



CRISPRフリーのゲノム編集時代の幕開け —ゲノム編集技術の展開—

2020/11

三井物産戦略研究所

技術フォーサイトセンター 兼 技術・イノベーション情報部インダストリーイノベーション室
阿部 裕

Summary

- 2020年のノーベル化学賞受賞でも話題となったゲノム編集技術CRISPR-Cas9は、さまざまな分野で適用が進み、生産性向上など具体的な実績を有し、今後の社会実装は着実に進展すると予想される。
- CRISPR-Cas9には、意図しない場所の遺伝情報を変更する可能性があったり、DNAを切断するため免疫機能が発動し生体に悪影響を及ぼしたりするなど、解決すべき欠点も存在する。
- 現在、CRISPR-Cas9改良の動きの一方、DNAを切らずにゲノムを編集する「RNA編集技術」や「ミトコンドリアDNA編集技術」などCRISPRフリーと呼ばれる技術の研究開発が行われている。その応用として「RNA医薬」、「ミトコンドリア病」の治療・治癒が挙げられ、これら技術動向には要注目である。

2020年10月7日、スウェーデン王立科学アカデミーは、ゲノム編集技術の開発に携わった科学者2名にノーベル化学賞を授与すると発表した。2012年6月に論文¹が発表されてから約8年というスピード受賞である。これはゲノム編集技術CRISPR-Cas9²がどれほど革新的な技術であることを示しており、2013年に培養細胞でCRISPR-Cas9の有効性が示されて以降、現在にいたるまで医療・ヘルスケア分野はもちろんのこと、農業・畜産・漁業などの分野で利用され具体的な成果³を挙げている。

このように世界中から注目され実績もあるCRISPR-Cas9であるが、解決すべき欠点も存在する。後述するように、生体にとって極めて重要なDNAを「切断」する仕組みであるため、免疫機能が働いて生体に悪影響を与えることや、改善の努力がなされているものの、全く関係のない遺伝情報を変更してしまうことがあるなど、生命科学に携わる人たちには広く認知・共有されている事実がある。これらが改善されないと京都大学iPS細胞研究所で成果⁴が出ているものの、CRISPR-Cas9をヒトの遺伝子治療など、最も活用したい医

¹ 「A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity」 (PMID: 22745249 PMID: PMC6286148 DOI: 10.1126/science.1225829) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22745249/>

² Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated proteins。CRISPRは(獲得)免疫に関係する遺伝子が存在する場所の名前。回文構造を持った特異な配列が特徴で九州大学・石野良純教授が発見。Casは一群のタンパク質の名前。Cas9はDNAの二重螺旋構造を切断する機能を持つ核酸分解酵素と呼ばれるタンパク質の一つ。文末参考資料参照。

³ CRISPR-Cas9については三井物産戦略研究所『2016年に注目すべき4つの技術：ゲノム編集』（筆者：岡田智之）で事例を中心に紹介している。

https://www.mitsui.com/mgssi/ja/report/detail/_icsFiles/afieldfile/2016/10/20/160215mt.pdf

⁴ iPS細胞研究所ではCRISPR-Cas9を用いて免疫拒絶に関与するHLAゲノムを削除したiPS細胞の作製に成功。またデュシェンヌ型筋ジストロフィー（MDM）でCRISPR-Cas9/CRISPR-Cas3によりエクソスキッピングしたiPS細胞を同研究所が開発したウイルス様粒子により効果的に細胞に送達し骨格筋幹細胞の再生に成功。これはマウスでの成果で今後ヒトへの適用に期待。なお、日本新薬のMDM治療薬「ビルトラルセン」、Sarepta Therapeutics社のEteplirsen（日本未承認）は従来型の核酸医薬でゲノム編集技術を用いた治療薬ではない。

療分野での本格的な展開に際し、安全性の懸念が完全に払拭できない。このためCRISPR-Cas9の抱える課題を克服するための技術が求められている。ゲノム編集技術を巡っては、欧米中などを中心として激しい研究開発競争が繰り広げられており、さまざまなCRISPRの派生技術（後述、図表13）が生まれているが、本レポートでは、その中でもCRISPR-Cas9のようにDNAを切断せずに遺伝情報を書き換え可能で医学応用可能な①RNA編集技術と②ミトコンドリアDNA編集技術（図表1）を紹介する。

図表1 本レポートで紹介するゲノム編集技術

	CRISPRを使うゲノム編集	CRISPRを使わないゲノム編集	
編集技術	ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9	RNA編集技術	ミトコンドリアDNA編集技術
ターゲット	DNA	RNA	ミトコンドリアDNA
編集方法	DNAを切断して編集	RNAとミトコンドリアDNAはそのまま塩基を変換（置換）	
編集ツール（使用酵素）	人為的に改変した核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）	核酸代謝酵素（デアミナーゼ） ・アデノシン・デアミナーゼ ・シチジン・デアミナーゼ	
備考	意図しない遺伝子が編集される欠点があるが現在克服するための研究開発が進捗	遺伝情報のコピーを編集対象とするためDNAに対する恒久的影響を排除	ミトコンドリアDNAの編集技術によりミトコンドリア病などの難病治療に光明

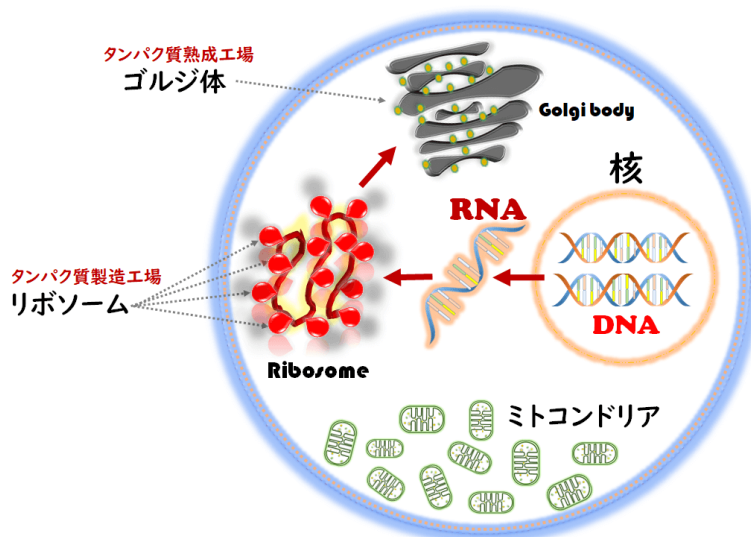
出所：三井物産戦略研究所作成

0. ゲノム編集を理解するための予備知識

0-1. 細胞（核、リボソーム、ミトコンドリア）

生物は、膨大な数の細胞で構成されている。ヒトの成人細胞の数は約37兆個⁵ともいわれているが、一概に細胞といっても脳にある神経細胞、肝臓の肝細胞、筋肉の筋細胞などいろいろな細胞が存在する。しかし、細胞の基本的な中身は同じで、図表2のような構成となっている。

図表2 細胞の中味



出所：三井物産戦略研究所作成

⁵ Annals of Human Biology (Volume 40, 2013) 「An estimation of the number of cells in the human body」
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/03014460.2013.807878>

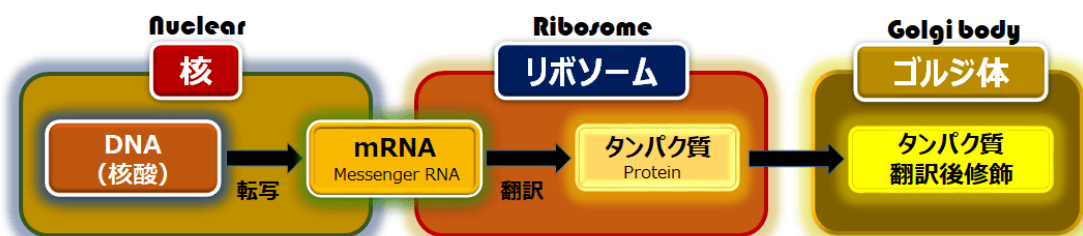
図表2に示したように細胞の「核」には、遺伝情報を保存しているDNAが存在する。核は「核膜」で覆われており保護されているが、DNAの遺伝情報は、RNAによって頻繁に参照されるためにとっても動的な世界である。「リボソーム」は、「タンパク質製造工場」であり、DNAの遺伝情報をコピーしたRNAが核内から核膜を通り抜けてリボソームに移動し、RNAが運んできた遺伝情報を基にタンパク質を作り出す。このリボソームで作られられたさまざまなタンパク質が細胞内外で生命活動の維持に必要な機能を果たすことになる。

「ミトコンドリア」は、細胞が活動する上で必要なエネルギーを「核」や「リボソーム」などの細胞組織に供給する「エネルギー工場」の役割を果たしている。このミトコンドリアは、かつて独立した細菌であったが、進化の途上で細胞と共生することになり、現在の姿（細胞内で生息する）に至っているとされる。このため、ミトコンドリアは、自活していた当時の痕跡ともいえる独自のDNA（後述するミトコンドリアDNA⁶）を持っている。

0-2. セントラルドグマとゲノム

「セントラルドグマ (Central Dogma)」は、生物学における文字どおりの中心概念で、生物の遺伝情報は「DNA (保存) → RNA (転写) → タンパク質 (翻訳)」の順に伝達されるとする学説である。図表3に示したとおり、DNAからの遺伝情報が、RNAに転写・翻訳されてタンパク質としての基本的な骨格がリボソームで作られる。その後、ゴルジ体に移動し、いろいろな生体物質と反応しやすいように物質（脂質や糖鎖⁷など）が付加⁸された（修飾）後、細胞内に放出される。

図表3 セントラルドグマから翻訳後修飾まで



出所：三井物産戦略研究所作成

遺伝情報は、DNAに保存されており、ある生物種の遺伝情報全体のことを「ゲノム (genome)」と呼ぶ。地球上には数百万ともいわれる動植物が生存しているが、その数だけゲノムが存在する。人間や動物のゲノムの場合、核ゲノム (nuclear genome) とミトコンドリア・ゲノム (mitochondria genome) から構成される⁹。核ゲノムは遺伝情報をDNAに保存し、ミトコンドリア・ゲノムは遺伝情報をミトコンドリアDNAに保存している。通常、ゲノムといった場合、核ゲノムを指すことが多いが、エネルギー生産や老化など重要

⁶ ミトコンドリアのDNAは、環状（塩基数16,569）で37の遺伝子を含む。核ゲノムと比較して変異しやすい。ミトコンドリアDNAは母系遺伝する。

⁷ 糖鎖については、三井物産戦略研究所「糖鎖テクノロジー」（2019年4月）参照。

https://www.mitsui.com/mgssi/ja/report/detail/_icsFiles/afiedfile/2020/01/30/1904t_abe_1.pdf

⁸ 図表3にあるようにタンパク質翻訳後修飾と呼ばれ、リン酸化、メチル化、脂質修飾、糖鎖修飾などタンパク質として機能するために必要な生体物質が後付けされる（タンパク質はアミノ酸が連なり折り畳まれて（フォールディング）3次元構造を形成）。

⁹ 光合成を行う植物のゲノムには葉緑体ゲノム（葉緑体DNA）も存在する。

な生命現象に影響を及ぼすミトコンドリアのDNAも近年注目されている。本レポートでは2020年7月に英「Nature」に掲載されたミトコンドリアDNA編集技術を3章にて紹介する。

1. ゲノム編集技術

細胞にとって重要な遺伝情報を持つDNAは「核膜」で覆われた「核」に守られて存在している。しかし、現実的にはDNAは外部から物理的な影響、例えば放射線などを受けて壊れることがあり、そのため、細胞は壊れたDNAを修復する機能を持っている。また、細胞は、自分自身の生存を脅かすウイルスなどを排除したり無力化するため、その生物のDNAを切断してバラバラにしたり、遺伝情報を無意味なものに改竄（置換）して、それ以上の増殖を防止するなどの防御機能（免疫）を持っている。このような生物が本来持っている仕組みを巧みに利用して、人間が望む形で遺伝情報を操作する技術を「**ゲノム編集¹⁰**」と呼ぶ。

1-1. ゲノム編集技術：CRISPR-Cas9

1953年、ワトソンとクリックによりDNAの構造（二重螺旋）が解明され、遺伝情報がどのように保持され、この情報からどのようにタンパク質が作り出されるかが理解されるようになった。その後、研究が進み生物のゲノム、特に人間の「ヒトゲノム」解読に関心が移った。2003年にはヒトゲノムの解読が完了し、これを契機として解読された遺伝情報（遺伝子）を、望むように編集し疾病の原因究明や生命現象の解明など研究活動に役立てることに期待が高まった。この背景には、人間の全遺伝情報が明らかになったことから、遺伝子の異常により病気が発症する仕組みや、生命活動の維持に重要な遺伝子が特定され機能が判明するなど、有益な研究成果が得られたことがある。当初、遺伝情報を正確に意図した形で変えることは難しく、コストと手間もかかっていたが、2012年、米Scienceオンラインに論文「A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity¹¹」が掲載され、簡便な方法で遺伝情報を操作できる技術が登場した。**ゲノム編集技術CRISPR-Cas9**である。

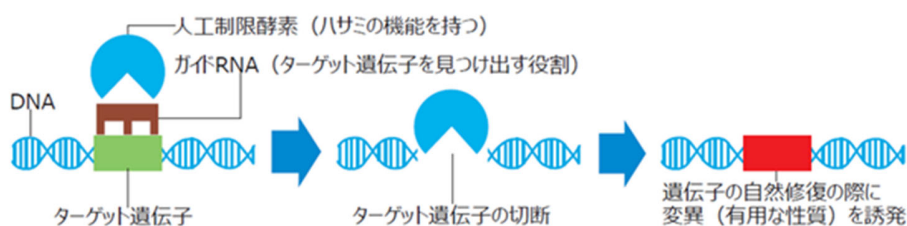
CRISPR-Cas9は、細胞が自分にとって有害なものから身を守る仕組み（免疫）を利用した技術であり、ポイントは二つある。一つは、外敵を無力化し排除するために、ウイルスなどのDNAを切断して、その増殖を止める物質を利用している点。二つ目は、放射線などの影響により切断されたDNAを修復する細胞の機能を利用している点である。DNAを切断する物質を「核酸分解酵素」（図表4では人工制限酵素と表現されている）と呼ぶ。CRISPRの**Cas9¹²**も**核酸分解酵素**の一つである。細胞は、Cas9により遺伝情報を保持するDNAが切断されると、元の状態に戻すため修復作業を開始する。修復作業の際、細胞は周りにある生体物質を利用して二重螺旋のDNAに復元する。CRISPR-Cas9は、この二つを巧みに利用してDNAを変更（ゲノム編集）する。

¹⁰ ゲノム編集技術については、日本における第一人者である広島大学・山本卓教授の『ゲノム編集とはなにか』（講談社ブルーバックス、2020年8月）が参考になる。<https://gendai.ismedia.jp/list/books/bluebacks/9784065194690>

¹¹ <https://science.sciencemag.org/content/337/6096/816>

¹² Casタンパク質は、自然／人為的改変を含めCas1からCas13などが知られている。例えばCas3はDNAをシュレグダーのように切り刻み、Cas13は後述するRNA編集に使うために人為的に改変されているなど、役割・特質が異なる。文末参考資料参照。

図表4 ゲノム編集の仕組み



出所：三井物産戦略研究所「2016年に注目すべき4つの技術」

その仕組みは、図表4に示してあるようにターゲット遺伝子（DNA）をCas9で切断する。細胞はDNAの切断という異常を検知すると、直ちにDNAの修復を試みるが、この時、事前にゲノム編集用に用意してある遺伝子（遺伝子を構成する分子）をDNAの修復材料（図表4の右の赤い部分）として、細胞に利用させることでターゲット遺伝子に変更を加える。

CRISPR-Cas9は、従来の技術と比較して、とても使いやすい技術で、手間とコストをかけずに異常な遺伝子を無効化したり、有用な遺伝子を新たに自在に組み入れたりすることが可能であることから、生命科学の研究者から注目を集めた。また、論文発表の翌年には、具体的な適用事例が示され、その有用性が確認され、ゲノム編集技術がメディアや一般市民の間でも広く知られるようになり現在に至っている。

1-2. CRISPR-Cas9の適用事例

CRISPR-Cas9は、既に畜産、農業、漁業、医療などで利用されている。畜産分野では、カリフォルニア大学デービス校の研究グループが2020年7月、米国実験動物学会にてCRISPRを利用して、牛の子孫の75%を雄にできることを発表¹³している。雄牛は雌牛と比較して飼料をより効率的に筋肉へ変換することができるため、雄を人為的に増やすことができれば飼料を減らしながら、商品価値の高い肉の生産を増やすことができるのではないかと考えられている。また、農業では、コメやコムギなど多様な作物やリンゴなどの果物の品種改良に広く用いられ、漁業ではマグロの養殖で有名な近畿大学で神経過敏なマグロをゲノム編集により「鈍感なマグロ」にして養殖率を向上させている¹⁴。もちろん、医療・ヘルスケア分野でもCRISPRは多用され、直近でも新型コロナウイルス（病名：COVID-19、ウイルス名：SARS-CoV-2）の検査に使用されている（図表5のSHERLOCK。同図表内その他は研究利用など）。PCR検査とは異なり、新型コロナウイルスだけに存在する固有の遺伝子配列を基に罹患の有無を判定するため、極めて正確な診断が可能となっている。

¹³ カリフォルニア大学デービス校ウェブサイト。 <https://www.ucdavis.edu/news/meet-cosmo-bull-calf-designed-produce-75-male-offspring>

¹⁴ マグロは外部刺激に対し敏感で、光などに驚いて生け簀網に猛スピードでぶつかって衝突死することが頻発していた。近畿大学では、ゲノム編集技術を利用しマグロの性質を和らげることで衝突死するほどの敏感行動をとらない「養殖しやすい」マグロの育種に取り組んでいる。 http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/brain/sip/sip1_topix_2-1-06.pdf

図表5 CRISPRを利用した検査法

CRISPR検査法	概要	開発企業など参考
SHERLOCK (FDAの緊急承認 COVID-19検査利用)	SHERLOCKは、DNAとRNAを分解する核酸分解酵素Cas13aを利用し、検査対象となるウイルス固有の遺伝子配列を識別し、陽性/陰性の判定を行う。	マサチューセッツ工科大学 マクガバン研究所
SHERLOCK v2	SHERLOCK v2は、Cas12aとCas13を利用し、検査対象となるウイルス固有の遺伝子配列を識別し、陽性/陰性の判定を行う。SHERLOCKの検査プロセスを効率化し検査時間の短縮、多様なウイルス検査に対応。	ハーバード大学 ブロード研究所 Sherlock Biosciences https://sherlock.bio/
SHERLOCK & HUDSON	SHERLOCKに検体処理法HUDSON (heating unextracted diagnostic samples to obliterate nucleases) を組み合わせた検査手法。HUDSONは、核酸分解酵素を不活性化し、ウイルスの細胞膜を破壊して、内部のDNAやRNAなどを溶液中に放出させる技術。	デング熱ウイルス (DENV) ジカウイルス 黄熱病ウイルスの検査
DETECTR	DETECTRは、DNAを分解する核酸分解酵素Cas12aを利用し、検査対象となるウイルス固有の遺伝子配列を識別し、陽性/陰性の判定を行う。	カリフォルニア大学バークレー校 ジェニファー A. ダウドナ教授 Mammoth Biosciences https://mammoth.bio/

出所：三井物産戦略研究所作成

1-3. CRISPR-Cas9の課題

冒頭述べたようにCRISPR-Cas9は画期的な技術ではあるが、解決すべき課題があることも明らかにされている。CRISPRでは意図的にDNAの二重螺旋を切断することから、細胞の予期しない免疫反応を引き起こしたり、ターゲット遺伝子以外の遺伝子を変更してしまったりする**オフターゲット**と呼ばれる現象が稀に引き起こされる。特にゲノム編集技術を人間の治療に適用しようとする場合には、オフターゲットを引き起こさないことが必須条件となる。このような問題を克服するため、CRISPRの欠点を改善する研究やDNA以外の編集技術¹⁵の探索が進められているが、その対象の一つにRNAがある。RNAの持つ遺伝情報はコピーであるため、オフターゲット効果などで仮にゲノム編集に失敗しても遺伝情報のマスターを保持するDNAには直接的影響がないことから、ポストCRISPRの有力な候補技術と考えられている。次章において**RNA編集技術**について解説を行う。

2. RNA編集技術

RNA¹⁶は、DNAが保持している遺伝情報のコピーを保存し、この遺伝情報を基にリボソームがタンパク質を作り出すのに必要な情報を受け渡すという重要な役割を担っている。RNA編集技術は、DNAからコピーしたRNA上の遺伝情報を編集する技術である。RNA編集技術は、CRISPR-Cas9のように遺伝情報のマスターであるDNAを直接編集しないため、望ましくない変異をDNAにもたらすリスクがないこと。また細胞は役割を終えたRNAを速やかに分解する機能を備えているので、RNA編集を施された人為的なRNAが生体内に残らないことも、RNAが研究者から注目される理由の一つとなっている。

¹⁵ CRISPRからの派生技術、応用技術、CRISPRフリー技術などは、本レポート図表13を参照。

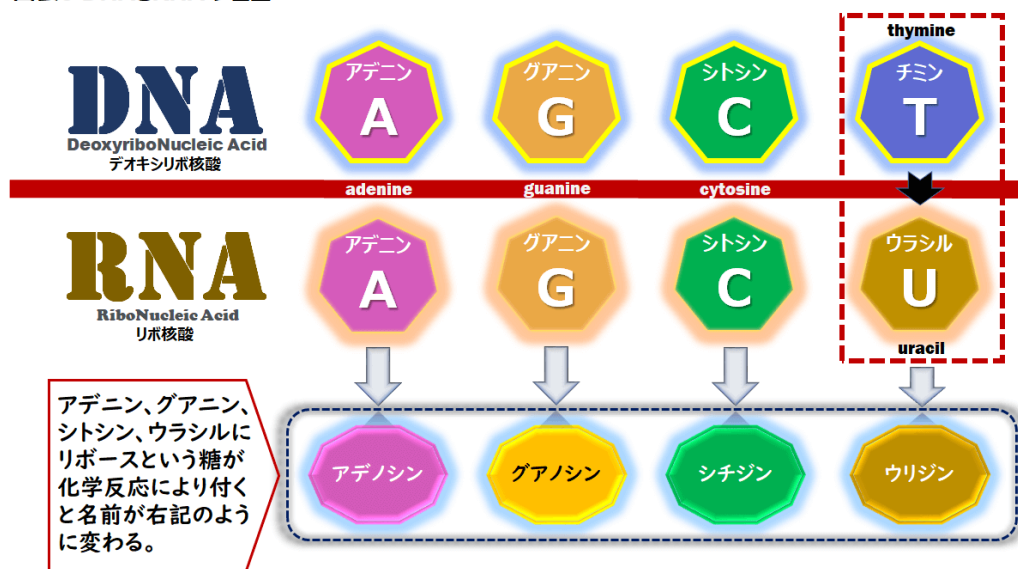
¹⁶ 本レポートでRNAは、遺伝情報のコピーを持つメッセンジャーRNA (mRNA) のことを指す。

2-1. RNA編集技術：切らずにピンポイントに編集

自然界では、動植物がRNAの遺伝情報を頻繁に変えていることが知られている。例えば植物のミトコンドリアDNAからRNAにコピーされた遺伝情報の一部にRNA編集が施される場合があり、このRNA編集がなされないと十分に機能しないタンパク質となる研究結果がある。このような、DNAの遺伝情報からストレートにタンパク質を作るのとは別に、RNAレベルで遺伝情報を編集してタンパク質を作る仕組みが存在するのは、自然環境や生体組織の変化などに対応するためで、必要となる機能調整を行う仕組みが**RNA編集**だと考えられている。このRNA編集による生体制御を担っているのが**RNA編集酵素**と呼ばれるタンパク質である。RNA編集酵素は、核酸分解酵素Cas9のように切断することなく、RNA上の特定の遺伝情報のみを**置き換える性質**を持っている。このRNA編集酵素による遺伝情報の置き換えとは、具体的には**塩基**と呼ばれる物質を変えることである。

遺伝情報は、図表6に示したように4つの塩基で構成されている。DNAは、**アデニン (A)**、**グアニン (G)**、**シトシン (C)**、**チミン (T)** であり、RNAではアデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、**ウラシル (U)** の組み合わせである (DNAからRNAに遺伝情報がコピーされる際、**チミン (T)** が**ウラシル (U)** に変換¹⁷される)。これら塩基は、細胞内の生体物質の影響を受けやすく、リボースという糖が塩基に付くと名前が図表6下段のように変わる。また、これら4つの塩基は、図表7のように、それぞれ結合する相手が厳密に決まっている。これを**塩基対**と呼ぶ。

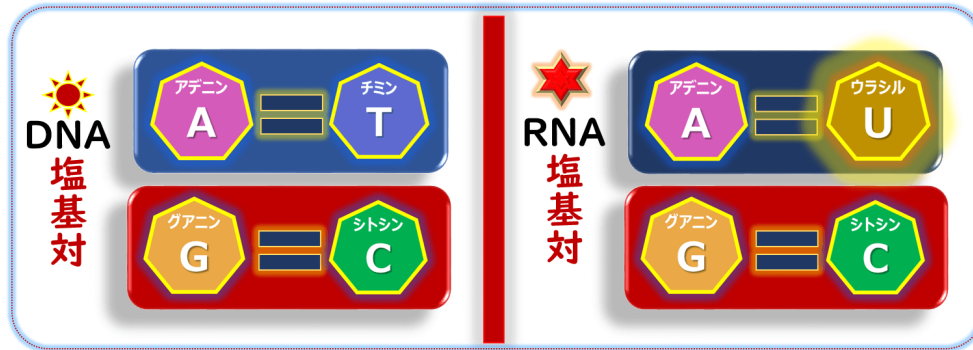
図表6 DNAとRNAの塩基



出所：三井物産戦略研究所作成

¹⁷ DNAの塩基は、生体内の化学的変化などにより他の物質に変わることがある。特に、シトシンはウラシルに変わりやすい性質があり（高い頻度で変化することが知られている）、DNAの修復機構が、その都度ウラシルをシトシンに戻すという作業を行っている。仮にDNAの塩基のうちチミンではなく、ウラシルが採用されていると、シトシンがウラシルに変わったときにDNAの修復機構は、最初からウラシルなのか、それともシトシンが変化したウラシルなのか判断できず修復ができない状態となる。この問題を解決するため、進化の過程で、DNAの塩基には、ウラシルを基に作ることができるチミンを採用したと考えられている。

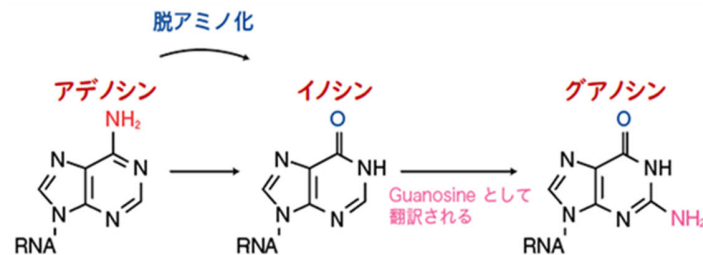
図表7 塩基の組み合わせ（塩基対）



出所：三井物産戦略研究所作成

例えばRNA編集酵素の一つである「アデノシン・デアミナーゼ」は、RNAにあるアデノシン（A）をイノシン（I）に変換する酵素である。イノシン（I）は、図表6の「DNAとRNAの塩基」には出てこない物質であるが、アデノシン・デアミナーゼは、化学反応（図表8）によりアデノシン（A）をイノシン（I）に変化させる。この化学変化を受けたRNAは、リボソームに運ばれ遺伝情報が読み取られる際、イノシン（I）は、グアノシン（G）として翻訳される（イノシンの化学構造はグアニンによく似ているため、遺伝情報を翻訳する際に誤認する）ため、元のDNAの遺伝情報によるものとは異なるタンパク質が作られることになる。

図表8 アデノシン・デアミナーゼの化学反応



出所：医学生物学研究所ウェブサイト
<https://ruo.mbl.co.jp/bio/product/epigenetics/article/RNA-modification.html>

アデノシン・デアミナーゼ以外のRNA編集酵素として、シチジン（C）をウリジン（U）に変換する「シチジン・デアミナーゼ」がある。このようなRNA編集酵素を利用して一つの塩基だけを変換することを「一塩基編集」と呼ぶ。この一塩基編集に使える酵素としてはシチジン・デアミナーゼ・ファミリーに属するAPOBEC¹⁸やアデノシン・デアミナーゼ・ファミリーに属するADAR¹⁹などがある。この一塩基編集はRNAだけではなくDNA編集にも有効であることから「ベース・エディタ（Base Editor：BE）」と総称されている。代表的なベース・エディタには、アデニン・ベース・エディタとシトシン・ベース・エディタがある（図表9）。

¹⁸ APOBEC (Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like) は、脱アミノ化酵素と呼ばれ、シチジンからアミノ（NH₂）を除去してウリジンに変換する。APOBECはヒトでは11種類が確認されている。

¹⁹ ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA) は、ヒトでは3種類確認されており、ADAR1とADAR2が編集活性を持つと理解されている。またヒトの生体内においてアデニン（A）→イノシン（I）変換部位は約300万程度が同定。（Picardi, E. et al., Sci Rep 2015, 5, 14941.）

図表9 代表的なベース・エディタ



出所：三井物産戦略研究所作成

現在、ベース・エディタの研究開発は猛烈な勢いで進んでおり、派生型を含めると50を超える手法が公表²⁰されている。ユニークなベース・エディタとしては、RNA編集酵素とCasタンパク質の一つであるCas13を併用したREPAIRがある。このほか、シチジン (C) からウリジン (U) への変換を可能とするRESUREや、本レポートでは言及していないターゲット遺伝子への案内役であるガイドRNAそのものに一塩基編集の機能を持たせることでRNA編集酵素を不要としたRESTOREやLEAPERがある²¹ (図表10)。そして、このベース・エディタの研究開発の中から、全ての塩基パターンを変換できる「プライム・エディタ (Prime Editor : PE)」というオールマイティな編集技術が登場した。プライム・エディタは、ゲノム編集の世界に革新をもたらすといわれており、原理的にはヒトの病原性遺伝変異の89%を修正可能とする研究論文²²がある。

図表10 主なRNA編集技術

名称	構成	変換	備考
ADAR1	Adenosine Deaminase ADAR1 + ガイドRNA	A to I変換 (アデノシン→イノシン)	最初のRNA一塩基編集技術
REPAIR	Adenosine Deaminase ADAR2 + dPspCas13	A to I変換 (アデノシン→イノシン)	ヒト細胞で変換成功
RESURE	Cytosine Deaminase+dRamCas13	C to U変換 (シトシン→ウラシル) A to I変換 (アデノシン→イノシン)	一塩基編集の適用拡大
RESTORE	改変オリゴRNA (+細胞内に存在するADAR2を利用)	A to I変換 (アデノシン→イノシン)	最初のCRISPRフリーRNA一塩基編集技術
LEAPER	アンチセンスRNA (+細胞内に存在するADAR2を利用)	A to I変換 (アデノシン→イノシン)	CRISPRフリー細胞導入手法が多样

ADARは、RNA編集酵素 (Adenosine deaminase acting on RNA) 細胞内に存在する

REPAIR : RNA editing for programmable A to I replacement

RESURE : RNA editing for specific C to U exchange

RESTORE : recruiting endogenous ADAR to specific transcripts for oligonucleotide-mediated RNA editing

LEAPER : leveraging editing endogenous ADAR for programmable editing of RNA

出所：三井物産戦略研究所作成

²⁰ CRISPR-Cas9 DNA Base-Editing and Prime-Editing (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7503568/>)

²¹ 現在のゲノム編集技術CRISPRやRNA編集技術では酵素の機能を利用して遺伝子の編集を達成してきた。酵素を不要とするRESTOREとLEAPERは、オフターゲット効果のリスクを最小化するCRISPRフリーの編集技術といえる。

²² 「Nature」に掲載された論文「Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA」を参照。この論文によれば、ヒト細胞を用いてテイ=サックス病 (Tay-Sachs disease) と鎌状赤血球病 (sickle cell disease) の遺伝子変異を修正したと報告している。 <https://www.nature.com/articles/s41586-019-1711-4>

今まで解説してきたRNA編集技術は、後述するRNA医薬²³の基礎となる技術で、RNAが保持する遺伝情報を編集してリボソームに送り込み、治療薬となるタンパク質を作り出させることで、治療が困難だった疾病の根治に役立てることが可能となると考えられている。

2-2. RNA編集技術の応用：RNA医薬

RNA編集技術の応用としては、RNAの遺伝情報を編集し、望みのタンパク質を作り出すRNA医薬の研究分野がある。例えば、ある腎臓病が、特定のタンパク質が存在しない、または機能しないことから発症することが確認されていれば、そのタンパク質を作るのに必要な遺伝情報をRNAに持たせて腎臓の細胞（リボソーム）に送り込んで、必要なタンパク質を作るよう作為することで、病気を治療させることが考えられる²⁴。遺伝情報を保持できるRNAを使ったRNA医薬は、（理論的には）どのようなタンパク質でも作り出せることから、がんの個別化治療用ワクチンやウイルス変異対策、そして新型コロナウイルスの治療薬として開発が進められている。海外では既に20種類以上のRNA医薬が臨床試験段階²⁵に入っている。

RNA医薬は高い治療効果が期待できるが、課題としては、遺伝情報を持つRNAが本来あるべき細胞から飛び出して、血液や体液などで生体内を移動などすると核酸分解酵素が異常を検知・捕捉し分解してしまうことが挙げられる。この免疫機能への対策のためには、RNA医薬を保護しながら目標とする組織に送り届けるドラッグ・デリバリー・システム（DDS）が必要となるが、これは開発途上にある。ただし、DDSについては、拙著「レクチンとエクソソーム」（2020年5月）²⁶で報告したとおり、合成生物学の知見など最新技術を利用した開発は着々と進んでおり、RNA医薬が実際の治療に活かされる時も近いと考えられる。

3. ミトコンドリアDNA編集技術

2020年7月8日、「Nature」にミトコンドリアDNA編集技術についての論文「A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing」が掲載された。この論文によれば、ミトコンドリアDNAを編集する際「バークホルデリア・セパシア」という細菌が生成する「DddA」を利用する。DddAは、細胞内に侵入してきた細菌を無力化するのが本来の役割である。Cas9は、細菌のDNAにとりつき物理的にバラバラに切断する方法をとるが、DddAは、細胞に侵入してきた細菌のDNAに結合し、DNA上の

²³ RNA医薬全般および核酸医薬との違いについては「mRNA 医薬開発の世界的動向」（医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス）を参照。

<http://nats.kenkyuukai.jp/images/sys/information/20190717095649-6ABC2FA50410294C82EBEF7D74463510333BCF1FB717B3F864612BCB0CA9F6B2.pdf>

²⁴ 現在では、DNAやRNAを人工的に合成することは可能であり、研究機関などの発注を受けて合成DNA／合成RNAを製造販売する企業が存在する。合成されたRNAに必要とするタンパク質の情報を人工的に書き込んだり、一部を編集したりして必要な臓器や組織に送り込み、タンパク質を作り出させることは実現可能な技術となりつつある。

²⁵ 米Moderna社は、新型コロナウイルスのゲノム解読が完了してからワクチン設計を開始。臨床試験向けの治験薬を製造するまで62日程度で実施。2020年2月24日にワクチンmRNA-1273の第1フェーズの臨床試験を開始。同社ウェブサイトによれば同年7月27日から第3フェーズの試験を実施している（詳細はClinicalTrials.govで識別子：NCT04470427で検索。もしくはModerna社ウェブサイト<https://www.modernatx.com/cove-study>を参照）。

²⁶ https://www.mitsui.com/mgssi/ja/report/detail/_icsFiles/afieldfile/2020/05/21/2005t_abe.pdf

全ての「シトシン (C)」を「ウラシル (U)」に変換して細菌を無力化する。すなわち、遺伝情報を上書きして無意味なものにすることで細菌の増殖を止める方式をとっている。

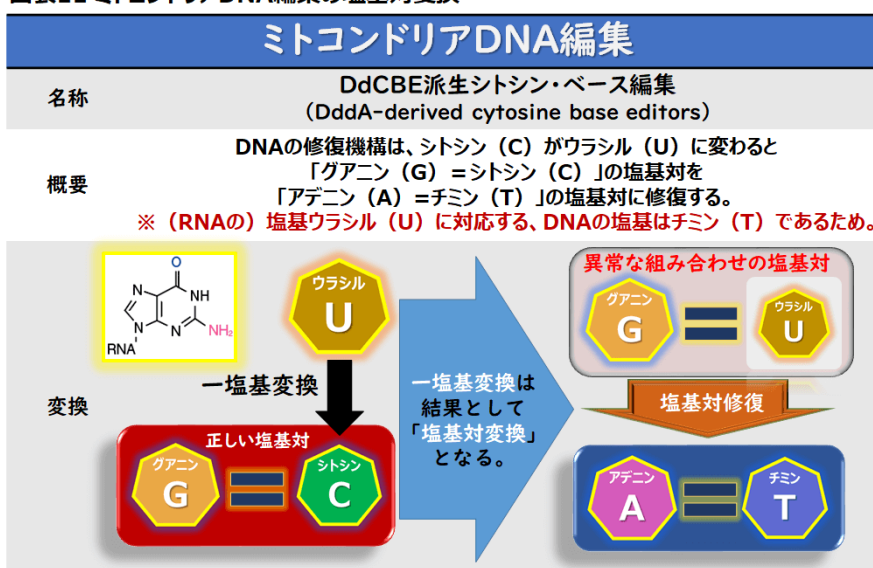
RNA編集の節で述べたように「ウラシル (U)」は、DNAには存在しない物質であり、DddAが全ての遺伝情報のうちシトシン (C) をウラシル (U) に変化させてしまうとDNAはその機能を喪失する。また、もともと「シトシン (C)」は、「ウラシル (U)」に変化しやすい物質で、「ウラシル (U)」に変化した「シトシン (C)」を細胞の修復機構が元に戻すという作業を恒常的に行っている。DddAは、この修復機構が正常に働くのを阻害しつつ、DNAの遺伝情報を破壊する（ちなみにCas9もDddAも細胞を外部の有害な細菌などから防衛する免疫の役割を担っており、ゲノム編集は、細胞の免疫機構を逆手にとって利用している）。

論文によれば、DddAをそのまま使うとミトコンドリアDNAが無効化されてしまうので、DddAを二分割して不活化し、これら二つのDddAが組み合わさったときにだけミトコンドリアDNAを「シトシン (C)」から「ウラシル (U)」に変えるように工夫を施している。細胞はDNAに変化が生じたことを感知すると修復作業を開始し、DNAにとっては異常な物質である「ウラシル (U)」を「チミン (T)」に読み替えて修復する。繰り返しになるが、DNAは2本鎖の構造であり、4つの塩基はどの塩基と結合するのか厳密に決まっている。

「シトシン (C)」は「グアニン (G)」と対をつくり、「アデニン (A)」は「チミン (T)」と対を作る。DNAの片方の塩基が「シトシン (C)」であれば、対向する方の塩基は「グアニン (G)」と決まる。DddAが「シトシン (C)」を「ウラシル (U)」に変えるとDNAの修復により、結果として「アデニン (A)」と「チミン (T)」の対に変換することが研究により判明している。

論文を発表した研究チームは、この編集技術を「DdCBE²⁷ (DddA派生シトシン・ベース編集ツール)」と名付け (図表11)、ミトコンドリアDNA以外にも応用適用を展開することが検討されているが、まだ論文発

図表11 ミトコンドリアDNA編集の塩基対変換



出所：三井物産戦略研究所作成

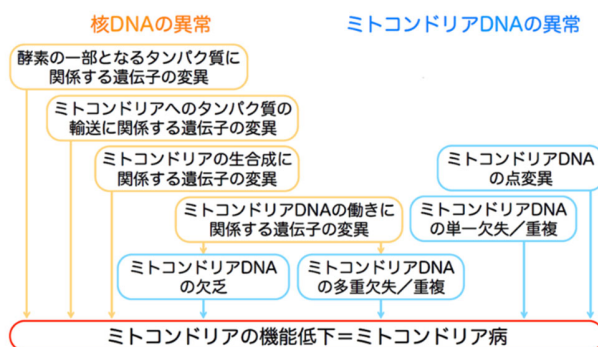
²⁷ DddA-derived cytosine base editor (<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2477-4>)

表直後であり、今後も研究を続け確実な成果を積み重ねていく必要がある。しかし、エネルギー生産や老化など多様な生命現象に関与するミトコンドリアの生物学的な謎の解明や、ミトコンドリアの異常によって起こる「ミトコンドリア病」の治療・治癒に向けた新しい道を拓く技術として大いに期待が寄せられている。

ミトコンドリア病

ミトコンドリアは、赤血球以外のほぼ全ての細胞に存在する細胞小器官の一つで、細胞活動をする上で必要となるエネルギー源（アデノシン三リン酸：ATP²⁸）を製造する器官である。ミトコンドリアは、細胞内に多数存在し、特に代謝の活発な脳、肝臓、筋肉細胞などには数百から数千が存在するとされ、成人の体重の約10%はミトコンドリアの重さだともいわれている。このミトコンドリアに異常が生じるとミトコンドリア病²⁹という一群の疾病が発症する（図表12）。ミトコンドリア病は、あらゆる臓器・組織、年齢を問わずに発症する特徴があり、アルツハイマー病³⁰やパーキンソン病³¹など神経疾患とも関連があるとされる難病である。この病気は、生まれた赤ちゃん5,000人のうち1人の割合で発症するといわれ、仮に発症した場合、その症状は多様で重篤性が高く、死亡率が高い病気である。このミトコンドリア病の原因は、幼少期の4分の3は核DNAの異常、残りの4分の1がミトコンドリアDNAの異常であり、成人してから発症した場合にはこの割合が逆転し、ミトコンドリアDNAの異常が4分の3となる。

図表12 ミトコンドリア病の原因



出所：国立精神・神経医療研究センター病院遺伝カウンセリング室「ミトコンドリア病ハンドブック」
https://www.nanbyou.or.jp/wp-content/uploads/upload_files/mt_handbook.pdf

²⁸ アデノシン三リン酸は、アデノシン（RNA編集の説明で出てきたアデニンにリボースという糖が付いたもの）にリンが3つ付いたエネルギー源となる生体物質。

²⁹ ミトコンドリア病に関しては、ミトコンドリア病の有効な治療方法を確立するための支援を行っている、一般社団法人こいのぼり（KOINOBORI Associate Inc.）のサイト<http://koinobori-mito.jp/>を参照。主なミトコンドリア病の一覧や国内外での治験の情報が得られる。

³⁰ 「Enhancing mitochondrial proteostasis reduces amyloid-β proteotoxicity」Nature（2017年12月）
<https://www.nature.com/articles/nature25143>

³¹ パーキンソン病とミトコンドリアとの関係に関する研究は進んでおり、機能低下したミトコンドリアを処理する分子ParkinやPinkの変異でパーキンソン病が発症することが判明している。Nature（2019年7月17日）
<https://www.nature.com/articles/d41586-019-02094-6>

21世紀以降、DNAやRNAなど生体物質の分析技術が進歩したことで、ミトコンドリアDNAの解析精度とスピードが著しく向上している。このような技術的進歩の恩恵もあり、乳幼児の発症が多い「リー脳症」の新しい原因遺伝子が発見されている。リー脳症の主な症状は、発達遅滞、筋力・筋緊張低下、呼吸障害、知的退行などで、5万人に1人の割合で発症するといわれ、特に難治性が高く治癒は期待できない難病である。リー脳症の原因は、ミトコンドリアDNAを解析した結果PTCD3という遺伝子にあることが分かった。PTCD3は、ミトコンドリアがATPを作るのに必要な酵素を作るために不可欠な遺伝子であるが、この遺伝子に異常があるためATPが正しく作れなくなり病気を発症していたことがつきとめられた。また2020年7月6日、順天堂大学が発達遅滞、小頭症、てんかんなどを引き起こすミトコンドリア病の原因遺伝子NDUFA8を発見したと発表している。NDUFA8の異常により、正常なタンパク質が作り出せないためミトコンドリアのエネルギー生産を阻害しているとの原因が特定されている。このように原因遺伝子が特定されれば、前述のRNA医薬を利用してRNAにNDUFA8タンパク質の情報を持たせ、リボソーム内でNDUFA8タンパク質に製造を促進させることも考えられる。根本的な治癒を目指す場合には、ミトコンドリアDNAのPTCD3やNDUFA8遺伝子が正常に働くように、ミトコンドリアDNA編集技術で遺伝子を正常化させることが視野に入る。この、切らずに塩基を変換できるミトコンドリアDNA編集技術は登場したばかりとはいえ、技術的成熟度を高め、難病に苦しむ患者への一日も早い治療適用が切望されている。

4. CRISPRを超えて

CRISPRが登場した2012年は、生命科学以外でも、人工知能（AI）や量子IT分野で注目すべき成果が生まれた年となった。トロント大学のヒントン教授が率いるチームが物体の認識率を競うILSVRC 2012³²において従来の手法を凌駕する機械学習（ディープラーニング）手法により優勝したことで、IT業界に大きな衝撃を与えた。これが引き金となり、第三次AIブームが巻き起こり機械学習の一般的認知度が向上するとともに、AIの社会実装が大きく進展した。また、ハーバード大学の研究チームは、D-Wave systems社のアニーリング型量子コンピュータを利用しタンパク質のフォールディング問題³³（Miyazawa and Jerniganモデル³⁴）を計算し解を得ている³⁵。これは議論もあろうが、量子コンピュータの産業的利用価値の能力を示す最初の事例となったことには間違いがない。そして生命科学の新時代を切り拓くCRISPR-Cas9の登場である。2012年は、AI（ディープラーニング）、量子コンピュータ、ゲノム編集というイノベーティブな技術が相次いで登場し、アカデミズムのみならず社会にも大きな影響を及ぼした年として長く記憶されるだろう。

³² ImageNet Large Scale Visual Recognition Challenge 2012.

<http://image-net.org/challenges/LSVRC/2012/index#timetable>

³³ タンパク質は、アミノ酸が鎖状に連なり折り畳まれて、複雑な形状に形成されるが、どのような仕組みでタンパク質が折り畳まれるのかの解明はなされておらず「タンパク質のフォールディング問題」と呼ばれている。

³⁴ Miyazawa and Jerniganモデルは、20個のアミノ酸全ての間固有の相互作用を考慮して、アミノ酸の組み合わせ方によってタンパク質がどのような形状になるかを示した計算生物学のモデルの一つ。

³⁵ Nature（2012年8月13日）<https://www.nature.com/articles/srep00571>

しかし、世の中に完全な技術など存在しない。AIや量子コンピュータはまだまだ発展途上にあり、CRISPRを巡ってはゲノム編集ベビー（Human Genome Editing）誕生という衝撃的な出来事もあり、研究倫理や道徳規範などを含む深刻な問題を抱えている。既に述べたようにCRISPR-Cas9は遺伝情報のマスターであるDNAを切断して編集するため、生体に意図しない影響を与える可能性が否定できない。また技術問題ではないが、知的財産など権利関係が複雑に交錯しており利用の際には留意が必要な状況にある。さらには商用利用する場合は費用がかさむという課題もある。このようななか、CRISPR-Cas9を改良する動きと、切らずにゲノムを編集するRNA編集技術やミトコンドリアDNA編集技術などCRISPRフリーと呼ばれる編集技術の研究開発が積極的に行われている。中でも標的遺伝子を切断もせず塩基変換もせず制御するエピゲノム編集や、ゲノム編集技術を応用してDNAを記憶装置として利用するなど、興味深い新鋭技術（図表13）が次々と登場しており、今後もゲノム編集技術を巡る技術動向には要注目である。

図表13 ゲノム編集技術

区分	技術	名称	参考/備考
CRISPR技術	DNA編集	CRISPR-Cas9	2012年に登場した獲得免疫機能を利用したゲノム編集技術
		CRISPR-Cas12a	Cas9と同じ働きをするRNA依存エンドヌクレアーゼ(CpfI)を利用したCRISPR
		CRISPR-Cas14a	CRISPR-Cas9よりも圧倒的に分子量が小さく微細組織へのデリバリーに適用
		CRISPR-Cas3	複数のCasを利用した初めてのCRISPR(タイプI)でHiPS細胞編集にも利用可能
	RNA編集	CRISPR-Cas13a	RNA編集CRISPRでCas13aは人為的変換を施されたCasタンパク質
CRISPR改良技術	PAMフリー	SpRY	ゲノム編集の起点となるPAMを不要とし全遺伝子領域の編集を実現
	CRISPRトランスポゾン	CAST, CRISPR-Cas12k, CRISPR-Cascade	トランスポゾン(転移DNA)とCRISPRを組合わせた高効率の遺伝子配列挿入
	ローカルデザリング	Cas9-TREX2, 2C-HR-CRISPR	遺伝子の相間組換え(HDR)、マイクロホモロジー-媒介末端結(MMEJ)の改善改善
	ゲノム自己修復	IHR	外来ドナーDNAを必要としないソックイン、相同染色体間組換えによるゲノム自己修復
	遺伝配列変異促進	EvoLR	遺伝子の変異を促進(enCas9-Poll5Mは野生株の777万倍の変異率)
CRISPR応用技術	DNAウイルス検査	DETECTOR	Cas12aを利用しウイルス固有の遺伝子配列を走査・識別して罹患の有無を判定
	RNAウイルス検査	SHERLOCK	Cas13を利用しウイルス固有の遺伝子配列を走査・識別して罹患の有無を判定
	DNA&RNAウイルス検査	SHERLOCK v2	Cas12aとCas13を併用したウイルス検査
	DNAストレージ	GESTALT, scGESTALT	Cas9が細胞に対し行った変異を蓄積しシーケンシングで情報を読み出す
		TRACE	Cas1とCas2を利用して細菌が受ける影響(重金属、糖代謝、低分子など)を記録
CRISPR派生技術	一塩基編集	ABE(アデニン・ベース編集)	アデニン・デアミナーゼ(アデニン(A)→イノシン(I)に変換)
		CBE(シトシン・ベース編集)	シトシン・デアミナーゼ(シトシン(C)→ウラシル(U)に変換)
	Target-AID	活性化誘導シチジン・デアミナーゼ(AID)シチジン→ウリジンに変換	
	BE3(Base editor3)	APOBEC1を利用しウラシル(U)→シトシン(C)に変換	
	ブライム編集	PE(Prime Editor)	モロニーマウス白血病ウイルス由来逆転写酵素(M-MLV RT)を利用したオールマイティな革新的編集技術 ・dSpCas9-MMLV-RT + pegRNA(prime editing guide RNA) ・nSpCas9-MMLV-RT + perRNA
エピゲノム編集	SunTag, SAM	DNAメチル化酵素やヒストン修飾酵素などdCas9を組合わせて遺伝子の発現制御	
CRISPRフリー技術	RNA編集	アデニン・デアミナーゼADAR1	最初のRNA一塩基編集(2012年10月)
		REPAIR	アデニン・デアミナーゼADAR2+CRISPR-dPspCas13
	RESURE	シトシン・デアミナーゼ+CRISPR-dRamCas13	
	RESTORE	改変オリゴRNA(ガイドRNAのみでRNA編集を実現)	
	LEAPER	アンチセンスRNA(ガイドRNAのみでRNA編集を実現)	
in vivo編集	AAV-HDR	アデノ随伴ウイルス(AAV: adeno-associated virus)を利用して非増殖細胞のゲノム編集を可能とする技術。ヒトの遺伝病を対象としたゲノム編集治療の可能性	
CRISPRフリー技術 & RNAフリー技術	ミトコンドリアDNA編集	DdCBE(Ddda派生シトシン・ベース編集)	ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌バークホルデルリア・セパシア(Burkholderia cepacia)が産生するDdda毒素を利用したミトコンドリアDNA一塩基編集

出所：三井物産戦略研究所作成

参考資料：主なCasタンパク質

Casタンパク質	機能
Cas 1	Cas 1は、ウイルスが細胞に侵入してくると、Cas2と共に複合体を形成し、ウイルスのDNAを切断し、細胞のDNAをCRISPR部位に挿入し記録（免疫記憶）する。免疫記憶は、反復配列で分離されている。ゲノム編集では、PAM（Proto-spacer Adjacent Motif）配列を認識。
Cas 2	Cas1と共に複合体を形成しウイルスに取り付き、DNA/RNAを切断する。PAMを認識。
Cas 3	Cas3は、大阪大学発のゲノム編集技術CRISPR-Cas3に利用されており、オフターゲットがほとんどない編集技術。Cas3は、Cas1/Cas2と異なりDNA/RNAを切り刻むように切断。
Cas 4	Cas1/Cas2複合体が切り出したウイルスDNA断片をCRISPR部位に成形し、正しい方向に挿入。Cas4は、DNAの二重鎖を解く機能、1本鎖のDNAを分解する機能も有する。
Cas 5	Cas5は、Cas1 & Cas2/Cas6/Cas7/Cas8などとマルチサブユニットの一部として、Cas6がCRISPR配列から生合成したcrRNA（CRISPR RNA）と結合し、Cascade（CRISPR-associated complex for antiviral defense）を構成。
Cas 6	Cas6は、CRISPR由来のエンドリボヌクレアーゼ（endoribonuclease）で、免疫記憶を保持するCRISPR部位から転写されたprecursor-crRNAを配列から切断する。Cas6は、pre-crRNA生合成酵素。
Cas 7	Cas7は、Cascadeを構成するユニットの一つ。Cas7は、Cas4が解いたDNAの二重鎖構造を保持し、6塩基ごとに折れ曲がりながら分子の中央部にらせん状に巻く、「crRNA:DNA折れ曲がり構造」を維持する。
Cas 8	Cas8は、Cascadeを構成するユニットの一つで、PAMを認識。
Cas 9	Cas9は、guide RNA（gRNA）とリボ核タンパク質（Ribonucleoprotein : RNP）複合体を形成。DNA配列とgRNAを照合して標的部位を認識し、PAM（NGG）配列から3塩基以内でDNAを切断。
Cas 10	Cas10は、DNAポリメラーゼおよびヌクレオチドシクラーゼを含む複合体。CRISPR-Cas10として生物圏で最も豊富なファージの遺伝操作に関する研究が進展。病原性ファージなど原核生物ゲノム編集技術。
Cas 11	RNP複合体（標的配列を認識する）を構成する。SubunitのメインはCas5とCas7でCas11はSmall Subunitの一つ。
Cas 12a	ゲノム編集用に開発されたCasタンパク質で別名Cpf1。Cas9は二本鎖DNAを垂直に切断するが、Cas12aは、切断面5'突出末端をつくる。Cas9、Cas12bと共にヒトゲノム編集のプラットフォームの一つ。
Cas 12b	ヒトゲノム編集プラットフォームの一つ。Cas9やCas12aより小さいのでアデノ随伴ウイルスなどを用いたウイルスベクターによるヒト細胞へのデリバリー・ツールの可能性。
Cas 13	RNA編集Casタンパク質（Cas13a、C2c2）。Cas13のサブタイプには、Cas13a、Cas13b、Cas13c、Cas13dがある。Cas13bを利用した技術には、A-to-I塩基置換法REPAIR、SHERLOCKがある。

出所：三井物産戦略研究所作成

当レポートに掲載されているあらゆる内容は無断転載・複製を禁じます。当レポートは信頼できると思われる情報ソースから入手した情報・データに基づき作成していますが、当社はその正確性、完全性、信頼性等を保証するものではありません。当レポートは執筆者の見解に基づき作成されたものであり、当社及び三井物産グループの統一した見解を示すものではありません。また、当レポートのご利用により、直接的あるいは間接的な不利益・損害が発生したとしても、当社及び三井物産グループは一切責任を負いません。レポートに掲載された内容は予告なしに変更することがあります。