

第8回 遺伝学を超えて

(1) 遺伝子改変動物モデルの問題

私たち人間のゲノム情報が解読されたのは2000年代の始めでした。当時は莫大な予算と多くの時間を費やしてたった1人のゲノムを読んだのですが、2014年には約1000ドル(~10万円)で1人のゲノムを読めるようになり、個人の遺伝子情報を調べるのが現実的になってきています。

病気の場合、その原因は遺伝的なもの(氏)の場合もあれば、環境的なもの(育ち)の場合もあります。後者の場合には測定することがまだ難しいのですが、遺伝的なものは測れるようになってきたということで、病気の人々の遺伝子を調べようというプロジェクトが、世界中でいくつも行われています。見えてくるだろうことは、ある遺伝子と病気の相関関係(起こりやすさ、おこりにくさの関係)で、おそらくいくつもの候補が見えてくると考えられます。注意しないといけないことは、これは偶然かもしれないということです。研究を進めることで、真にそれが因果関係(原因と結果の関係)にあるならば、病気が起きるメカニズムの解明に一步近づくことができます。また治療薬の開発にも進んでいくことができます。ですから、ヒトの研究でわかってきた相関関係を因果関係に書き直していくということは、とても重要です。

しかし、ヒトの遺伝子を改変して影響を観ることは、倫理的に許されません。また仮に遺伝子の影響を調べられたとして、観察期間はその人の一生分になり時間的な問題もあります。ですから、ヒトの代わりに実験動物の遺伝子を改変して、ヒトの病気「のような」症状がでるか、またその遺伝子を正常なものに戻した時に症状が治るか試すことで、遺伝子と病気の関係を、相関関係から因果関係に置き換える試みがなされています。実は実験動物を使う場合でも、遺伝子を変えるためにはものすごく手間がかかります。実験動物としてハツカネズミ(マウス)を使うことを考えます。もしある遺伝子の重要性を調べようと思ったとして、研究をスタートして結果が分かるまでに最低でも1、2年かかります。一番の原因は、マウスの1世代(生まれて次の子供を産むまで)は約3か月で、遺伝子を変えた動物を作るために、5、6世代もしくはそれ以上、交配して子どもを作らせないといけないからです。

私たちはこの状況を変えようと挑戦してきました。そして発想してから6-7年かかったでしょうか、マウスを交配することなく1世代で、遺伝子を消し去る(ノックアウト)することができる技術を開発することができました(Sunagawa et al., 2016, Cell Rep; Tatsuki et al., Neuron, 2016)。また、遺伝子情報を付け加えたり一部を変更したりする(ノックイン)技術に関して4-5ヶ月でできる方法も開発しました(次世代の遺伝学)(Ode et al., Mol Cell, 2017; Ukai et al., Nat Protocol, 2017)。

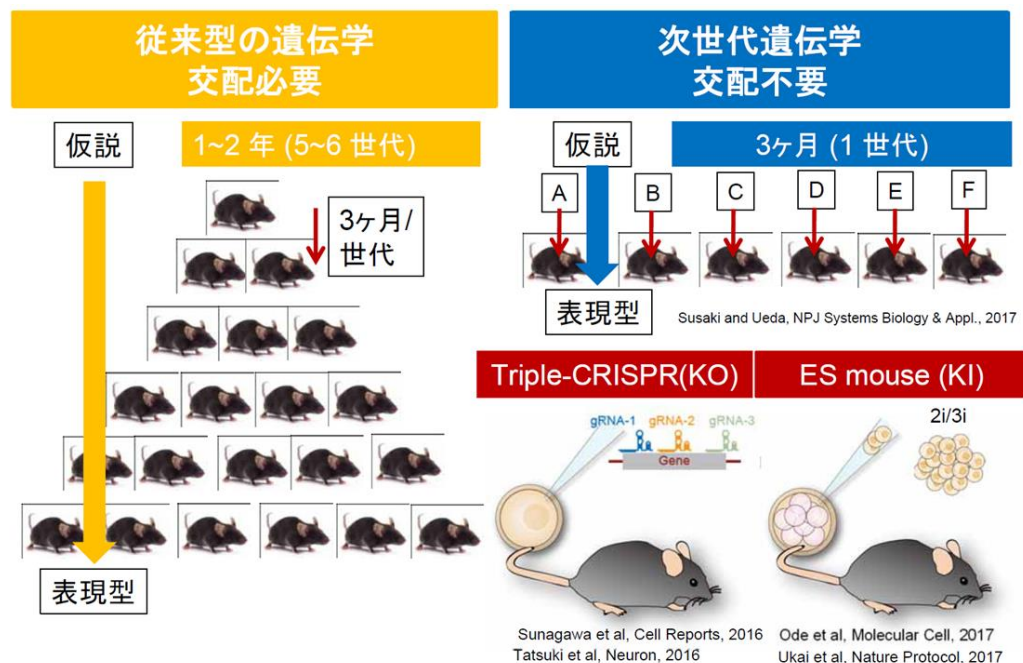


図1. 次世代の遺伝学。交配にかかる時間をスキップすることで、仮説検証にかかる時間を大幅に短縮した。

(2) Triple CRISPR 法 (3つのハサミで遺伝子を切る方法)

2010年代に生命科学に CRISPR/Cas9 法という技術が登場しました。自由自在な「ハサミ」のようなもので狙った遺伝子を切ってしまう、ということが可能なバクテリアの酵素が見つかったのです。研究者は当然この技術を使って遺伝子改変動物を作ることに挑戦したのですが、生まれた時に完全に遺伝子をノックアウトすることは難しかったのでした (Wang et al., 2013, Cell; Mashiko et al., Sci Rep, 2013)。そこで私たちは工夫をして、ハサミ (sgRNA) を1本使うのではなく3本使い、細胞へのダメージを上げないように1つのハサミの量は1/3にしました (元の濃度の1/3に薄めたsgRNAを3種類使いました)。その結果、生まれた動物の95%以上で狙った遺伝子が3つのハサミのどれかで切られるという結果になりました。実は3つのハサミを使った場合、切れ残りが元の50%から10数パーセントまで下がると予想していたのですが、実際には5%以下という結果になり、生まれた動物のほぼ全てで遺伝子が完全に失われました。これは、2つのハサミで切れた場合に修復不可能だったせいだと考えています。いずれにせよ、大変高効率の優れた技術を作ることができたというわけです。こうした3本のハサミのセットは、約80%の遺伝子に関して自動的に設計でき、ほとんどの遺伝子は一度に遺伝子を壊すことができるようになってきました (Triple CRISPR 法)。

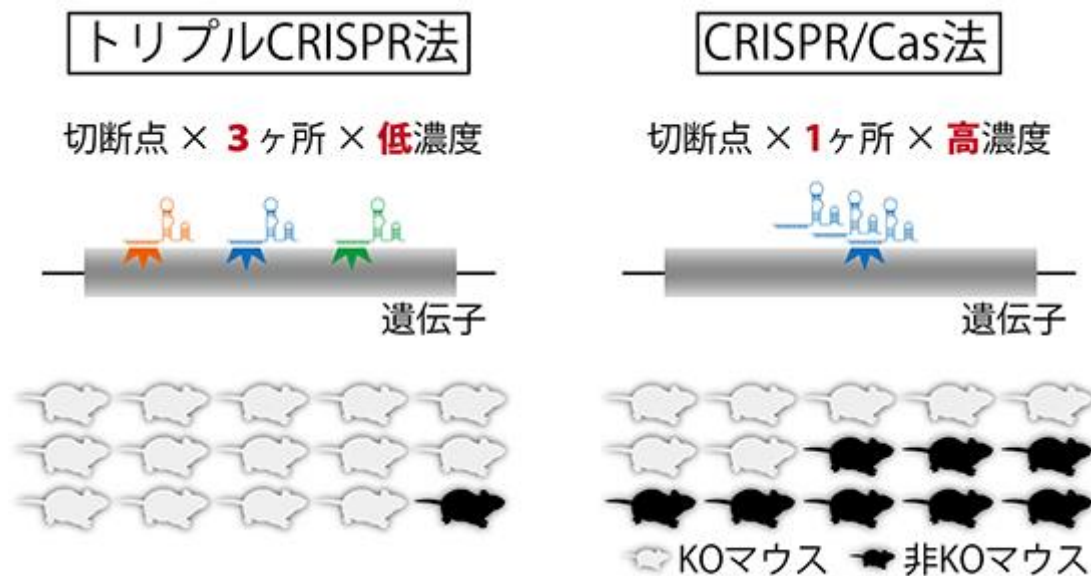


図2. Triple CRISPR 法。1つの遺伝子を破壊するために、3つの「ハサミ」を低濃度で作用させると、生まれてくるほぼ全ての個体が両方の遺伝子が破壊されたノックアウトマウスとなった。理研プレスリリースより転載(*1)。

*1 https://www.riken.jp/press/2016/20160108_1/

1世代で遺伝子ノックアウトマウスを作れるとどうなるかと言うと、毎週ある遺伝子を2個から4個選び、これを壊した時に何が起きるか調べられるようになります。それまで数年で1遺伝子試すくらいだったのが、毎週遺伝子改変を進めれば約3ヶ月後に週2-4個の遺伝子をノックアウトした結果が分かるようになる。つまりスピードにして100倍ぐらい速くなることとなります。また1人の研究者が扱える数も10倍以上になるので、計算上1000倍ぐらいの効率化が達成されることとなります。もう1つ優れた点に、複数の遺伝子を同時にノックアウトできる、ということがあります。進化の過程で、ゲノムの重複(遺伝子セットが倍になること)が何度か起きたと言われていています。その際、1つだった遺伝子は2つに、次いで4つになり、場合によっては一部失われ、結果として元は1つの遺伝子が数個になったと考えられています。こうした「兄弟」遺伝子の場合、どちらか片方だけ壊しても影響はあまり見られないが、両方なくしてやっと遺伝子の機能が見えてくるのがよくあります。例えば時計遺伝子 *period (per)* はショウジョウバエで発見された遺伝子で (Reddy et al, Cell, 1984) その10数年後に哺乳類でも発見されました (Tei et al., Nature, 1997)。しかし実は、哺乳類では3つ (*Per1*, *Per2*, *Per3*) が見つかったたのです。そして哺乳類では、*Per1* と *Per2* を同時に失って初めて概日リズムが見えなくなります。また *Cryptochrome1 (Cry1)*、*Cryptochrome2 (Cry2)* 遺伝子も2つ同時になくして初めて時計の振動が止まります。Triple CRISPR法を使えば、1つの遺伝子を狙うだけでなく、2つの遺伝子を同時に狙うこともできます。実際に Triple CRISPR法を使ってそれぞれ *Per1/Per2* や *Cry1/Cry2* を同時

に壊すと、行動リズムが消失することが分かりました (Sunaagawa et al., Cell Rep, 2016)。

(3) ES マウス

私たちは、短期間に遺伝子を壊す(ノックアウト)だけではなく、短期間に遺伝子を書き変える技術(ノックイン)も開発しました。ノックアウトマウスと同様にノックインマウスでも、今までは動物を交配しないといけなかったのですが、これを交配せずに1世代で作り変えてしまうことができるようになったという話をします。ノックインマウスを作る際には胚性幹細胞(ES細胞)を使います。ES細胞の中で遺伝子を書き換えることはできますが、そのES細胞からマウスを作る際に、完全に遺伝子を変えた動物を作理出すことはとっても難しいのです。

少し難しいのですが、今までのES細胞からマウスを作るやり方を紹介します。まず受精卵の発生を少しだけ進めて64細胞以上にします。そこに遺伝子を変えたES細胞を入れて(インジェクションして)やります。これを、仮親といって子宮を提供してくれる母親マウスの中に戻して、子どもが生まれるのを待ちます。ES細胞は多能性といって全ての細胞に分化する能力を持ちます。ここで黒色のマウスの受精卵と色素の遺伝子を変えて白色にするようにしたES細胞を使えば、受精卵由来の子どもは黒色に、ES細胞由来の組織は白色になります。通常は身体全身が白になるのではなく混ざり物になります。2種類のゲノムをもった細胞が混じった個体ができるので、これを(ギリシャ神話のいろいろな動物の部分を持った怪物から)キメラ動物と呼びます。キメラ動物のままでは、解析を進めてもどう解釈してよいかわかりません。私たちは普通、同じ遺伝子を2つもっています。実は旧来の方法では遺伝子は1つしか改変されないことが多く、次の世代をつくろうとすると相手の遺伝子と半々になってしまうので、1度もしくは2度交配してES細胞由来の遺伝子を1つもしくは2つ持つ動物を作って解析します。

そこでまず、受精卵を非常に早い段階、だいたい受精卵が3回分裂して8細胞になったところで改変したES細胞を入れて、ES細胞が生まれたマウスに寄与する率を上げようとしてきました。また、ES細胞の質を高める(多能性を保つ)ための薬を2、3種類使い、ES細胞が仔マウスになる確率を上げて胎盤になる確率を下げてやりました。受精卵の発生が進むと内側の細胞群は胎仔に外側は胎盤になっていきますが、ES細胞がなるべく胎盤ではなく仔マウスになるような工夫をしました。その結果、生まれてきたマウスのほぼ全身の細胞がES細胞由来のものになり、注入された胚由来の細胞が胎盤になる、という魔法のような技術が、私たちの共同研究者の清成寛先生によって開発されました(ESマウス)(Kiyonari et al., Genesis, 2010)。この技術をもとに育てあげ、生まれてきたマウスの約99.99%の細胞はES細胞由来で受精卵由来の細胞は0.001%以下になることを証明し、遺伝子を自由自在に改変した動物を一度に作る事が可能になってきました(Ukai et al., Nat Protocol, 2017)。私たちはこういう技術を使って、ある時計タンパク質のアミノ酸を変えて、時計の進み方をコントロールできるということを2017年に報告しています(Ode et al., Mol Cell, 2017)。

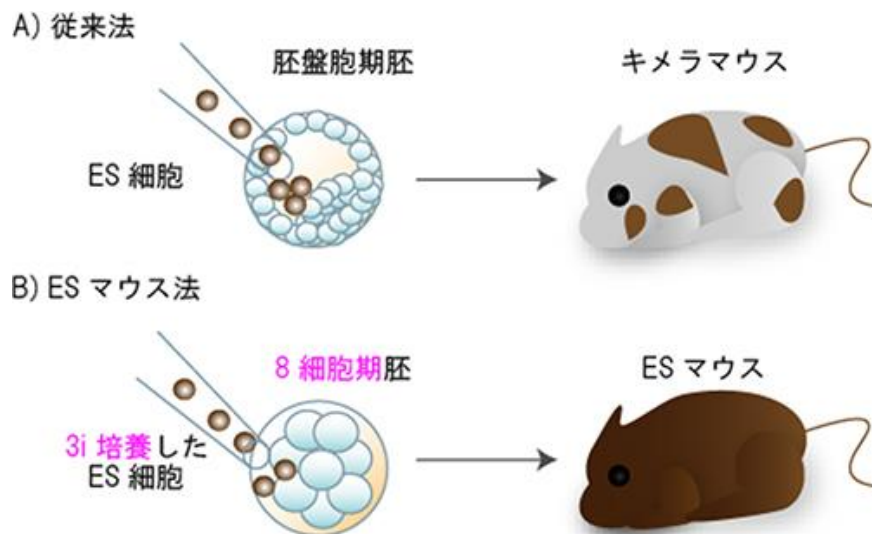


図3. ES マウス。従来法より発生段階の早い初期胚に特殊な培養をした ES 細胞を導入することで、ほぼ 100%ES 細胞由来のマウスが作出できる。理研プレスリリースより転載(* 2)。

* 2 https://www.riken.jp/press/2017/20171117_1/

(4) 一世代で解析する遺伝子改変動物の睡眠解析への応用

実は動物の睡眠測定はなかなか大変です。大人の研究参加者の睡眠を測定するのであれば、「脳波筋電図をつけて寝てください」とお願いすれば良いのですが、動物に装着をお願いするわけにはいかないし、電極をつければつけたでコードに噛み付いたり喰いちぎったりします。そこで、脳に電極を留置する手術をして 10 日間ぐらいダメージから回復するのを待ち、ようやく睡眠を測定できるようになります。脳外科手術をするので、ダメージが残るし、手技が難しく実験者のトレーニングが必要です。実は睡眠データが回収できたとしてもまだ難題が残っていて、とれたデータを「寝ている」「起きている」、さらに寝ている場合を「レム睡眠」と「ノンレム睡眠」とに分類しないとイケないのですが、従来これを熟練した人が目で見えて判断していたので、客観性の問題が有り、単調な作業で時間がかかって大変でした。せっかく遺伝子改変動物が短期間に多種類作れるようになったので、今度は測定を圧倒的に簡単にしようと思立ちました。

そこで手術ではなく非侵襲的な手法を使い、「呼吸」の仕方、寝息で睡眠を測ろうと考えました。マウスをチャンバーの中に入れます。チャンバー(容器)の中でマウスが呼吸する時に胸郭が動きますが、胸が動くと周りの空気が若干押し狭められて微妙な圧変化が起きます。その微妙な変化を圧力センサー(ピエゾセンサー)で計るという仕組みです。動物をチャンバー中で 1-2 週間飼いたいのですが、そのためには大きな空間が欲しい。ところが大きな空間であれば本当に微妙な圧の変化を検出することになってしまう。これをどう解決するかが大問題で、最初は空気の通り道に圧力センサーを置いていたのですが、大気圧ノ

イズがあつてなかなか検出できるレベルの変化がみえない (S/N が十分でない) という状況でした。ある時、たまたま、密閉された小部屋と動物が生活する空間を接続して、その間にセンサーを置きました。その結果、空気の直接の通り道ではないので大気圧ノイズが乗らず、感度もそれほど落ちずに、圧倒的にシグナルノイズ比が改善しました。その結果、呼吸の仕方ですべて寝ているか起きているか (睡眠覚醒) がしっかり分かるようになってきました。マウスが寝ている時は非常にゆっくりとした呼吸、起きている時は非常に激しい息をしていました。また、少しまどろんでまた起きるみたいな非常に繊細な移り変わりも捉えられるようになりました。こういった判断を自動的にすることもできるようになり、ある遺伝子をなくしたり変えたりした場合に、その動物の睡眠がどうなっているかを見られるようになってきました。そこでこれらの技術を組み合わせ、本当に睡眠が変わった遺伝子改変動物が見つけれられるのか検証しました。最初は、時計遺伝子を壊したときに、これまで知られている通り睡眠・覚醒のパターンが失われることを確認しました。次にナルコレプシーという病気の原因遺伝子 (オレキシン、別名ヒポクレチン) を失うと睡眠も覚醒も断片化することが知られていたため、これを壊したマウスを用意して、睡眠・覚醒のパターンを調べてみました。この結果、オレキシン遺伝子を壊したマウスで、これまで知られているのと同様の、覚醒の断片化、睡眠の断片化が起きるのを確認できました (Sunaagawa et al., Cell Rep, 2016)。

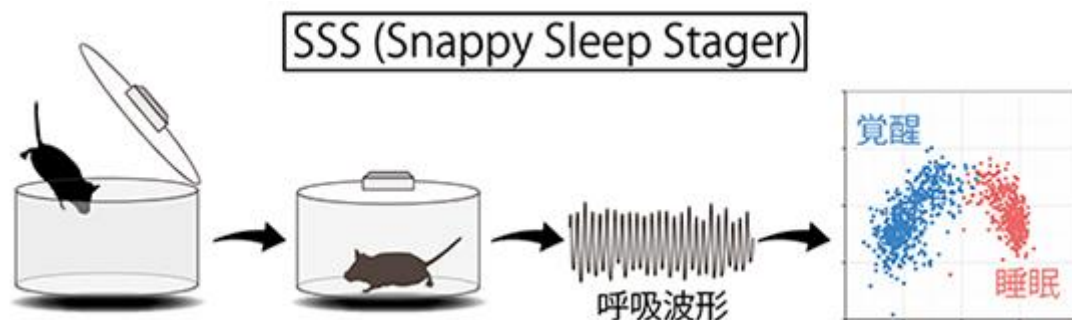


図4. SSS (Snappy Sleep Stager)によるマウスの睡眠解析。マウスの睡眠・覚醒を非侵襲に、呼吸パターンでとらえ、全自動で解析する方法を開発した。理研プレスリリースより転載 (* 3)。

* 1 https://www.riken.jp/press/2016/20160108_1/

(5) 睡眠を測ると見えてくること

今私たちは睡眠・覚醒を 8 秒ごとに時系列を追って (時間経過を追って) 記録しています。そうすると、1 日 24 時間の中でどのくらい寝たていたか (睡眠時間)、どのくらい起きていたか (覚醒時間)、また睡眠から覚醒に移る確率や覚醒から睡眠に移る確率、こういったものも捉えられるようになります。人間の場合、睡眠から覚醒に移り変わる確率、覚醒から睡眠に移り変わる確率、これはどちらも 1 日にそれこそ 1 回ずつぐらいしか起きないので大きな意味は見い出せないかもしれません。しかし、動物は頻繁に数分ごとに睡眠と覚醒の状態を行ったり来たりしますので、重要な指標になります。人間では脳波を使って「睡眠

の深さ」を測りますが、動物では寝たり起きたりする様子を観察すれば、睡眠がどのくらい深いのか、覚醒がどのくらい強いのか、そういったことを推し量ることができそうです。こういう睡眠と覚醒の間の移り変わりを「遷移確率」と言います。同じ睡眠時間でも、遷移確率が低ければ一旦状態が変わるとずっと睡眠や覚醒を続け、遷移確率が高ければ、睡眠や覚醒が頻繁に移り変わる、ということを示しています。