

# ゲノム構築技術による創薬研究基盤の開発

研究代表者：東京工業大学生命理工学院 相澤 康則

## 【基本構想】

本研究プロジェクトではこの2年間、東京工業大学相澤研究室で開発されたヒトゲノム工学技術の利点を活かした、2つの新しい創薬研究テーマを進めてきた。1つめは疾患モデル iPS 細胞の開発である。これは、健常者 iPS 細胞のゲノムを改変し、実際の患者で見られる遺伝子変異を導入した iPS 細胞を人工的に作るプロジェクトである。疾患の原因だとされているゲノム変異を特異的に導入した人工ヒト細胞は、疾患メカニズムの解明や新薬の開発に活用できる貴重な創薬研究ツールとなる。本研究では、神経変性疾患のモデル iPS 細胞を開発した。2つめのテーマでは、新型コロナウイルスのゲノムを人工的に合成する技術の開発であった。相澤研は保有する長鎖 DNA 合成技術群を活用して SARS-CoV-2 人工ゲノムを、微生物内でより効率よく合成する技術開発を進めた。この研究は、次の来るべきウイルスパンデミックに備えるための技術開発であり、コロナウイルスに限らず様々なウイルスの感染機構解明や新薬探索を加速させる技術基盤となるものである。本研究の成果は、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ものと期待される。

## 1. 2022年度の研究目的

本研究では、相澤研独自のヒトゲノム改変技術を活用して、2つの創薬研究テーマを推進した(図1)。

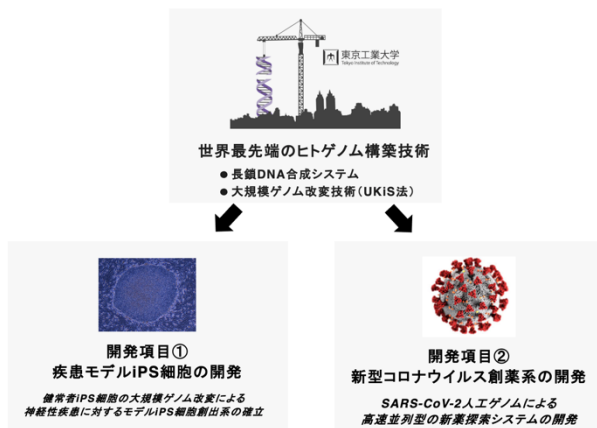
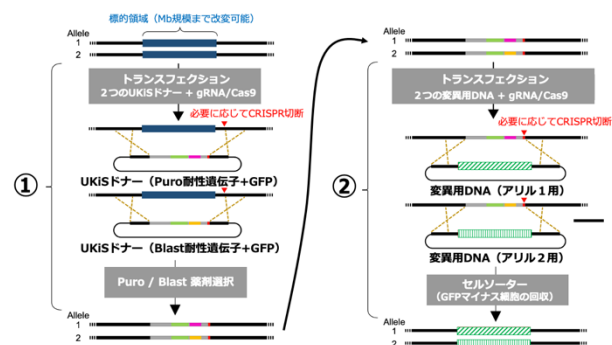


図1. 本研究プロジェクトの概要。

このヒトゲノム改変技術は Universal Knock-in System 法(以下、UKiS 法<sup>1</sup>; 図2)と呼ぶ。同法は、相澤研で長年研究対象にしてきたヒトゲノム非コード領域の機能的役割を調べるために開発された。この領域にはイントロンやレトロトランスポゾン由来配列といった、教科書に記されているほど広く知られているものの、その機能的役割を直接調べられてこなかったゲノム配列が数多く存在している。これらゲノム配列の機能的役割を明らかにするために、それら比較的長い配列だけを、両アレルから精密に欠損する方法が求められた。UKiS 法は、これら要求すべてに応えられる、世界的にみても現時点で最も有用な大規模かつ正確なヒトゲノム改変法の一つである。

図2. UKiS 法の概要<sup>1</sup>。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。

## UKiS法: ヒトゲノムの大規模精密改変法



UKiS 法を用いて本プロジェクトで取り組んだ1つめのテーマは、疾患モデル iPS 細胞の開発である。疾患モデル iPS 細胞とは、健常者由来 iPS 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細胞株を指す。現在 iPS 細胞を活用した創薬研究が盛んであり、健常者由来 iPS 細胞と患者由来 iPS 細胞の比較によって、薬剤スクリーニングすることで一定の成果は得られているものの、このアプローチには大きな課題がある。両細胞間では遺伝的背景 (genetic background) が大きく異なるため、両細胞群の比較による創薬探索は容易ではない。この課題を克服するための1つのアプローチに、疾患モデル細胞の開発がある。疾患モデル細胞は、疾患の原因だと考えられている遺伝子変異を健常者 iPS 細胞に導入した細胞であることから、導入した変異部位以外のゲノム領域は、元の健常者由来細胞と完全同一である。すなわち、疾患モデル細胞と健常者細胞の遺伝的背景は同一である。そのため、両細胞の比較により、遺伝子変異の影響をストレートに調べることができ、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 UKiS 法のメリットを活かし、通常のゲノム編集技術だけでは導入が困難な遺伝子変

異を導入した疾患モデル iPS 細胞を開発することを一つの目標とした。

2つめの創薬研究テーマでは、新型コロナウイルス感染症に対する創薬技術の開発を進めた。幸い、mRNA 技術などの新しい生命工学技術によって今回のパンデミックは収束できたが、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備える新技術を開発することは必要である。本プロジェクトでは、ウイルスゲノムを人工的に合成する技術基盤を確立し、ウイルス研究やウイルス創薬の一助となることを目指した。ウイルスゲノムの人工合成を迅速に可能にする基盤技術を確立できれば、ウイルス粒子サンプルの入手を待たずして、ゲノム配列情報のみでウイルス感染の分子プロセスを再現できるようになる。本研究では特に SARS-CoV-2 を対象に、ウイルスゲノム合成の基盤技術開発を実施した。

プロジェクト2年目となる 2022 年度は、昨年度の成果を土台に以下の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

昨年度に引き続き 2022 年度は、ある遺伝性の神経疾患（以下、疾患 X）の患者によく見られるゲノム変異をもつ iPS 細胞株の完成を目指した。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、疾患特異的な変異を導入した4種類の疾患モデル iPS 細胞と、その同じ部位に健常者に見られる配列を導入した健常者モデル iPS 細胞を1種類、合計5種類の iPS 細胞の作製を目標とした（なお、論文公表前のため疾患名および遺伝子名を伏せておく）。

今回対象にした疾患では、2つある遺伝子 Y アリルのうち、一方のアリルに変異が入るだけで発症につながる事が知られている。いわゆる顕性の疾患である。また本疾患の症状は、遺伝子 Y 上のある塩基リピート配列が伸長するほど深刻化し、この塩基配列が長い患者ほどより幼少で発症することも知られている。

このような背景をうけて本研究で作成する疾患モデル細胞では、健常者細胞と比べて遺伝子 Y でのリピート配列伸長が長い2種類の細胞を作製することとした。それぞれ「疾患モデル細胞\_伸長大」および「疾患モデル細胞\_伸長小」と呼ぶ。

さらに本研究では、遺伝子 Y の両アリルで伸長が起きている細胞も作製することとした。上述のように同疾患は、片アリルでのリピート配列伸長でも発症してしまうため、両アリルに変異が起きている患者は極めて稀にしか存在しない（原理的には、同疾患のカップルの間から生まれた子供の中には、両アリルにリピート配列伸長という変異が両アリルに確認できることも考えられるが、現実的にはほとんどあり得ない）。しかし、UKis 法を用いれば、両アリルでリピート配列伸長が起きている細胞を作製可能である。この細胞では変異アリル数が2倍になるため、変異の影響がより顕著に現れる可能性が高く、有用な疾患モデル細胞になると考えた。そこで我々は、上述の「疾患モデル細胞\_伸長大」および「疾患モデル細胞\_伸長小」の両方の変異を、1アリルのみに導入した細胞と、両アリルに導

入した細胞を作製することとした。つまり、以下の4種類の疾患モデル iPS 細胞と1種類の健常者モデル iPS 細胞を作ることを目的とした：

- ・疾患モデル iPS 細胞\_伸長小@1アリル  
(以下、疾患細胞\_老人性 1)
- ・疾患モデル iPS 細胞\_伸長大@1アリル  
(以下、疾患細胞\_若年性 1)
- ・疾患モデル iPS 細胞\_伸長小@2アリル  
(以下、疾患細胞\_老人性 2)
- ・疾患モデル iPS 細胞\_伸長大@2アリル  
(以下、疾患細胞\_若年性 2)
- ・健常者モデル iPS 細胞\_伸長無@2アリル  
(以下、健常者細胞)

(注釈：以上の細胞の名称は、倉澤の項でも共通)

### (2) 疾患 X に対する疾患モデル iPS 細胞と健常者モデル iPS 細胞に対する機能評価

(1) で作成した iPS 細胞株を解析し、疾患の原因とされる遺伝子変異（塩基リピート配列伸長）がもたらす細胞機能への変化を調べることにした。本年度はその第一弾としてトランスクリプトーム解析を実施し、同変異によって、他のどの遺伝子の発現に影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的とした。今回は、以下の3種類の iPS 細胞株を RNA-seq 解析に処した：

- ・疾患細胞\_若年性 1
- ・疾患細胞\_若年性 2
- ・健常者細胞

### (3) 新型コロナウイルス人工ゲノムの構築

昨年度、コロナウイルス SARS-CoV-2（武漢型）のゲノムの一部を改変した人工ゲノムの合成に成功している（図3）。バイオセーフティーレベル2の施設でも本ゲ

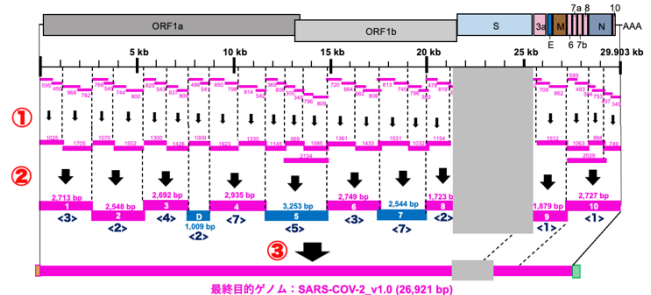


図3. コロナウイルスゲノム合成のスキーム。約50種類の数百塩基対のDNA断片を3段階で連結し、全長ゲノム断片を得る。図の一部を伏せてある。

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。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。

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 を調製する実験系を構築した。

この昨年度の成果をもとに 2022 年度は、完成した人工ゲノムを実際にヒト細胞に導入し、感染プロセスを再現することを目指した。もし期待通りに人工ゲノムはヒト細胞内で発現されれば、スパイクタンパク質コード領域に施した改変により、ヒト細胞は蛍光タンパク質を発現する。もし、蛍光タンパク質の発現が確認されない場合は、ウイルス人工ゲノムを再設計することとなる。

さらに 2022 年度は、合成したウイルスゲノムをもつ YAC-BAC ベクターを大量調製する実験系の最適化を進め、特許出願を目指すこととした。昨年度の結果から、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ている。その後昨年度中に、様々なアイデアを試し、大量調製のための実験スキームの確立に成功していたため、2022 年度は特許出願を果たすために、実験データの取得を進めることとした。

#### 酵母を使った長鎖DNA合成法 (Gap repairing method)

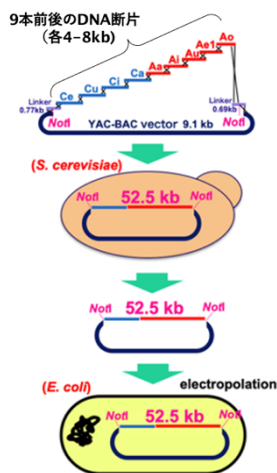


図4. 本研究で用いる長鎖 DNA 合成法(ギャップリペアークローニング)の概略図。末端が同じ配列を持つ 9 本前後の DNA 断片と、YAC-BAC ベクターを同時に酵母に導入することで、一気に全 DNA 断片が連結される。連結されたベクターは大腸菌に形質転換して大量調製するスキームである。

## 2. 2022 年度の研究成果

### (1) ゲノム構築技術を活用した疾患モデル iPS 細胞の作製

計画通り、5 種類の iPS 細胞株を作製することに成功した。各細胞株に対して少なくとも 3 クローンずつ作製できた。これら全てのクローンからゲノム DNA を抽出し、遺伝子 Y 上のリピート配列部分を PCR により増幅後にサンガー法により塩基配列を解読したところ、それぞれの iPS 細胞

株は期待通りに、両アレルあるいは片アレルに、意図したリピート数をもつことを確認できている。

その後、本疾患を研究されている国内の研究者に、我々の iPS 細胞株を紹介したところ、3 大学から共同研究の依頼を頂戴したため、共同研究を締結後、これら iPS 細胞株を分与した。2023 年度以降も共同研究は継続し、同疾患の発症メカニズムに関するさらなる理解や、同疾患に対する創薬技術の開発に貢献する。

### (2) 疾患 X に対する疾患モデル iPS 細胞と健常者モデル iPS 細胞に対する機能評価

2022 年度は、リピート伸長が及ぼす劇的な影響を明らかにしたかったため、上述のようにリピート伸長が長い方の変異を導入した若年型の疾患モデル iPS 細胞 2 種類と、健常者細胞との比較を RNA-seq で行った。その結果、予想通り、両方のアレルに変異を導入した場合の方が、より多くの遺伝子の発現変動を誘発していた。次に、定量 RT-PCR による確認実験を実施し、両方のケースで共通に発現変動している約 30 遺伝子に対して個別に発現変動を定量したところ、その大部分の遺伝子が RNA-seq の結果と同様に変異導入によって転写発現量が有意に変動していることが検証された。

今回の RNA-seq 解析は、未分化状態の iPS 細胞に対して実施したが現在は、これら iPS 細胞を神経前駆細胞に分化させた状態で RNA-seq 解析を実施すべく研究を進めている。今回対象とした疾患は神経変性疾患であるため、導入した変異の影響を観察する必要がある。しかし、未分化状態 iPS 細胞に対する今回の解析結果であっても、これまでの同疾患の発症に関与していると報告されていた遺伝子の発現変動が観察されていることから、我々が作製した疾患モデル iPS 細胞の有用性は示唆されていると考えられる。共同研究先には同結果を共有し、研究を強力に推進していく予定である。

### (3) 新型コロナウイルス人工ゲノムの構築

昨年度完成していた SARS-CoV-2 人工ゲノムをヒト培養細胞 HCT116 に導入したところ、期待に反して蛍光タンパク質は発現しなかった。その原因を明らかにすべく、感染プロセスのうち、蛍光タンパク質が翻訳される 1 段階前の「サブゲノム RNA への転写」が起きているかどうかを調べるために、RT-PCR 解析を実施したところ、今回改変したスパイクタンパク質部位を 5' 末端にもつサブゲノム RNA だけが産生されていないことが判明した(詳細は次項)。すなわち、最初に合成したウイルス人工ゲノムは、ヒト細胞内で「サブゲノム RNA への転写」までの感染プロセスは再現できていることが明らかとなった。

この結果を受けて我々は、スパイクタンパク質部分の配列改変の仕方を修正し、コロナウイルス人工ゲノム

(ver.2.0) を設計し、その合成を 2022 年度末までに完了している。今後は、この新しい人工ゲノムによって、蛍光タンパク質発現までの感染プロセスをヒト細胞内で再現できるかどうかを検証する。

さらに2022年度は予定通り、合成したウイルスゲノムをもつYAC-BACベクターを大量調製する実験系を最適化し、その結果をもって特許出願を完了した。

以上のように、本プロジェクトでは当初掲げていた目的のうち、「蛍光タンパク質を発現するコロナウイルス人工ゲノムの完成」だけは期間内に達成することはできなかったが、それ以外の全ての目標に到達することができ、ゲノム構築という国際的に見ても最先端の合成生物学技術を、創薬研究に活用できるケーススタディを作り上げたことは意義深いと言える。今後も、本研究を拡大深化させることで、神奈川県をヒト合成生物学の国際的な拠点として世界に認知させ、新しい創薬研究のメッカにすることを目指す。

# 業績

## 【原著論文】

1. Tomoyuki Ohno, Taichi Akase, Shunya Kono, Hikaru Kurasawa, Takuto Takashima, Shinya Kaneko and Yasunori Aizawa. Biallelic and gene-wide genomic substitution for endogenous intron and retroelement mutagenesis in human cells. *Nature. Communications*, 12, 4219, (2022).
2. Tomoyuki Ohno, Takeshi Nakane, Taichi Akase, Hikaru Kurasawa and Yasunori Aizawa. Development of an isogenic human cell trio that models polyglutamine disease. *Genes and Genetic Systems*, in press.

## 【口頭発表】

- 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、Zoom開催
- 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、Zoom開催
- 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 スポンサーセミナー RINKが描く未来、2021年10月13日、パシフィコ横浜
- 相澤康則、倉澤光、大野知幸、「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
- 相澤康則、「ヒト細胞ゲノム大規模改変技術の開発とその応用」、第73回日本生物工学会シンポジウム、2021年10月26日、Zoom開催
- 相澤康則、「Pilot Project Update 2021」、GP-write 5.0、2021年10月21日、Zoom開催
- 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、「Development of quantitative screening system for essential genomic elements and its application to human iPS cells.」、第44回日本分子生物学会年会、2021年12月3日、パシフィコ横浜
- 相澤康則、「ヒトゲノム大規模改変技術とその可能性」、第9回SBJシンポジウム、2022年5月25日、Zoom開催
- 相澤康則、「ゲノム構築学：ヒトゲノム機能性の根幹を見出す」、第16回バイオ関連化学シンポジウム、2022年9月10日、名古屋大学

- 相澤康則、「両アリル大規模ゲノム改変によるヒト非コード領域の機能探究」、第94回日本遺伝学会、2022年9月13日、北海道大学
- 橋本陽太、赤瀬太地、松本篤樹、相澤康則、「ヒト細胞内安定性を指標とした非コード領域由来タンパク質の機能性スクリーニング」、第94回日本遺伝学会、2022年9月13日、北海道大学
- 金子真也、中濱みさ子、相澤康則、「水平伝播を利用したDNA導入法」、第94回日本遺伝学会、2022年9月13日、北海道大学
- 赤瀬太地、橋本陽太、松本篤樹、相澤康則、「ヒト非コード領域から翻訳される小さいタンパク質に対する機能性配列の探索」、第94回日本遺伝学会、2022年9月13日、北海道大学
- 伊志嶺桃佳、赤瀬太地、大野知幸、相澤康則、「ヒトHCT116細胞における各DNAメチル化転移酵素の欠失」、第94回日本遺伝学会、2022年9月14日、北海道大学
- 松本篤樹、赤瀬太地、橋本陽太、相澤康則、「機能既知のlncRNAがタンパク質をコードしている可能性を検証する」、第94回日本遺伝学会、2022年9月14日、北海道大学
- 山崎翔太、宮原佑宜、柘植丈治、相澤康則、「水素細菌のコア代謝ネットワークにおける遺伝子冗長性」、第94回日本遺伝学会、2022年9月13日、北海道大学
- 相澤康則、「近未来の再生医療で革新を生み出す(かもしれない)ヒトゲノム工学技術」、日本再生医療学会第2回科学シンポジウム、2022年12月13日、川崎キングスカイフロント東急REIホテル
- 相澤康則、「合成生物学・ゲノム科学の現状・未来と産業応用の可能性」、第232回知的財産マネジメント研究会、2022年12月17日、Zoom開催
- 相澤康則、「バイオ産業革命時代でのヒトゲノム工学の挑戦」、医療産業イノベーションフォーラム、2013年1月19日、Zoom開催
- 相澤康則、「ゲノム構築技術が切り拓くバイオ産業フロンティア」、東京工業大学HLSイノベーションフォーラム

ム、2023年2月13日、東工大田町キャンパス&Zoom開催

○相澤康則、「骨太基礎研究「ゲノム構築」が切り拓く再生細胞医療での新規展開」、RINK FESTIVAL 2023、2022年9月13日、島津製作所 Shimadzu Tokyo Innovation Plaza

○相澤康則、「Sub-megabase and biallelic genome writing technology creates functional human iPS cells for future health」、Synthetic Biology for Future Health、2023年3月15日、Wellcome Genome Campus（イギリス）

【特許】

- (1) 国内特許出願 1件
- (2) 国際特許出願 0件