより、精神疾患の病態解明が爆発的に発展することが大いに期待される。

遺伝子ターゲティング動物の作製に際し、従来の方法では ES 細胞が必要不可欠であるため、ES 細胞の培養系が樹立されているマウスでのみ遺伝子ターゲティング動物の作製が可能であった。しかし、マウスで施行可能な行動テストが限られているため、精神疾患研究のモデル動物としては、施行可能な行動テストが多く中枢神経系研究で汎用されているラットや、マーモセットなどのよりヒトに近い哺乳類がより適している。CRISPR/Cas9 による遺伝子ターゲティング動物作製には ES 細胞は不要であるため、ラットやマーモセットなどより精神疾患のモデル動物として適している動物で遺伝子ターゲティング動物を作製することが可能になった。マウスで施行不能であった行動テストを遺伝子ターゲティングラット・マーモセットで施行することにより、遺伝子変異が行動に及ぼす作用への理解が深まることが大いに期待される。

近年、ゲノム DNA の変異に加えて、精神疾患に関連する DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな変化が数多く同定されつつある。エピジェネティックな変化の部位特異性の分子メカニズムはいまだに不明であるため、このような精神疾患に関連するエピジェネティックな変化を動物で再現することが従来は不可能であった。しかし、Cas9 と DNA メチルトランスフェラーゼ、ヒストンアセチラーゼ、ヒストンメチラーゼを融合させた遺伝子を強制発現させることにより、gRNA により誘導した目的の部位で DNA メチル化、ヒストンアセチル化、ヒストンメチル化などのエピジェネティックな変化を誘導することが可能になった。今後、Cas9-エピジェネティック関連蛋白複合体と gRNA を組み込んだウイルスベクターを精神疾患への関与が指摘さ

れている脳内領域に局所注入することにより、精神疾患に関連するエピジェネティックな変化の生体での機能解析が可能になることが大いに期待される。

おわりに

今までの精神疾患研究の主流は臨床サンプルを用いたゲノム解析であり、精神疾患に関連するゲノム DNA 変異やエピジェネティックな変化が多数同定されてきた。しかし、臨床サンプルを用いた研究は所詮相関をみているにすぎない。そのような研究により同定されたゲノム DNA 変異やエピジェネティックな変化が精神疾患の病態において実際に何らかの機能を担っているのか否かは、遺伝子改変マウス作製の敷居が精神科医や精神疾患の研究者にとってかなり高く、マウスよりも精神疾患研究のモデル動物として適しているラットやマーマウスで遺伝子改変動物を作製できないため、まったく不明であった。革命的なゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 は、遺伝子改変動物の作製の敷居を大きく下げたうえにラットやマーマウスでの遺伝子改変動物作製を可能にすることにより、精神疾患に関連するゲノム DNA を変異やエピジェネティックな変化の機能的意義の解明を促進し、精神疾患研究を大きく発展させることが期待される。そのため、精神疾患研究を志す

者すべてが CRISPR/Cas9 についての正しい知識を学び、今後の研究に活かしていく必要がある。本稿が CRISPR/Cas9 について学ぶきっかけになれば幸いである。

なお、本論文に関連して開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., et al. : Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186 ; 757-761, 2010
- 2) Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., et al. : Nucleotide sequences of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 169 ; 5429-5433, 1987
- 3) Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, L., et al. : A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337 ; 816-821, 2012
- 4) Kim, Y. G., Cha, J., Chandrasegaran, S. : Hybrid restriction enzymes : Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 ; 1156-1160, 1996
- 5) 鈴木 操 : トランスジェニックマウス作製技術. *日薬理誌*, 129 ; 325-329, 2007
- 6) 竹田直樹 : 相同組換え法による遺伝子破壊マウス作製技術. *日薬理誌*, 129 ; 330-336, 2007

Genome Editing Technology Opens up a New Era of Research on Psychiatric Disorders

Shuken BOKU

Department of Psychiatry, Kobe University Graduate School of Medicine

Genome wide association studies (GWAS) have identified many single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with psychiatric disorders. Such GWAS have revealed correlations between SNPs and psychiatric disorders, but not causal association between SNPs and psychiatric disorders. In addition, it was previously impossible to intentionally edit the genome to reconstruct such SNPs in animal models because of technical limitations. Therefore, it remains unclear whether the identified SNPs associated with psychiatric disorders function in the pathophysiology of psychiatric disorders.

In 1996, zinc finger nucleases (ZFNs) were developed as the first genome editing technology based on the stimulatory effects of DNA double-stranded breaks on homologous recombination repair. However, ZFNs were not widely used because of the technical difficulty in designing DNA recognition sites corresponding to targeted sequences. In 2010, TAL effector nucleases (TALEN) were developed as an alternate genome editing technology which overcame the problem with ZFNs described above. Although TALEN became widely used for a few years, CRISPR/Cas9, a revolutionary genome editing technology entirely different from ZFNs and TALEN, was developed in 2012. It quickly replaced TALEN and has become the most common genome editing technology. CRISPR/Cas9 will greatly advance studies on psychiatric disorders because it facilitates the production of genetically engineered animals.

This review first provides a history of the development and basic knowledge of genome editing technologies focusing on CRISPR/Cas9. Next, this review discusses the expected roles for CRISPR/Cas9 in future studies on psychiatric disorders.

< Author's abstract >

< **Keywords** : GWAS, genomic variation, homologous recombination repair, genome editing, CRISPR/Cas9 >
