

## DNA 配列の解読からゲノム情報の加工へ

世良 貴史

マキサム・ギルバート法およびサンガー法に始まる DNA 配列決定技術は、Venterらのショットガン法により、ゲノム配列を迅速に決定できるようになるまで飛躍的に進歩し、これにより、すでにヒトを始め植物から動物までさまざまな生物のゲノム情報が明らかとなってきた。そのゲノム情報はいわば生物の設計図であり、次の段階はそのゲノム情報をいかに有効に利用するかが重要となってきている。

ゲノム情報の活用法のひとつとして、ゲノム情報の改変が挙げられる。そのためには、ゲノム情報を望むように加工できるツールの開発が重要である。これらツールを用いて、ゲノム情報を改変することにより、特定の遺伝子の機能解析や新しい機能を有する生物の創出が可能になるからである。たとえば、もしゲノムDNAを目的の位置で切断できれば、ゲノムの修復機能を利用した相同性組換えにより、局所的に望みのゲノム情報に変換することが可能となる。すなわち、外部から核へ導入したDNA情報によるゲノム情報の変換が可能になる。また、DNA切断時に外部からDNA断片を導入しなければ、別のゲノム修復機能である非同源性末端結合反応により、ゲノムの欠損を生じさせることができる。この反応を応用することにより内在性遺伝子のノックアウトが可能になる。以上の目的のためには、ゲノムを対象にした特異的なDNA切断分子あるいは人工制限酵素が必要である。

ゲノム情報が明らかになるずっと以前からDNAを望む場所で切断する人工分子の開発が試みられてきた。たとえば、Dervanらは1本鎖DNA末端にFe(II)-EDTA部位を融合させた切断分子を合成したり<sup>1)</sup>。この分子は、標的2本鎖DNAとの3本鎖DNA形成により標的配列を特異的に認識し、酸化的に切断する。また、Schultzらは、リプレッサーとスタフィロコッカス・ヌクレアーゼとの融合タンパク質を作製し、これを用いて試験管内での特異的DNA切断に成功している<sup>2)</sup>。

また、制限酵素の特異性の改変も試みられてきた。通常遺伝子組換えに用いられている制限酵素の認識配列は6~8塩基対と非常に短く、ゲノム上の1箇所のみを切断には用いることができないが、16塩基対以上を認識できるホーミング・エンドヌクレアーゼが単離されており、その改変により標的配列の拡充を目指した研究も報告されている<sup>3)</sup>。現在のところ、そのレパートリーはまだまだ少ないのが現状であり、望みのゲノム配列を自由に切断できるまでには至っていない。

そうした中、2001年にChandrasegaranらによって最初にその有用性が示されたジンク・フィンガー・ヌクレ

アーゼ<sup>4)</sup> (zinc-finger nuclease, ZFN) が、ゲノムを対象にした人工制限酵素としてもっとも有望視されている。このZFNは、標的DNA配列を特異的に認識する人工ジンク・フィンガータンパク質<sup>5)</sup> (ZFP) に、制限酵素FokIの触媒部位を融合させたものである。切断させたい箇所の上流および下流を認識するZFNを用いると、分子間でFokIが2量体を形成することにより2本鎖DNAを1箇所切断する。ZFNが報告される以前にPaboやKlugをはじめとする複数の研究グループにより、多様なDNA配列を認識する人工ZFPの創出法が確立されていたため、その恩恵に与ることができた。ZFNは、最初の報告以降さまざまなタイプが作製され、動物細胞あるいは生物個体において、ゲノム上の標的遺伝子の改変やノックアウトが可能であることが示されてきた<sup>6)</sup>。現在までに、マウス、ブタ、シロイヌナズナ、トウモロコシ、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエなどの多様な生物におけるゲノム改変が報告されている。

さらに、ZFPにトランスポゼースあるいはインテグラーゼを融合させた新しい人工酵素も報告されている<sup>7)</sup>。これらを用いて、DNAを挿入する酵素活性を標的のゲノム領域にリクルートすることにより、外来遺伝子を特定のゲノム領域に挿入する試みも報告されるなど、今後ゲノム情報を望むように加工するさまざまなゲノム工学用のツールの開発が期待される。

今後の応用として、上記の技術を、ES細胞およびiPS細胞をはじめとする再生技術と組み合わせることにより、ヒトの各種遺伝的疾患を引き起こす遺伝子変異を正常な状態に戻すことによる、究極の“遺伝子の治療（修復）”が将来可能となるかもしれない。また、ヒトゲノムの望みの位置に遺伝子を導入することが可能になれば、副作用のない新しい遺伝子治療用ベクターの開発につながり、（ヒトゲノムへの遺伝子挿入位置を制御できず、白血病を誘発させたため）現在中断されている遺伝子治療の画期的な代替法となり、さまざまな病気で苦しんでいる人々を救えるようになることが期待される。

- 1) Moser, H. E. *et al.*: *Science*, **238**, 645 (1987).
- 2) Pei, D. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 4579 (1990).
- 3) Doyon, J. W. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2477 (2006).
- 4) Bibikova, M. *et al.*: *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 289 (2001).
- 5) Sera, T.: *Adv. Drug Delivery Rev.*, **61**, 513 (2009).
- 6) Carroll, D.: *Hum. Genetics*, **188**, 773 (2011).
- 7) Voigt, K. *et al.*: *Mol. Ther.*, **20**, 1852 (2012).