

「次世代合成生物基盤」プロジェクト

プロジェクトリーダー 相澤 康則

【基本構想】

本プロジェクトでは、独自の iPS 細胞ゲノム構築技術群を活用することにより、創薬分野での革新的イノベーションを生み出すプラットフォーム技術を開発しつつ、それら技術をさらに活用して創薬研究の基盤となる iPS 細胞リソースを開発しています。具体的なテーマとしては、神経変性疾患を模した疾患モデル iPS 細胞の開発とその医学的活用を進める一方で、さらに、多くの現代人の健康寿命を脅かしている疾患であるガンに対する創薬研究技術基盤の構築を推進しています。後者では、がん患部組織にて高頻度で見つかる数百種類の変異遺伝子変異を人工的に発現することができる iPS 細胞株のコレクションを開発しています。またこの膨大な iPS 細胞株コレクションに対する細胞機能解析をハイスループット評価できる自動化システムも導入しました。これら創薬研究基盤となるハード（細胞評価自動化システム）とソフト（iPS 細胞ライブラリー、変異と細胞表現形の対応ビクデータ）の技術リソースを有機的に活用することで、「遺伝子変異ががん化を引き起こすメカニズム」をより深く理解できるようになると期待されます。さらに 2024 年度は、この iPS 細胞ライブラリーを活用し、川崎殿町にある国立医薬品食品衛生研究所との連携を開始しました。再生医療で安全に使える iPS 細胞の品質を評価するための研究を共同で推し進めています。以上のように、研究リソースを最大限活用し、がん治療や再生医療の基盤となり得る国内外の研究機関や企業との連携を拡げ、神奈川県における創薬研究開発支援の拠点形成に資することを目指しています。

1. 2024 年度の研究目的

2024 年度は、5つの項目について以下のように目標を設定して研究を実施した。

（１）がんモデル iPS 細胞ライブラリーの構築

がんは遺伝子の病気だと言われている。摘出された癌組織のゲノムを解析すると、1つの遺伝子ではなく、複数遺伝子での変異（塩基配列が変わってしまった部位）が認められる。変異の蓄積によってガン化が進行するというモデルは30年以上も前から提唱され現在定着している。臨床の現場では、抗がん剤の投与によって一時的に腫瘍が小さくなくても、抗がん剤の効果を回避するような新たな変異をもつ細胞集団が増え、腫瘍が再拡大してしまうケースが多い。本研究では、このような複数変異の相乗効果や、変異が蓄積されていくメカニズムをより深く理解するための研究基盤を開発している。

その研究基盤の一つとして、がん臓器でよく見られる遺伝子変異を人工的に発現誘導できるヒト iPS 細胞を作製している。米国 NIH 主導の研究によって明らかになっている「ガンで高頻度変異を受けている上位 30 種類のヒト遺伝子」の上で、実際にがん臓器で発生している変異をもつ遺伝子を合成したのち、それら変異遺伝子をヒト iPS 細胞株内で人工的に発現誘導できる実験系の開発を進めている。このような変異遺伝子の合成や遺伝子発現誘導系の開発は、これまで当グループが培ってきたヒトゲノム構築技術を活用している。

（２）がん抑制遺伝子 TP53 の変異体を発現誘導する iPS 細胞の開発とその再生医療への活用

前項で開発しているがんモデル iPS 細胞は、がん発症やがん進行の理解に資するだけではなく、再生細胞医療の実現においても有用である。2024 年度は、国立医薬品食品衛生研究所の再生・細胞医療製品部との共同研究を開始した。ここでは、再生医療の現場で使える iPS 細胞かどうかを判断するためのゲノム品質評価法や評価基準を作ることを目的とし、我々の変異遺伝子発現誘導系を活用することとなった。将来的には、iPS 細胞で自然発生する遺伝子変異のなかで、iPS 細胞の腫瘍化を誘発しやすい変異と、腫瘍化しにくい変異を見極める実験を進めていく計画である。2024 年度はその第一歩として、がん化を誘発することが知られている TP53 遺伝子の野生型と変異体をそれぞれ人工的に発現誘導できる iPS 細胞株の開発を進めた。

（３）ヒト iPS 細胞におけるアリル特異的ゲノム改変技術の完成

本研究課題では、ヒト iPS 細胞でのゲノム改変技術をさらに向上させ、様々な疾患での遺伝子変異を模倣する iPS 細胞を作成できることを目指している。2024 年度は、1細胞あたり2コピー（アリル）存在する遺伝子のうち、一方のアリルにだけ変異を効率よく導入する技術の完成を目指した。父由来のアリルと母由来のアリルの

いずれかのみで変異は入ることで発病する疾患（顕性疾患）が多いので、一方のアリルにだけ変異を効率よく導入できる技術の汎用性は高い。我々は、1アリル変異だけで発病することが知られている神経変性疾患ハンチントン病のモデル iPS 細胞の作成を通して、本技術開発を進めてきた。2024 年度はこの技術の完成と、その論文発表を目標とした。

（４）アリル特異的 iPS 細胞ゲノム改変技術を活用した神経性疾患 X のモデル細胞作成

前項で完成したゲノム改変技術を活用し、新たに 2024 年度はハンチントン病と別の脳神経系疾患のモデル細胞の作成を目指した。

（５）長鎖 DNA 合成スキームの高速自動化

2023 年度から本グループは、JST/GteX（革新的 GX 技術創出事業）のバイオものづくりグループに参画し、長鎖 DNA を効率よく作成するための研究拠点（ゲノム構築拠点；図 1）の発足や発展に寄与するための技術開発をしている。本拠点にてすでに試運転を始めているゲノム構築スキームをさらに高速自動化するために、本グループは 2024 年度、スキームの律速段階の一つである DNA 精製ステップのプロトコルを再設計することとした。



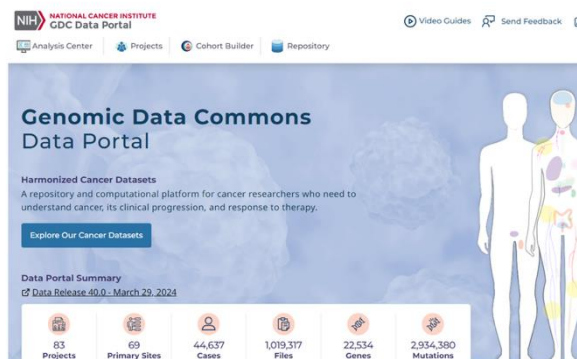
図 1 JST/GteX ゲノム構築拠点。東京科学大学すずかけ台キャンパスに設置。バイオ技術によってカーボンニュートラルに貢献するべく、微生物や植物のゲノム構築をするための長鎖 DNA 合成をハイスループットに実施可能とするための技術開発とその運用を進めている。

（６）長鎖 DNA の細胞導入技術の確立

「ゲノム構築による感染症対策技術の開発研究」のなかで、ウイルスなどの長鎖 DNA を異なる細胞間で効率よく移動させる技術開発をこれまで進めてきたが、2024 年度はその完成を目指した。

2. 2024 年度の研究成果

当初の計画よりも時間がかかったが、この過程では新しい課題を見出すことで、より良いゲノム構築技術や遺伝子発現細胞を開発できた。研究成果の詳細は、倉澤氏や赤瀬氏からの報告に譲り、ここではその特筆すべき内容だけを述べる。



原がん遺伝子	作製したガン遺伝子数/目標数
<i>PIK3CA</i>	83/83
<i>KRAS</i>	36/36
<i>FBXW7</i>	36/36
<i>NRAS</i>	21/21
<i>HRAS</i>	14/14
<i>IDH1</i>	6/6
<i>NFE2L2</i>	22/22
<i>BRAF</i>	24/24
<i>ERBB2</i>	14/14
<i>AKT1</i>	4/4
<i>PIK3R1</i>	30/30
計290/290(作成完了)	

図 2 がんモデル iPS 細胞で発現誘導するがん遺伝子。米国国立がんセンター（NCI）が公開している癌臓器における遺伝子変異のデータベース（Genomic Data Commons Data Portal；上）から、最も癌誘発能の高い原がん遺伝子（11 種）の全変異データを取得し、それら遺伝子にて高頻度で報告されている全変異（290 種類）をリスト化した（下）。これら変異をもっている原ガン遺伝子（すなわちガン遺伝子）をコードする DNA 断片を、290 種類全て本年度合成し、これらを iPS 細胞のゲノムに組み込んだ iPS 細胞株を樹立している。

（１）がんモデル iPS 細胞ライブラリーの構築

2023 年度に動作確認できた「薬剤による発現誘導型プロモーター」を用い、図 2 にある 290 種類のがん遺伝子を安定に発現誘導させるためのプラズミドは全て完成した。

これらプラズミドは iPS 細胞に導入後、我々が定めたゲノム領域に組み込まれ、かつ薬剤を培地に添加した場合に限り安定に発現できるような構造になっている。これによりプラズミドが細胞にトランスフェクションされた直後から発現することがないため、薬剤添加までの間、iPS 細胞の表現形に不必要な影響を及ぼさない、という大きなメリットがある。このような工夫を施した遺伝子発現系のもと、290 種類ものがん遺伝子の影響を調べられる細胞実験系は前例がない。2025 年度はこの優位性を活かし、すでに導入されている自動細胞解析システムも用いて、癌遺伝子の機能解析を体系的に進めていく。この機能解析のために 2024 年度は、iPS 細胞を様々な組織細胞に分化させるための分化誘導プロトコルの導入も完了している。

（２）がん抑制遺伝子 TP53 の変異体を発現誘導する iPS

細胞の開発とその再生医療への活用

がん臓器において最も変異頻度が高い遺伝子が *TP53* である。2024 年度は、*TP53* にて高頻度で発生している上位 20 種類の点変異体を、(1) で述べた薬剤誘導発現系によって iPS 細胞内で誘導発現させるためのプラズミドを作成した。また、そのうち高頻発する上位 5 つの変異体プラズミドをゲノムに導入した iPS 細胞株も 5 種類樹立した。*TP53* のプラズミドは、変異体ごとに異なる配列を持つ DNA バーコードを載せてある。このため、複数の異なる *TP53* 変異体を発現する iPS 細胞を混合しても、それぞれの変異体の細胞増殖スピードを定量 PCR によってモニターできるようになっている。

今回作製した 5 種類の *TP53* 変異体と、野生型 *TP53* をそれぞれ発現する iPS 細胞を混ぜたのち、薬剤で発現誘導し、各細胞の数を経時的に定量したところ、期待通りの細胞増殖の結果が得られた。このことから、本 DNA バーコードによる細胞数モニターの実験系も実用可能であることが実証された。これにより、多種類の細胞の解析を、1 つの培養容器内で実施できることとなった。2025 年度以降の細胞解析がさらに効率的に実施可能となったといえる。

上述のように、これら *TP53* 誘導発現 iPS 細胞コレクションは再生医療における細胞品質評価法の確立において有用であることから、2025 年度はこれら細胞を国立医薬品食品衛生研究所の再生・細胞医療製品部に提供し、細胞評価に供する計画である。

(3) ヒト iPS 細胞におけるアレル特異的ゲノム改変技術の完成

2022 年に発表したヒト両アレル改変技術 UKiS (*Nature Comm.*, 13(1), 4219, 2022) を改良し、それぞれのアレルに異なる変異を導入する技術 asUKiS を確立させた (*Genes Genet Syst* 100, 25-00016, 2025)。asUKiS 確立までの技術開発では、一方のアレルのみ変異が起ることによって発症する神経性疾患ハンチントン病 (HD) のモデル iPS 細胞を作製した。現在この HD モデル細胞は共同研究先で解析中であるため、その結果の詳細は伏せるが、これまでの長い HD 研究で明らかになっている細胞表現型が本 HD モデル細胞でも確認されている。また本細胞を用いた新薬開発も進んでおり、本細胞の有用性が示されつつある。

一方、本グループでも、HD モデル細胞の解析は別途進めている。2025 年度内での論文発表を目指している。

(4) アレル特異的 iPS 細胞ゲノム改変技術を活用した神経性疾患 X のモデル細胞作成

前項の HD モデル細胞の有用性が示されたことから、別の脳神経性疾患のモデル iPS 細胞の開発の打診があったため、同細胞の開発も 2024 年度に開始した。「基本構想」でも述べたように、本事業は「神奈川県に創薬研究開発支援の拠点を形成すること」を目指しているが、本研究テーマは、このミッション実現に資するかたちで、

順調に発展しているといえるだろう。

(5) 長鎖 DNA 合成スキームの高速自動化

JST/GteX バイオものづくり事業で発足したゲノム構築拠点での長鎖 DNA 合成スキームのなかで、「PCR 産物の精製」および「プラズミド精製」の 2 ステップが、従来の手動での作業のままであったため、全スキームの中で律速段階となっていた。2024 年度は、これらステップを半自動化するプロトコルを確立した。詳細は赤瀬氏からの報告に譲るが、作業時間がほぼ半分になり、かつ扱えるサンプル数も飛躍的に増えたことは大きな進歩である。本グループのゲノム構築力は、GteX 事業にも貢献している。

(6) 長鎖 DNA の細胞導入技術の確立

50kb を超える長鎖 DNA は物理的に弱く、それを含む溶液を混ぜるという作業だけでも切断してしまう。そのため例えば、微生物 A 内で連結させた長鎖 DNA を別の微生物 B に移して、さらなる DNA 改変を施すといった作業において、微生物 A から長鎖 DNA を一度精製して微生物 B に導入するという従来法ではなく、微生物 A から微生物 B へ直接 DNA を移動させる方法が求められていた。この方法は、本事業の 3 テーマの 1 つ、「ゲノム構築による感染症対策技術の開発研究」において長鎖ウイルスゲノムを合成するための技術開発としてこれまで続けてきたが、2024 年度になり、枯草菌から大腸菌や酵母へ、精製を介さずに長鎖 DNA を移動させる技術を確認することができた。ここではデータの一例のみを示すが、長鎖 DNA をもつ枯草菌の溶解液 (Lysate) と、大腸菌の量比を調節することで、効率よく長鎖 DNA を持つ大腸菌のコロニーを数多く得ることなどできるようになった (図 3)。この成果は現在、論文掲載予定である (*J Mol Biol*, 2025)。

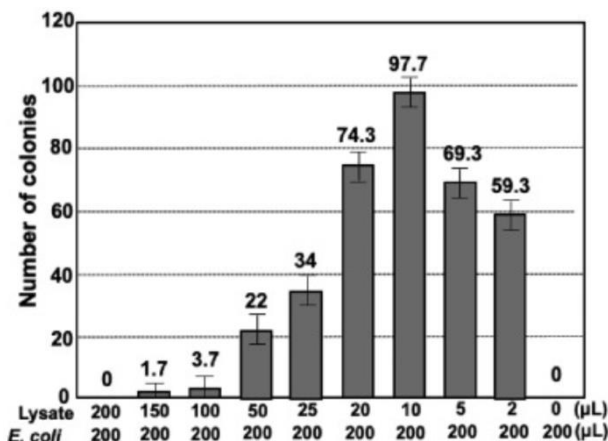


図 3 長鎖 DNA を保持する枯草菌の溶解液をつかった大腸菌形質転換実験。枯草菌溶解液 10μL と大腸菌懸濁液 200 μL を用いた場合で、長鎖 DNA を受け取った大腸菌の数が最大数となった。

ヒト iPS 細胞におけるアレル選択的ゲノム改変技術の開発

「次世代合成生物基盤」プロジェクト

倉澤 光

1. はじめに

本プロジェクトは、「神奈川県に創薬研究のための技術基盤を構築すること」を中核的なミッションとして掲げ、ゲノム改変技術の高度化に取り組んでいる。我々は戦略的研究シーズ育成事業から「ヒト iPS 細胞におけるアレル選択的ゲノム改変技術」の開発を進めてきた。ヒト iPS 細胞は、種々の細胞種へと分化可能な多能性幹細胞であり、疾患モデルの構築や創薬スクリーニングにおいて有用なプラットフォームである。我々のゲノム改変技術と組み合わせることで、ヒト iPS 細胞に自在に変異を導入し、病態が顕著に現れる細胞種へと分化させることで、発症に至る分子経路を明らかにできる。このプロセスを標的とした治療法の開発や、病態の進行を緩和する創薬への展開が期待される。

なかでも、一方のアレル（対立遺伝子）を選択的に改変できる技術は、遺伝性疾患のモデル化や治療標的の探索において極めて重要である。多くの遺伝性疾患では、一方のアレルのみに変異があるからである。しかしそれを既存のゲノム編集技術で再現しようとすると、両方のアレルが同時に改変されやすく、片アレルのみを改変した細胞を得るのが難しい。したがって、ヘテロ接合性の先天性遺伝疾患において、より精密な疾患モデル細胞を構築するにはアレル選択的ゲノム改変技術が必要である。本研究期間では、この課題を解決するべく、ハンチントン病（Huntington's Disease, HD）をモデルケースとし、この顕性疾患を再現するようなモデル iPS 細胞の創出を試みた。

HD は、第 4 染色体短腕上に位置するハンチンチン遺伝子（*HTT*）内の CAG 繰り返し配列が異常に伸長することによって発症する、常染色体優性遺伝形式の神経変性疾患である。健常者における CAG リピート数は通常 6-30 程度に収まっているが、40 以上になると発症リスクが生じ、リピート数が増加するほど若年での発症リスクが高まるというリピート数依存的な発症スペクトラムを示す。この CAG の伸長は、HTT タンパク質中のポリグルタミン

（polyQ）配列を異常に長大化させ、この変異 HTT タンパク質が毒性を獲得することで、主に線条体における神経細胞死を引き起こし、運動障害などの症状を呈する。HD 患者の大多数は、正常リピート数を有する健常アレルと、異常に伸長した変異アレルのヘテロ接合状態にある。したがって、HD モデル細胞を構築する際には、片方のアレルのみに CAG 伸長を導入できるようなアレル選択的ゲノム改変技術が求められている。

そこで我々は、この課題を解決するべく、既報の

「Universal Knock-in System (UKiS 法)」¹をもとにした改良型スキームを構築した。本技術により、モデル細胞創出の高精度化が期待される。

2. 実験と結果

2-1. 三段階ゲノム改変スキームの開発

既報の UKiS 法¹では目的のゲノム領域の両アレルを 1 種類の蛍光タンパク質マーカーで置換し、それらをドナー DNA と置換することでゲノム改変を達成していた。この方法では、1 種類の蛍光タンパク質マーカーしか用いていないため、導入したドナー DNA がどちらのアレルに導入されるかは確率に依存していた。つまり、特定のアレルに変異を導入するという方法はなかった。その解決策として、今回我々は「allele-specific UKiS, asUKiS」という三段階の置換を主軸としたスキームをデザインした（図 1）。本スキームでは GFP と RFP の 2 種類の蛍光タンパク質マーカーを用いている。GFP マーカーと RFP マーカーの置換を別々のアレルで実施することで、狙ったアレルに異なる変異を導入することが可能となる。

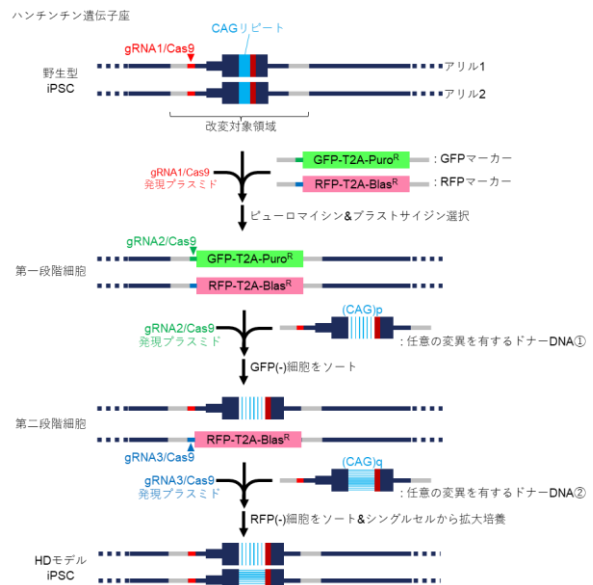


図 1 asUKiS 法の概要。野生型細胞が有する 2 つの対立遺伝子（アレル）を、それぞれ GFP マーカーと RFP マーカーで置換する。その後、GFP マーカーのみを任意のドナー DNA ①で置換し、続いて RFP マーカーのみを任意のドナー DNA ②で置換することで、どちらのアレルにどのような変異を導入するかを制御することができる。文献²より一部改変。

2.2 HD モデル細胞の取得

図1のスキームに従い、種々のリピート長を有するHDモデル細胞株のセットを作製した。asUKiSの第一段階では、GFP マーカーと RFP マーカーをそれぞれ、*HTT* 遺伝子の CAG リピートを含む両アレルと置換した iPS 細胞を創出した。並行して、10Q、55Q、99Q の CAG リピートを有するドナーDNAを用意し、第一段階細胞に対して図2に示しているような流れで二段階目および三段階目の置換を実施することで、以下の5系統のモデル iPS 細胞株群を樹立した。

- ・ 健康モデル (10Q/10Q) : どちらも健康者の範囲内のリピート数を持つ iPS 細胞
- ・ 成人発症型モデル (55Q/10Q) : 片方のアレルに、成人～壮年期に発症するリスクをもたらす 55Q をもつ iPS 細胞
- ・ 成人発症型モデル (ホモ) (55Q/55Q) : 両方のアレルに、55Q をもつ iPS 細胞
- ・ 若年発症型モデル (99Q/10Q) : 片方のアレルに、若年期に発症するリスクをもたらす 99Q をもつ iPS 細胞
- ・ 若年発症型モデル (ホモ) (99Q/99Q) : 両方のアレルに 99Q をもつ iPS 細胞

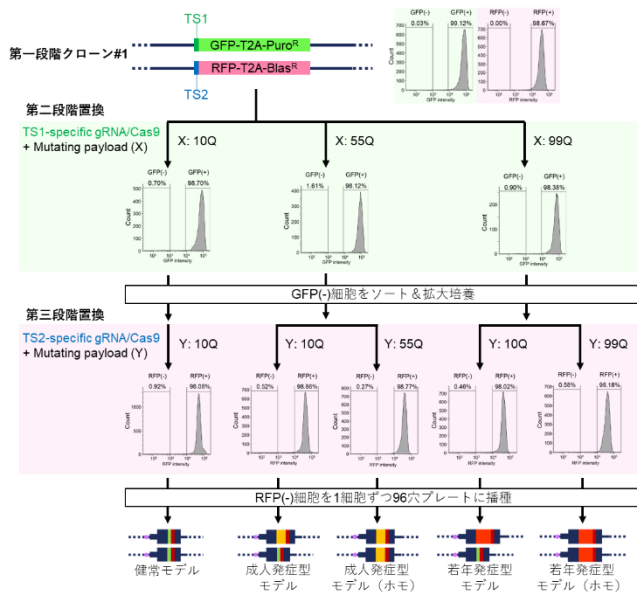


図2 asUKiS による HHT 遺伝子座に対する第二および第三段階置換のスキームとその結果。第一段階細胞が有する GFP マーカーを、それぞれ 10Q、55Q、99Q のリピート数を有するドナーDNAで置換した。置換が起きた細胞では GFP マーカーが消失する (=GFP シグナルが消失する) ため、GFP 陰性の細胞を蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) により取得した。続いて、RFP マーカーについても同様に、それぞれ 10Q、55Q、99Q リピート数を有するドナーDNAで置換し、RFP 陰性の細胞を FACS により取得・クローン化した。文献²より一部改変。

一般的な HD 患者は、55Q/10Q あるいは 99Q/10Q に相当するヘテロ接合型である。しかし極めて稀ではあるものの、両アレルに CAG リピート伸長を伴うホモ接合型の症例も報告されている。そこで本研究では、各ヘテロ接合型モデルに対するカウンターパートとして、対応するホモ接合型のモデル細胞株もあわせて創出している。

また HD は上述のように、CAG リピート数に応じて連続的に病態が変化する疾患であり、ホモ接合型モデルはより重篤な病態を再現するものと期待される。そこで本研究では CAG リピート数と発症リスク・重症度の関係を評価できるようにするため、各 CAG リピート数に対してヘテロ接合型およびホモ接合型の細胞株を系統的に創出した。この細胞群を比較することで、軽度から重度に至るまでの病態をある程度細胞レベルで解析できるようなモデル系が確立したと考えられる。

3. 総括

本研究では、既報の UKiS 法を改良し、アレルごとの改変を制御できる asUKiS 法を開発した。このスキームを用いることで、ヒト iPS 細胞に CAG リピートを導入し HD モデル細胞を創出することができた。55Q および 99Q の CAG リピート配列を、対立遺伝子ごとに導入することで、55Q/10Q および 99Q/10Q といったヘテロ接合型モデルのほか、稀ながら報告されている 55Q/55Q および 99Q/99Q といったホモ接合型モデルも構築することができた。これらの細胞株は、今後の表現型解析や薬剤スクリーニングに応用できる細胞リソースとなることが期待される。

【参考文献】

1. Ohno, T., et al., *Nat. Commun.*, 13, 4219(2022)
2. Kurasawa, H., et al., *Genes Genet. Syst.*, 100, 25-00016(2025)

がんモデル iPS 細胞ライブラリの構築

「次世代合成生物基盤」プロジェクト

倉澤 光

1. はじめに

がんは、細胞のゲノムに蓄積される変異に起因する疾患である。健常な体細胞ががん化に至るまでには、通常、長い年月をかけて複数の変異を段階的に獲得する。その結果として、異常な増殖性、薬剤耐性、部分的な未分化性、浸潤・転移能力といった「がん特有のふるまい（表現型）」が形成される。この表現型は、がん組織がどのような変異を獲得してきたかによって大きく異なる。例えば、「大腸がん」と分類されるような同じ原発臓器由来のがんであっても、がん化を駆動する主要な変異（ドライバー遺伝子）が異なれば、がん細胞が示す表現型は変化する。複数の患者でまったく同じ変異セットを持つがんは確率的には存在せず、このユニーク性、すなわち腫瘍ごとの個別性こそが、がん治療の難しさを際立たせている。「2人に1人ががんになる時代」と言われるように、がんはもはや他人事ではない。私自身にとっても、家族や友人を含め、身近な脅威として実感している。だからこそ、がんの発症と進行を支える分子機構の解明は、単なる学術的興味だけではなく、喫緊の課題だと感じている。

近年、次世代シーケンサーの進展により、数万例規模のがんゲノム解析が行われるようになり、The Cancer Genome Atlas (TCGA) などの国際コンソーシアムの下で、腫瘍組織の変異プロファイルが膨大なデータ数蓄積されてきた。その結果、「大腸がんで高頻度に観察される変異」や「よく共存する変異ペア」などが、網羅的かつ包括的に整理されつつある。

しかしその一方で、情報量が膨大であるがゆえに、解釈の難しさも顕在化している。ゲノム解析で得られるのは、特定時点における変異の静的なスナップショットに過ぎず、それも腫瘍細胞が長期にわたる進化や淘汰の過程を経て生き残った「結果」を反映している。そのため、「がん化初期はどのようなドライバー遺伝子が寄与したのか」「がん進行の過程でどのような選択圧を受けたか」「途中過程の変異が細胞にどのような影響を与えたか」、さらには「今後どのような変異を受けやすく、どのような表現型を獲得し得るか」といった動的な情報を予測することはできない。細胞の進化過程を読み解き、予測しながら、各患者にオーダーメイドの治療方針を立てるという次世代がん治療には、変異情報の蓄積だけでは不十分であり、がん進行に伴って変異がもたらす細胞への影響を調べる実験的アプローチとの統合が求められる。

我々は、これまでに培ってきたゲノム改変技術を活用

し、健常者由来の人工多能性幹細胞（iPS 細胞）をプラットフォームとした、ドライバー遺伝子の機能評価系を構築した。がん組織で頻発しているドライバー遺伝子を、1つずつ、2つずつ…と段階的に導入し、それにより生じる細胞表現型を体系的に解析することができる評価系である。同一の iPS 細胞株を用いるため、遺伝的背景の差異を排除することができ、変異単独の影響および複数変異間の相互作用を精緻に評価することが可能となる。以下に、2024 年度実施の研究開発のうち、公開可能なものを報告する。

2. 実験と結果

2-1. ドライバー遺伝子の選定とライブラリ構築

先行研究¹で報告された 299 種類のがんドライバー遺伝子の中から、特に複数のがん種で高頻度に変異が報告されている 11 種類の原がん遺伝子を選定した。TCGA がんゲノムデータベースを基に、それぞれの遺伝子で頻発しているアミノ酸変異を解析し、全 290 種類のドライバー遺伝子ライブラリの構築を行った（相澤の項・図 1 参照）。本ライブラリは、有望シーズ展開事業の 2 年間にわたる活動の中で設計・構築が完了しており、すべてのドライバー遺伝子が利用可能な状態にある。

2-2. 薬剤誘導式 Landing pad 細胞株の作製

2-1 で作製したドライバー遺伝子を任意のタイミングで発現誘導できる薬剤応答型の発現システムを整備した。具体的には、Clontech 社の Tet-On システム²を利用し、ドキシサイクリン（Dox）添加によりドライバー遺伝子の発現が誘導されるようなゲノム改変スキームを実装した（図 1）。

まず、iPS 細胞の特定の遺伝子座に対して、「Landing pad（LP）」をノックインした。この Landing pad は強力なプロモーターとポリ A 付加配列（pA）の間に、インテグラーゼが認識する配列を持つ（橙色）。この Landing pad を iPS 細胞にあらかじめゲノムに導入したのち、このその iPS 細胞にドライバー遺伝子を搭載した「Dox 誘導式プラスミド」を環状 DNA として導入し、インテグラーゼを介して LP への配列特異的な組換えを行い、プラスミドを挿入する。結果として、LP に組み込まれた DNA 配列から、Dox に応答して転写活性を獲得する転写因子

（Dox 応答転写因子）が強力なプロモーターの下で発現する。実験者の任意のタイミングで培地に Dox を添加することで、Dox 応答転写因子と複合体を形成し、Dox 応答プロモーター（Dox_p）での転写を活性化するので、ドラ

イパー遺伝子が発現するという構成になっている。このスキームにより、同一の iPS 細胞株上で、多数の変異の影響を、発現タイミングを制御しながら比較評価できる実験基盤が整備された。

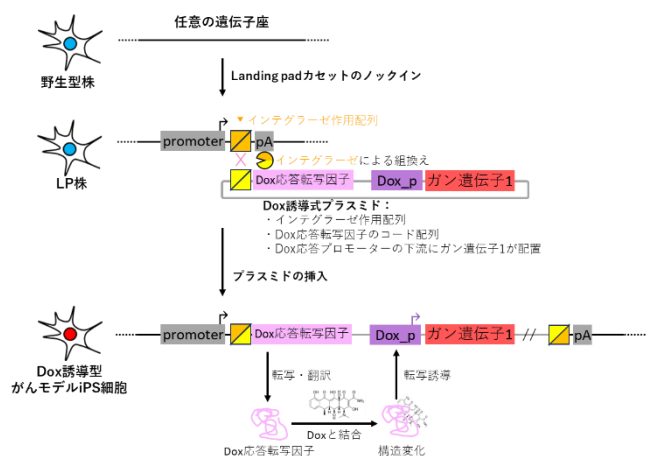


図1 Dox 誘導型ドライバー遺伝子発現システムの作製工程。第1ステップで、導入遺伝子が安定に発現するゲノム領域に対して、プロモーターとポリA付加配列に挟まれたインテグラーゼ作用配列を組み込む。第2ステップで、起こる別のインテグラーゼ作用配列を搭載したDox 誘導型がん遺伝子プラスミドを細胞内導入することで、インテグラーゼ作用配列間で組換えが起き、Dox 誘導型がん遺伝子がゲノムに組み込まれる。第1ステップまで終わったiPS細胞があれば、異なるがん遺伝子プラスミドを細胞導入することで、異なるがん遺伝子発現iPS細胞株を作ることができる。

2-3. TP53 遺伝子薬剤誘導式 Landing pad 細胞株の作製

TP53 遺伝子は「がん抑制遺伝子」として広く知られており、細胞の増殖・停止・死を適切にコントロールする中心的な役割を担っている。多くのがん組織においてTP53にはさまざまな変異が見られ、全がん症例の約半数でその機能が失われているとされる。そこでがん臓器で最も高頻度で発見されている上位20種類のTP53変異体をNIHのデータベース（相澤の項で紹介；Genomic Data Commons Data Portal）を解析し、TP53に変異を有する症例を抽出した。その中でも頻度が高いミスセンス変異およびナンセンス変異20種を選定した（表1）。

近年、TP53変異の多くを占めるミスセンス変異は、単なる機能喪失（loss-of-function, LOF）、つまり「ブレーキの破損」のみならず、がん化を積極的に促進するように寄与するアクセルのような別の機能を獲得する（機能獲得；gain-of-function, GOF）側面もあることが示唆されている。実際、今回選ばれたがんにおける高頻度変異上位20には、LOFではなくGOFを誘発することが予想される変異体が含まれている。

次に、これらの20種類の変異をもつTP53遺伝子のコード配列DNAを合成し、上述の誘導型ドライバー遺伝子発現システム（図1）で解析できるよう「Dox 誘導型プラスミド」として構築した。そして、各TP53変異体を薬剤により発現誘導できるiPS細胞株セットを構築している。これにより、同一遺伝的背景下で20種類の変異がも

たらす影響を調査できる基盤が完成した。

#	Genomic pos	DNA change	AA change	Consequence
1	chr17:7675088	C>T	R175H	Missense
2	chr17:7674220	C>T	R248Q	Missense
3	chr17:7673803	G>A	R273C	Missense
4	chr17:7673802	C>T	R273H	Missense
5	chr17:7674221	G>A	R248W	Missense
6	chr17:7673776	G>A	R282W	Missense
7	chr17:7674894	G>A	R213*	Stop Gained
8	chr17:7674872	T>C	Y220C	Missense
9	chr17:7674945	G>A	R196*	Stop Gained
10	chr17:7674230	C>T	G245S	Missense
11	chr17:7675076	T>C	H179R	Missense
12	chr17:7670685	G>A	R342*	Stop Gained
13	chr17:7673704	G>A	R306*	Stop Gained
14	chr17:7674953	T>C	H193R	Missense
15	chr17:7675143	C>A	V157F	Missense
16	chr17:7675124	T>C	Y163C	Missense
17	chr17:7674947	A>G	I195T	Missense
18	chr17:7673802	C>A	R273L	Missense
19	chr17:7674957	G>A	Q192*	Stop Gained
20	chr17:7674216	C>A	R249S	Missense

表1 本研究にてDox 誘導型ドライバー遺伝子発現システムで発現できるTP53変異体。米国国立がんセンター（NCI）が公開している癌臓器における遺伝子変異のデータベース（Genomic Data Commons Data Portal；上）を解析し、TP53遺伝子にて高頻度で報告されている上位20種類の変異を抽出した。

3. 今後の予定

2-1項および2-2項により、本研究の目的である「変異単独の影響および複数変異間の相互作用を精緻に評価する」ための実験プラットフォームが整備された。今後は以下のアッセイを実施し、各ドライバー遺伝子のがん化、悪性化における役割を解析する予定である。これらの実験により、がんにおける変異の機能的意義を体系的に明らかにし、精密医療の基盤構築に貢献することを目指す：

・増殖速度の測定

がん細胞の主要な特徴のひとつに、増殖速度がある。各ドライバー遺伝子が増殖速度に影響を及ぼすかを評価する。

・薬剤耐性試験

臨床で使用されている抗がん剤や、治験・開発段階にある候補薬剤を用い、各変異が薬剤抵抗性に与える影響を評価する。

・足場非依存性試験（軟寒天コロニー形成アッセイ）

血液系細胞を除く通常の体細胞は、生存と増殖に足場を必要とする。この「足場依存性」が失われることは、転移能の獲得に関与するとされる。軟寒天上で生育させる試験によって、各変異が足場非依存的な増殖を誘導するかを評価する。

・分化抵抗性/指向性試験

がん細胞では、原発臓器本来の細胞の分化状態が部分的に失われていることが多い。本研究では、iPS細胞の三胚葉分化能を活用し、ドライバー遺伝子の発現による分化抑制や特定系列への分化偏りの有無を解析する。

TP53変異はがん患者の約半数で認められることから、変異別の機能プロファイルを一度整備すれば、複数のが

ん種にまたがって多数の患者に広く還元できるものとなるだろう。本研究で得られたデータセットが、個々の患者に適用する治療戦略の個別化 (precision medicine) に貢献できると期待される。

【参考文献】

1. Cancer Genome Atlas Research Network, *Nat. Genet.*, 45, 1113-1120 (2013)
2. Gossen, M. & Bujard, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89, 5547-5551 (1992)

長鎖 DNA 合成スキームの高速自動化

「次世代合成生物基盤」プロジェクト
赤瀬 太地

1. はじめに

近年、長鎖 DNA 合成の需要が急速に高まっている。本プロジェクトにおいても、がんドライバー遺伝子を人工的に発現誘導する iPS 細胞を作製したり、ウイルスゲノムを人工合成したりする際には、長鎖 DNA の合成が必須である。

長鎖 DNA の合成でも、一般的な遺伝子クローニング操作を活用する（図 1）。最初はゲノム DNA または cDNA を鋳型として PCR を実施するか、あるいは 1 本鎖 DNA を複数混ぜて PCA (Polymerase cycling assembly) を行うことで、目的とする比較的短い DNA フラグメントをまずは得る。次に、それらの DNA フラグメントを断片化したプラスミドと連結し、増幅させるために大腸菌を形質転換する。そして大腸菌から回収されたプラスミドは配列解析に供し、設計通りの塩基配列をもつ DNA 断片が完成しているかどうかを確認する。必要に応じてこの一連の操作を繰り返すことで、最終的に目的とする長鎖 DNA を得る。

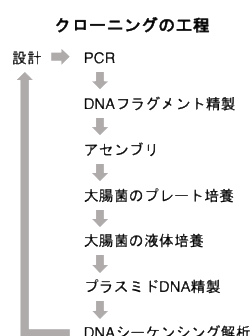


図 1. 一般的な遺伝子クローニングの工程。長鎖 DNA 合成においても同様の工程を活用する。本項目では、この工程の中でボトルネックになっている DNA フラグメント精製を高速自動化した。

本プロジェクトが参画している JST/GteX バイオものづくり事業において東京科学大学に発足したゲノム構築拠点では、長鎖 DNA 合成スキームのハイスループット (HP) 化が求められている。HP 化には改善すべきステップが複数存在するが、その中でも今回注目しているのが、PCR や PCA によって得られた DNA フラグメントを精製するステップである。

PCR や PCA が終わった溶液には、欲しい DNA フラグメント以外に、プライマーや鋳型 DNA が含まれているため、次の工程を考えるとそれらを除いておきたい。この精製は通常、PCR/PCA 後溶液をアガロースゲル電気泳動にかけ、目的長の DNA バンドを切出したのち、そのゲル片から DNA 精製キットによって目的 DNA フラグメントを溶出回収している。ここでの作業は全て 1 サンプルずつの手作業である

ため、スループットが低く、収量も実験者の手技に大きく依存している。

この課題に対する解決策として、本プロジェクトでは 2024 年度、DNA フラグメント精製工程を自動化するためにワークフロー全体を見直した。このために、東京科学大学すずかけ台キャンパス内で比較的自由に使える自動溶液ハンドリング装置 CyBio FeliX (Analytik Jena 社; 図 2) を活用することとした。本稿では、自動化による効果を手作業による従来法と比較し、その有効性について報告する。



図 2. DNA フラグメント精製ステップを自動効率化するために活用した CyBio FeliX (Analytik Jena 社) 96 サンプルを同時に取得分注できる移動式ヘッドが 1 つ搭載された装置。

2. ワークフローの構築

CyBio FeliX は、10~1000 μL の液体を任意に分注でき、プレート間での液体の移動が可能なりキッドハンドリングロボットである。また、グリッパーパーツを用いることで、マイクロプレート自体の搬送も自動で制御できるため、複雑な実験操作を再現性よく実行できる点が大きな利点である。

本ワークフローの構築にあたっては、従来の手作業プロトコルを CyBio FeliX の動作単位に分解し、プログラムとして再構成した。プレートの配置、高さ、座標の調整なども最適化し、安定した動作を確認した。

構築したワークフローを用い、96 サンプル分実施した場合の動作確認を行った結果、全体の処理時間は 60 分程度であり、これは手動での処理時間を大きく短縮するものであった（図 3）。特に、作業者が直接手を動かす「実働時間」は、手動では 100 分を要していたのに対し、自動化では約 15 分と、約 6 分の 1 に削減された。これは作業負担と再現性の両面で大きな改善である。

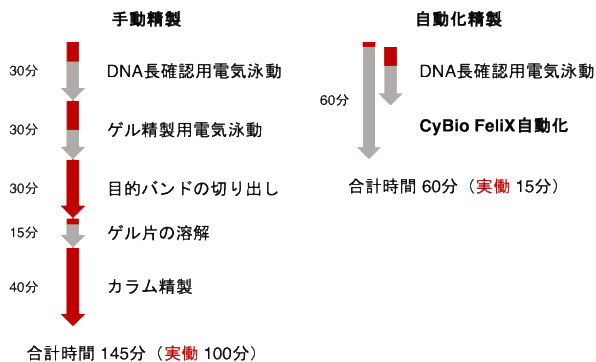


図3. 改良前後でのDNAフラグメント精製ワークフローの比較。改良により全体の時間が半減しただけでなく、実験者が関わるべき時間が1/6へと大幅に短縮された。

3. サンプルを使った実用性の確認

自動化ワークフローの実用性を検証するために、8種類のPCR後溶液に対してDNAフラグメント精製を行った。CyBio Felixによる自動ワークフローと、従来の手動ワークフローのそれぞれで同一の試料を精製し、結果を比較した。

回収されたDNAフラグメントの収量は、自動化ワークフローの方が8サンプル全てで高かった（図4）。手動ワークフローでは、ゲル片からの回収ステップでサンプルロスが起きていることが予想されているが、自動化の方ではゲル電気泳動を回避している分だけ収量が高くなったと考えられる。

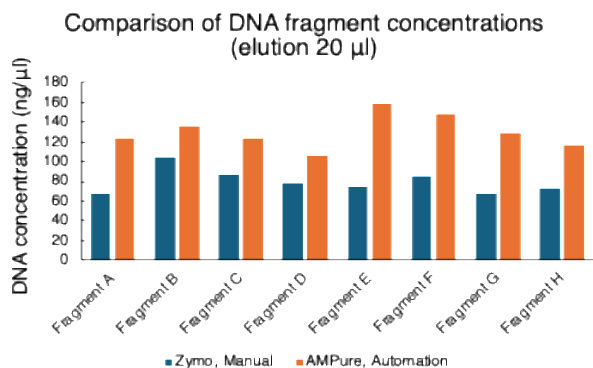


図4. 従来の手動プロトコール（Zymo）と、今回作成した自動化プロトコール（AMPure）によるDNAフラグメント精製後の収量の比較。自動化プロトコールの方が、8サンプル全てで収量が高かった。

次に、回収したDNAフラグメント溶液の精製度の評価として、Nanodropによる吸光度測定を実施した。260nmと280nmでの吸光度の比（タンパク質混入の指標）および260nmと230nmでの吸光度の比（塩類や有機溶媒の残留の指標）は、両ワークフローの間に大きな差は見られなかった（図5）。この結果から、今回初めて使用した磁気ビーズによるDNA精製には精製度合いで問題はないことが確認できた。

以上より、2024年度に再構築した自動化ワークフローが実用可能であることが確認できた。これはすでにGteXゲノム構築拠点にて活用を開始している。

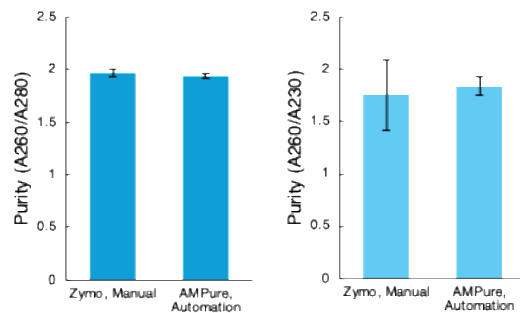


図5. 従来の手動プロトコール（Zymo）と、今回作成した自動化プロトコール（AMPure）によるDNAフラグメント精製後の性制度の比較。タンパク質の混入度合い（A260/A280；左）と塩類や有機溶媒の残量（A260/A230；右）は、両ワークフローで同程度であった。

4. 今後の展望

本研究により、DNAフラグメント精製工程の自動化が実現し、大きな作業効率の改善が達成されたが、長鎖DNA合成の全工程をさらに自動化や効率化する必要があり、そのためには解決すべき課題はまだ数多く残されている。

次に対処すべきことの一つは、PCR/PCAにおけるオフターゲット増幅への対策である。今回の自動化DNAフラグメント精製のワークフローでは、PCRやPCAで得られるDNAフラグメントは目的の1種類だけであることを前提としている。しかしPCRやPCAでは往々にして、期待しないDNAフラグメントが増幅されてくるため、今回のワークフローでは、目的とするDNAフラグメントと望まないDNAフラグメントが混在した溶液が得られることになる。一方、従来のマニュアルのワークフローでは、ゲル切出し精製を行うため、目的のバンドサイズを選別して回収できていた。25年度は、この非特異的な増幅が起こるケースを想定して、この後のワークフローを改変していく予定である。ここにも新しい工夫を導入しながら、全工程の自動効率化を進めていく。

業績

【原著論文】

(投稿掲載)

1. Masaya Egawa, Narumi Uno, Rina Komazaki, Yusaku Okano, Yuki Ishizu, Yusuke Ohkame, Hitomaru Miyamoto, Chihiro Yoshimatsu, Kyotaro Yamazaki, Teruhiko Suzuki, Kazuyoshi Hosomichi, Yasunori Aizawa, Yasuhiro Kazuki and Kazuma Tomizuka. Engineering a monosomy 21q human iPS cell line using CRISPR/Cas9 targeted interstitial megabase deletion. *Genes to Cells*, 30(1):e13184 (2025) [IF: 1.3]
2. Hikaru Kurasawa, Yuta Matsuura, Riho Yamane, Tomoyuki Ohno, Yasunori Aizawa, Biallelic genome engineering to create isogenic induced pluripotent stem cells modelling Huntington's disease. *Genes & Genetic Systems DOI: 10.1266/ggs.25-00016* (2025) [IF: 1.5]

(印刷中)

3. Shinya Kaneko, Hiromi Fukushima, Misako Nakahama, Kenji Tsuge, Jun Ishii, Yasunori Aizawa, Mitsuhiro Itaya, Akihiko Kondo. Versatile Methodology for Efficient Large-sized DNA Delivery between Microorganisms without in vitro purification. *Journal of Molecular Biology* 437(17):169289. [IF: 4.7]

(投稿中)

4. Shinya Kaneko, Misako Nakahama, Yasunori Aizawa. Gap Repair Cloning-Based Assembly of DNA Fragments Using *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology* [IF: 4.1]

【総説】

1. 橋本陽太、赤瀬太地、相澤康則 「ヒト uORF 由来タンパク質の細胞内安定性を決定する要因の探究」 GSJ コミュニケーションズ 遺伝学のパラダイムシフトを目指して (V)、2025 年

【書籍】

該当なし

【口頭発表】

1. 相澤康則 [招待講演]
ゲノム構築技術による細胞システムの理解と応用へ
研究所内招待講演、2024 年 4 月 16 日、協和キリン東
京リサーチパーク
2. 相澤康則 [招待講演]
Precision human genome engineering for exploring
noncoding functions and mutation synergy.

研究所内セミナー、2024 年 6 月 3 日、Axe Oncologie
(カナダ・ケベック)

3. 相澤康則 [招待講演]
ヒトゲノム構築の技術開発とその応用
第 3 回生物機能化学国際シンポジウム、2024 年 6 月
29 日、京都キャンパスプラザ
4. 相澤康則 [招待講演]
高校 1 年生の時に芽生えたバイオへの三つ子の魂 ～
ゲノム構築への道
大学講演セミナー、2024 年 7 月 18 日、八王子学園八
王子高校
5. 倉澤光、赤瀬太地、橋本陽太、大野知幸、山根里歩、
山崎翔太、鈴木貴久、金子真也、相澤康則 [ポスター
発表]
Large-Scale Genome Downsizing in Human Induced
Pluripotent Stem Cells.
2024 International Mammalian Synthetic Biology
Workshop、2024 年 8 月 6 日、Boston University (米
国、ボストン)
6. 相澤康則 [招待講演]
大規模ゲノム構築によるゲノム機能研究 (とその応用
展開)
第 122 回醗酵学談話会、2024 年 8 月 19 日、アサヒビ
ール株式会社吹田工場
7. 金子真也、相澤康則 [一般講演]
枯草菌を用いた Gap Repair Cloning 法
令和 6 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、2024 年 8 月
23 日、長野市若里市民文化ホール
8. 山崎翔太、相澤康則 [一般講演]
独立栄養条件下で高発現する水素酸化細菌遺伝子の機
能解析
日本遺伝学会第 96 回大会、2024 年 9 月 4 日、高知工
科大学
9. 橋本陽太、赤瀬太地、相澤康則 [一般講演]
ヒト uORF 由来タンパク質の細胞内安定性を決定する
要因の探究
日本遺伝学会第 96 回大会、2024 年 9 月 5 日、高知工
科大学
10. 松本篤樹、伊志嶺桃佳、赤瀬太地、相澤康則 [一般
講演]
ヒト培養細胞における DNMT の必須性
日本遺伝学会第 96 回大会、2024 年 9 月 5 日、高知工
科大学
11. 山本歩夢、大野知幸、赤瀬太地、相澤康則 [一般講
演]
TP53 第 1 インترون内レトロトランスポゾン Alu が転
写発現を抑制する機序を解明する
日本遺伝学会第 96 回大会、2024 年 9 月 5 日、高知工

科大学

12. 倉澤光、赤瀬太地、橋本陽太、松浦優太、山崎翔太、金子真也、大野智幸、相澤康則 [一般講演]
広いゲノム領域の細胞生存必須性を評価する方法の開発
日本遺伝学会第96回大会、2024年9月6日、高知工科大学
13. 相澤康則 [一般講演]
Understanding human genome architecture via genome minimization on X chromosome.
X染色体研究会、2024年9月9日、北海道大学
14. 相澤康則 [招待講演]
ヒトiPS細胞に対する大規模ゲノムエンジニアリング
殿町・羽田再生医療拠点キックオフシンポジウム、
2024年9月26日、Shimadzu Tokyo Innovation Plaza
(川崎殿町)
15. Hinata Hashimoto, Kengo Matsuzawa, Nobuaki Shiraki, Yasunori Aizawa [ポスター発表]
Transcriptional dynamics of L1 antisense promoters during differentiation of human iPS cells into β -cells.
Transposable elements、2024年10月16日、Cold Spring Harbor Laboratory、(米国ニューヨーク州)
16. Shota Yamazaki, Yuriko Hori, Yasunori Aizawa [ポスター発表]
Defining the minimal set of genes for autotrophy in *Cupriavidus necator* H16 and prospects for synthetic autotroph.
Synthetic Biology for Health and Sustainability、2024年10月21日、Wellcome Genome Campus (英国ケンブリッジ)
17. Hikaru Kurasawa, Taichi Akase, Hinata Hashimoto, Yuta Matsuura, Riho Yamane, Shota Yamazaki, Shinya Kaneko, Tomoyuki Ohno and Yasunori Aizawa [ポスター発表]
Toward Minimization of 1% portion of the Human Genome.
Synthetic Biology for Health and Sustainability、2024年10月21日、Wellcome Genome Campus (英国ケンブリッジ)
18. Yasunori Aizawa [招待講演]
Large-scale human genome engineering for basic science & therapy.
Dark Genome Symposium 2024、2024年11月20日、New York University (米国ニューヨーク)
19. 赤瀬 太地、倉澤 光、橋本 陽太、松浦 優太、山崎 翔太、金子 真也、大野 知幸、相澤 康則 [ポスター発表]
ヒトX染色体上にある細胞生存に必須なゲノム領域を探索する方法
第47回日本分子生物学会年会、2024年11月27日、福岡国際会議場マリメッセ福岡
20. 山崎翔太、相澤康則 [ポスター発表]
水素酸化細菌の従属栄養・独立栄養スイッチングに必要な遺伝子セットの理解

第47回日本分子生物学会年会、2024年11月27日、福岡国際会議場マリメッセ福岡

21. 山本歩夢、大野知幸、赤瀬太地、相澤康則 [ポスター発表]
イントロンに存在するレトロトランスポゾン Alu の転写抑制能を検証する
第47回日本分子生物学会年会、2024年11月27日、福岡国際会議場マリメッセ福岡
22. 金子真也、相澤康則 [ポスター発表]
枯草菌での Gap Repair Cloning 法の開発
第47回日本分子生物学会年会、2024年11月27日、福岡国際会議場マリメッセ福岡
23. 橋本陽太、赤瀬太地、相澤康則 [ポスター発表]
上流 ORF にコードされた Microprotein の細胞内安定性評価
第47回日本分子生物学会年会、2024年11月28日、福岡国際会議場マリメッセ福岡
24. 松本篤樹、伊志嶺桃佳、赤瀬太地、相澤康則 [ポスター発表]
ヒト培養細胞における DNMT の必須性
第47回日本分子生物学会年会、2024年11月29日、福岡国際会議場マリメッセ福岡
25. 相澤康則 [招待講演]
Large-scale human genome engineering for basic science and therapy.
Japan-UK Synthetic Biology Conference、2025年2月4日、大阪国際コンベンションセンター
26. 相澤康則 [招待講演]
“技術覚醒”ヒト細胞ゲノム工学技術の最前線
RINK フェスティバル 2025、2025年2月14日、TIAT SKY HALL (羽田空港)
27. 相澤康則 [招待講演]
大規模ゲノム構築技術によるゲノム機能探究とその産業展開
福岡大学理学研究科 FD 講演会、2025年2月25日、福岡大学

【記者発表・取材】

- 1.取材対応者:相澤康則
「ゲノム「読む」から「書く」」という記事にコメント掲載
公表年月日:2024年5月29日(毎日新聞朝刊)
取材年月日:2024年1月19日