

ゲノム構築技術による創薬研究基盤の開発

研究代表者：東京工業大学 相澤 康則

【基本構想】

相澤研究室では世界に先駆けて、ヒトゲノムを大規模に改変できる技術を開発している。このゲノム工学技術は、ノーベル賞を受賞したゲノム編集技術単独では不可能なヒトゲノム改変を可能とすることから、本新法を使って創出されるヒト細胞は画期的な創薬研究の基盤となると期待されている。また相澤研は、世界で初となる真核生物ゲノムの全合成プロジェクトに日本から唯一に参加し、世界水準のゲノム合成技術を培ってきた。本研究プロジェクトでは、これらゲノム工学技術を活用して、2つの新しい創薬プラットフォームの構築を目指している。1つめは疾患モデル iPS 細胞の開発である。健常者 iPS 細胞のゲノムを改変し、疾患原因遺伝子に実際の患者に見られる変異を導入した iPS 細胞を人工的に作るプロジェクトである。疾患に見られるゲノム変異を導入した人工ヒト細胞は疾患原因解明や新薬探索に活用できる。本研究では、ある神経性疾患のモデル iPS 細胞の作成を通して本実験系を開発する。2つめは新型コロナウイルスに対する創薬基盤技術の開発である。相澤研の長鎖 DNA 合成技術を活用して SARS-CoV-2 人工ゲノムを構築し、来るべきウイルスパンデミックに備えるために本感染症に対する高速並列型の新薬探索システムにつながる基盤技術を開発する。本研究によって県内の創薬研究開発をさらに活性化させ、バイオスタートアップ企業が神奈川から次々と生まれる未来創造に貢献する。

1. 研究目的

本研究では、ヒトゲノム大規模改変技術を活用して、2つの創薬プラットフォームを構築している（図1）。

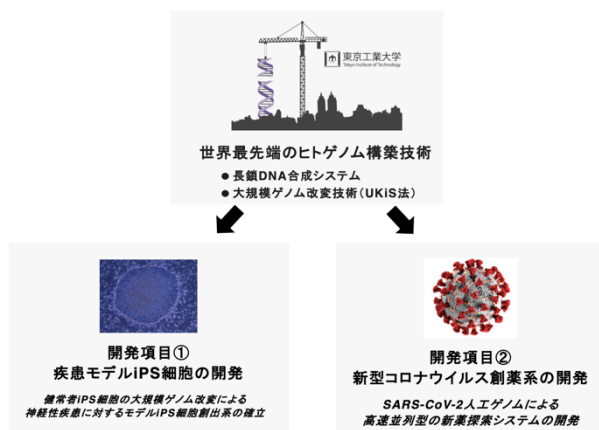


図1：本研究プロジェクトの概要。

1つめは疾患モデル細胞の開発である。疾患モデル細胞とは、健常者由来細胞のゲノムを改変し、遺伝性患者に実際に見られる変異をゲノムに導入したヒト細胞株を指す。現在 iPS 細胞を活用した創薬研究が成果を出し始めているものの、健常者由来 iPS 細胞と患者由来 iPS 細胞は遺伝的背景が異なるため、それらの比較による創薬探索には元々困難なものであり、それを克服するために、多くの iPS 細胞検体を用意する必要がある。しかし疾患モデル細胞は、健常者細胞に注目する遺伝子変異を導入するものであるため、それ以外のゲノム領域は完全同一であり、遺伝的背

景の差異は大きく軽減される。そのため疾患モデル細胞は、遺伝子変異の影響を調べる上で便利な細胞となり、疾患原因解明や新薬探索を加速させるメリットがある。本研究では相澤研が開発した大規模ゲノム改変技術（Universal Knock-in System 法；UKiS 法；図2；7月13日に Nature Communications 誌への正式な論文受理）を活用し、遺伝性疾患のモデル iPS 細胞を開発している¹。

2つめの創薬プラットフォーム開発では、新型コロナウイルス感染症に対する創薬技術の開発を目標としている。依然として収束が見えないコロナ禍における社会貢献だけでなく、今後世界を再び混乱に陥れるような別種ウイルスによる感染症に対する迅速な技術的対応を可能にすべく、本プロジェクトではコロナウイルス人工ゲノム構築のルーチン化を目指している。ウイルスゲノム全合成の基盤技術を確立することで、ウイルス全般による感染症に対する創薬技術基盤の確立を目指している。

プロジェクト1年目となる2021年度は、以下の3つの研究項目を推進した：

(1) ゲノム構築技術を活用した疾患モデル iPS 細胞の作製

本年度は、ある脳神経系の遺伝性疾患（以下、疾患 X；）の患者によく見られるゲノム変異をもつ iPS 細胞の作成を目指した。疾患 X の原因遺伝子として知られている遺伝子 Y の部位に特異的に、疾患特異的な変異の導入を試みた。（なお、特許出願前のため疾患名および遺伝子名を伏せておく）

(2) 疾患 iPS モデル細胞の神経前駆細胞への分化

(1)で作成する疾患モデル iPS 細胞の機能特性を評価する

ための実験系の確立を目的とし、コントロールとなる健常者由来 iPS 細胞の神経細胞への分化を実施した。

(3) 新型コロナウイルス人工ゲノムの構築

コロナウイルス SARS-CoV-2 (武漢型) を対象に、その一部を改変した人工ゲノムの合成を目標とした (図 3)。本改変を施すことで、本ゲノムをヒト細胞に導入しても最終的にウイルス粒子を作らないため、この人工ゲノムを使った感染経路の解明研究や治療薬の開発には、バイオセーフティーレベル 3 の施設を使う必要がなく、より多くのユーザーの使用が可能となる。

UKiS法: ヒトゲノムの大規模精密改変法

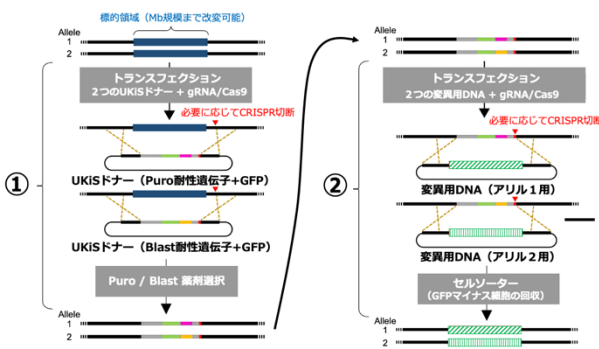


図 2: UKiS 法の概要¹。2 段階の相同組換えによって、狙ったゲノム領域の両アレルを好きな配列に置換が可能である。

SARS-CoV-2 ゲノム ((+)鎖RNA : 29.9k nucleotides : MN_996528)

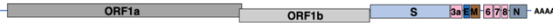


図 3: 本研究対象のコロナウイルスゲノムの概略図。実際は、一部のゲノム部位を改変したゲノムの全合成を進めている。

酵母を使った長鎖DNA合成法 (Gap repairing method)

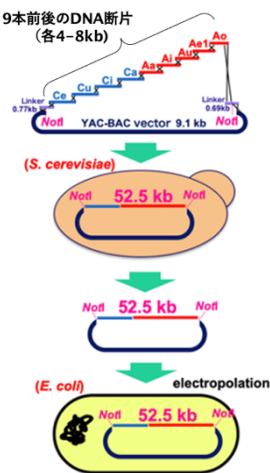


図 4: 本研究で用いる長鎖 DNA 合成法 (ギャップリペアーキング) の概略図。末端が同じ配列を持つ 9 本前後の DNA 断片と、YAC-BAC ベクターを同時に酵母に導入することで、一気に全 DNA 断片が連結される。連結されたベクターは大腸菌に形質転換して大量調製するスキームである。

本ゲノム合成では、相澤研ですでに確立している長鎖 DNA 合成技術を活用する。相澤研は、約 1,200 万塩基対もの長さの出芽酵母ゲノムの全合成を推進している国際コンソーシアム Sc2.0 に日本から唯一参加している研究グループであり、これまでに発芽酵母の最も長い第 4 染色体 (150 万塩基対) の全合成を米国グループの共同で完了している。この国際共同研究で培った長鎖 DNA 合成技術の一つ、ギャップリペアーキングを全長 3 万塩基対のコロナウイルスゲノム全合成においても活用する (図 4)。

2. 研究成果

以下に挙げるのは、令和 3 年度の具体的な研究成果である。ほぼ計画通り順調に進んでいる。

(1) ゲノム構築技術を活用した疾患モデル iPS 細胞の作製

図 2 に示した UKiS 法を用いて、健常者由来 iPS 細胞に対して 2 段階の相同組換えを介して、遺伝子 Y への変異導入を試みた。UKiS 法の 2 段階目で実施したセルソート後に得られた iPS 細胞クローンをそれぞれ拡大培養したのち、それぞれのクローンからゲノム DNA を抽出した。これらゲノム DNA を鋳型に、今回変異を導入したゲノム部位を挟むように PCR を実施して、期待する変異が入っているかどうかを検証した。得られた 4 クローン細胞に対する PCR の結果を図 5 に示す。

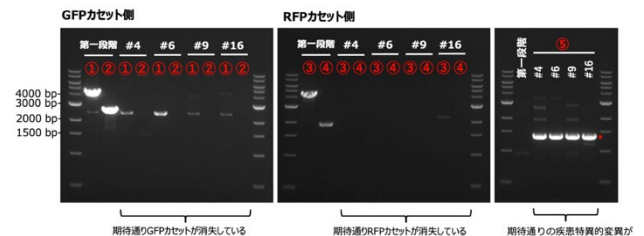


図 5: 4 種類の iPS 細胞クローン (#4、#6、#9、#16) と、改変前の iPS 細胞から抽出されたゲノム DNA に対する PCR の結果。

左と真ん中のゲルで電気泳動したサンプルは、改変前の iPS 細胞ゲノムを用いた場合に増幅が起こる PCR 産物であり、これらゲル上では、改変前 iPS 細胞に相当するレーンでのみ増幅が起きている。一方、右のゲルでは、期待する変異導入に成功していることを示す 1,400 塩基対くらいの PCR 産物が確認できていた。この結果から、本年度の実験により、疾患 X のモデル細胞が 4 クローン得られたことになる。

この疾患 X モデル細胞開発の過程では、UKiS 法でもちいるプロモーターの最適化も実施した。UKiS 法の 1 段階目でターゲットゲノム部位に挿入する UKiS マーカー遺伝子がより安定に発現するように、新しいプロモーターを今回開発した。

これまで使っていた全長約 210 塩基対のプロモーターの代わりに、全長約 2,500 塩基対のプロモーターを使って、

遺伝子Yのターゲット領域の両アリルをUKiS マーカー遺伝子に置換した iPS 細胞を薬剤選択により得た。これら細胞を 13 日間連続で培養し、その結果マーカー遺伝子である GFP および RFP の発現を消失した細胞の割合をセルソーターで解析した (図6)。その結果、期待通りに新しいプロモーターで転写されるマーカー遺伝子は両アリルにおいて、13 日後もほぼ 100%安定に発現していることが確認された。これまでの 210 塩基対のプロモーターでは、13 日後には 50%以上の細胞で GFP マーカー遺伝子の発現が優位に消失してしまっていたことから、このプロモーターの有用性は顕著であった。

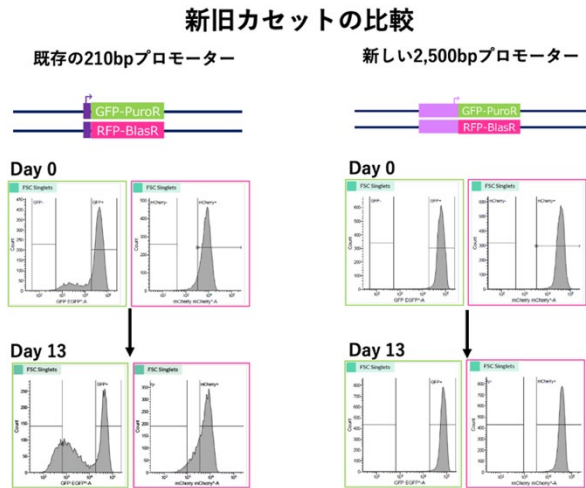


図 6 : UKiS マーカー遺伝子を発現させるためのプロモーターの最適化。FACSによって、マーカー遺伝子である GFP および RFP を発現している細胞比の変化を解析した。

(2) 疾患 iPS モデル細胞の神経前駆細胞への分化

本年度開発できた疾患 iPS 細胞の有用性を評価する実験の準備として、未分化 iPS 細胞を神経前駆細胞 (NPC) に分化させる実験系の導入を行った。専用培地に交換後、7 日間毎日培地交換を行った後、細胞から全 RNA を抽出し、6 種類の遺伝子に対する定量 RT-PCR を実施した。その結果図7に示すように、期待通りに2種類の未分化マ-

iPSCとiPS由来神経前駆細胞 (NPC) での分化マーカー発現量の比較
未分化マーカーの発現量比較 (分化誘導していないiPSCを1とする)

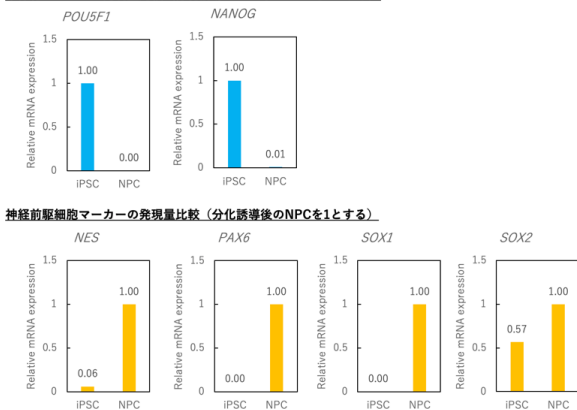


図 7 : 定量 RT-PCR による iPS 細胞の神経前駆細胞への分化評価実験。

カー遺伝子 (POU5F1 および NANOG) の発現は 7 日後細胞では失われた一方、4 種類の NPC マーカー遺伝子 (NES、PAX6、SOX1、SOX2) の発現は 7 日後に顕著に増加していることが、確認された。

令和4年度では、NPC をさらにニューロンやアストロサイトに分化させるプロトコールも導入し、本研究で作成する疾患 X モデル細胞の活用事例を増やし、創薬研究での有用性を示せるようなデータの蓄積を計画している。

(3)新型コロナウイルス人工ゲノムの構築

本プロジェクトで合成するコロナウイルスゲノムは武漢型の塩基配列を有するものをベースに設計されている (図8)。上述のように、バイオセーフティーレベル2の施設でも本ゲノムを使った研究開発が可能になるように、ヒト細胞の感染に不可欠なスパイクタンパク質部分を改変し、その安全性を下げる工夫がされている。また、実際のコロナウイルスは RNA ゲノムを有するため、本プロジェクトでは、コロナウイルスの塩基配列を有する長鎖 DNA を合成した上で、それをインビトロ転写することでゲノム RNA を調製する実験系の構築を進めている。

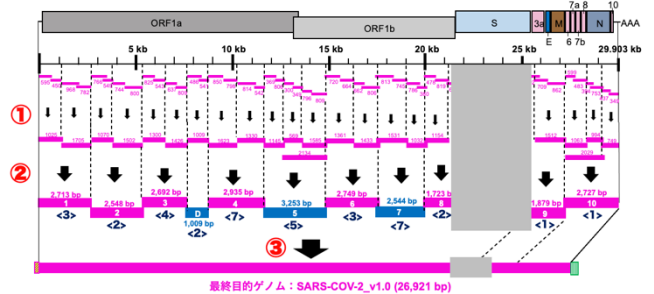


図 8 : コロナウイルスゲノム合成のスキーム。約 50 種類の数百塩基対の DNA 断片を 3 段階で連結し、全長ゲノム断片を得る。図の一部を伏せてある。

以上のようなコンセプトで設計された人工コロナウイルスゲノム DNA は図8に示すように、短い DNA 断片を 3 ステップで段階的に連結することで合成するスキームを採用した :

① : ウイルスゲノムの DNA 断片 (300-900 塩基対長) を 2 本あるいは 3 本ずつ混ぜ、オーバーラップ PCR によって連結させた。これら短い DNA 断片は、ウイルスゲノム上では隣り合った配列に相当しているため、連結によって 1,000-2,000 塩基対長のウイルスゲノム断片が得られた。得られた連結 DNA は全てクローニング後、配列確認して期待するウイルスゲノム配列であることを確認している。

② : 第 1 段階で得られた断片のうちウイルスゲノム上で隣り合ったものを 2 本ずつ混ぜ、さらなるオーバーラップ PCR によって連結を試みた。その結果、全ての PCR 後に期待する長さの DNA 断片が得られたため (図9)、それらをプラズミドにクローニングし、配列確認を行った。

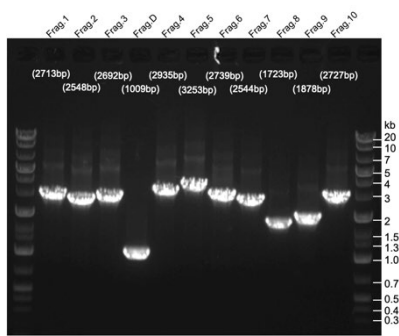


図9：第2段階後に得られた11本のDNA断片をアガロース電気泳動解析の結果。

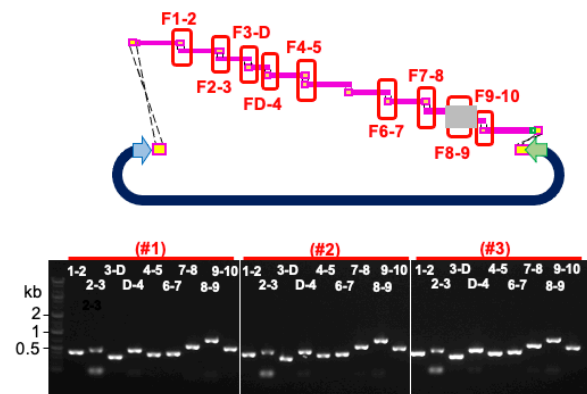
その結果、前ページの図中で三角括弧 (∠) 内に示す塩基数で、コロナウイルスゲノム配列（武漢型）と異なる塩基がそれぞれのDNA断片で確認された。そのため、これら塩基対は全てプラスミド上で塩基置換法によって改変し、全て武漢型の配列へと修正を行った。

③：第2段階で配列修正を完了したDNA断片を、YAC-BACベクターと共に出芽酵母に細胞導入することでギャップリペアクローニング法によって全11種類のDNA断片を同時に連結させ、最終目的である人工ウイルスゲノム（SARS-CoV-2_ver1.0）の作成を試みた。このゲノムの上流下流にはそれぞれプロモーターとポリA付加シグナルがつくようにYAC-BACベクターを加工してある。YAC-BACベクターのバックボーンにあるカナマイシン耐性遺伝子によって薬剤選択を行い、66個のコロニーが得られた。

これら全コロニーに対して、ジャンクションPCRを実施し、第3段階目でYAC-BACベクターと混ぜた11種類のDNA断片全てが正しい方向で連結しているクローンの選別を実施した。まずはゲノム配列に中央に相当する#5と#6のDNA断片の境界を増やすPCRをまずは行ったところ、66クローンのうち8クローンで期待する長さのPCR増幅が確認された。そこでこれら8クローンに対して、残りの9境界に対するPCR増幅テスト（ジャンクションPCR）を実施し、1断片全てが設計通りの順番で連結しているかどうかを調べたところ、3クローンでPCR増幅が確認されたことから、これら3クローンでは11種類のDNA断片が全て期待する順番で連結している可能性が示された（図9）。

以上の結果から、SARS-CoV-2ゲノム全合成を本年度中に完了することができた。

その後令和3年度ではさらに、得られたYAC-BACベクターを大量調製する実験系の構築に進んでいる。これまでの結果から、図4に示したように酵母で作ったYAC-BACベクターを大腸菌で大量調製することを試みたが、定法では不可能であることが判明した。その後、様々なアイデアを試し現時点ではその最適実験スキームの確立に成功しているため現在、特許出願に向けた実験データの取得を進



めている。

図10：ジャンクションPCRによるDNA断片連結評価実験。3つのクローンで9つのジャンクションで期待する連結が起きていることが確認された。図の一部を伏せてある。

3. 今後の展望

開発項目①：ゲノム構築技術を活用した疾患モデルiPS細胞の創出とその活用

疾患Xに見られる遺伝子変異は多種多様であるため、令和4年度は、3年度に確立した技術基盤を活用し、別のタイプの疾患XモデルiPS細胞株を作製し、疾患Xでの創薬研究開発での細胞株レポトリを充実させる。これまでのところ最低合計7種類の細胞株を作製する。

一方で、疾患Xが脳神経系疾患であることから、モデルiPS細胞を様々な神経細胞へ分化させて、その細胞機能を調べることも計画している。仮説通りであれば、疾患X発症の原因だと考えられている変異を導入したiPS細胞では、疾患Xから予想される表現型を示すことになる。もしそうなれば、本疾患モデル細胞は直ちに疾患発症メカニズムの解明に向けた研究での貴重な資源であることの証明となる。

そこでこの実証に向けて研究を加速させるために、細胞の機能解析を多角的に実施し、本疾患モデルiPS細胞の学術的優位性と産業的有用性を実証するための共同研究を加速させる。現時点では3大学との共同研究実施に向け協議を開始している。各大学とはそれぞれ異なる観点から、疾患Xモデル細胞に対する解析を実施できることから、本細胞の新しい有用性を明らかにできると期待される。

開発項目②：新型コロナウイルスに対する創薬スクリーニング系の開発

上述のように、当初予期していなかった「コロナウイルスベクターの大量調製の失敗」は、新しい知財獲得に繋がりがつつある。ここで得られた新しいゲノムDNA調製のための方法論は、コロナウイルスゲノムの合成のためだけでなく、他の数万塩基対長のウイルスゲノムの合成にも優となる可能性を秘めている。すなわちこの知財は、

今後また起こるであろうウイルスパンデミックに備えるための重要な知財となる可能性がある。そのため当初の計画にはない項目ではあるが、このウイルスベクター大量調製のための方法の特許出願にむけた実験実施にも注力していく予定である。

この実験と並行して、合成したコロナウイルス人工ゲノムを実際にヒト細胞に導入し、コロナウイルスの感染プロセスが実際に誘発されるかどうかという、本来計画していた検証実験も進める。感染プロセスの一部でも誘発されるようであれば、そのプロセスを阻害する薬剤スクリーニングに活用するための研究開発も予定通り進める。

【参考文献】

1. Tomoyuki Ohno, Taichi Akase, Shunya Kono, Hikaru Kurasawa, Takuto Takashima, Shinya Kaneko and Yasunori Aizawa. *Nature. Communications.*, *In press.*

業 績

【口頭発表】

1. (招待講演) 相澤康則
ゲノム構築技術開発のロードマップ
JBA「発酵と代謝」研究会、2021年7月21日、
オンライン
2. (招待講演) 相澤康則
ヒトゲノム大規模改変プラットフォームの開発
第12回中分子創薬に関わる次世代産業研究会、2021
年8月27日、オンライン
3. (招待講演) 相澤康則
「アーキテクトゲノム」を活用した再生・細胞医療破
壊的イノベーション！
BioJapan 2021、2021年10月13日、パシフィコ横浜
4. 相澤康則、大野知幸、倉澤光
ヒト染色体上でのレトロエレメント欠損解析
日本人類遺伝学会第66回大会、2021年10月16日、
パシフィコ横浜
5. 相澤康則、大野知幸、倉澤光
ヒト細胞ゲノム大規模改変技術の開発とその応用
第73回日本生物工学会大会、2021年10月26日、オ
ンライン
6. Yasunori Aizawa
Pilot Project Update 2021
GP-write 5.0、2021年10月21日、On-line
7. 倉澤光、石津由紀、駒崎里奈、宇野愛海、富塚一磨、
鈴木輝彦、大亀祐介、高田修汰、相澤康則
染色体工学技術応用(21):細胞増殖に必須なゲノム
領域の定量探索法とそのヒトiPS細胞への応用
第44回日本分子生物学会、2021年12月3日、
パシフィコ横浜