

アトモスフィア

夢のような技術革命

森 和 俊*

私が大学院生だった頃（1981-1985）には夢であった技術が今ではごく当たり前に使われ、私もその恩恵を受けている。ノックアウトマウスは1989年に初めて作出され、私も遅ればせながらATF6 α/β のノックアウトマウスを作出し、培養細胞のノックダウン法では得られていなかった表現型を2007年に報告した。下村博士が発見されたオワンクラゲのGFPが1994年に線虫内で蛍光を発することが示されて以来、細胞が生きたままタンパク質を可視化できるようになった。私もメダカを使ったライブイメージングを用いて、生理的に発生する小胞体ストレスの原因タンパク質を初めて同定して本年報告した。地方大学の助手だった頃（1985-1989）、あるタンパク質の精製にひたすら励んで、やっと自動アミノ酸シーケンサーを用いて5アミノ酸程度を決定でき、そのタンパク質を同定することができたが、今や質量分析機器の精度の飛躍的向上とデータベースの整備により、試料をSDS電気泳動して銀染色し、バンドとして見ればほぼ同定に成功したようなものである。私もこの技術により同定したタンパク質を2011年に報告した。この技術の凄いところは、自動アミノ酸シーケンサーの場合純品に近くなければ解析が困難であるのに対し、質量分析の場合には混合物であってもこれとこれの混合物ですよと答えが返ってくることである。隔世の間がある。

最近、我々はまた夢のような革命的新技術を手に入れた。TALEN法によるゲノム編集革命である（ZFN法とCRISPR法を加えて3強時代と呼ばれ、自分の実験に最適な手法を選択するのが賢明のようだ）。上述のように、我々の分野ではノックダウンでは思うような表現型がでず、さりとてノックアウトマウスの解析には膨大な時間と費用がかかるため、マウス以外でノックアウトできる生物としてメダカとニワトリDT40細胞に着目して5~6年前に解析を始めた。この頃、ヒトの培養細胞を用いてゲノムを改変できる時代がすぐやってくるなんて全く想像できなかった。

TALEN法も海外からの輸入技術であるが、広島大学の山本卓教授のご尽力によりそれほどラグなしに国内で急速に普及し始めている。ゲノム上の改変したい場所を切断できる制限酵素を簡便に自作でき、実際にその制限酵素が高い確率で思ったように働くのである。この新技術により、メダカのノックアウト作出は本当に楽になった。以前のTILLING法では、最低でも6,000PCR反応を行わなければならなかったし、あちこちに変異が導入されているので、戻し交配にとっても時間がかかったが、それからすると、TALEN法ではうまくいく時にはあっという間にノックアウトがとれる（実際の解析開始は半年後になるが）。肉体労働量も多くないので、院生にこれもあれもノックアウトしてと頼みやすくなった。現在試みているノックインがうまくいくなれば、本当に自由にメダカのゲノム編集ができる。私の夢プロジェクトが複数進行中である。さらに最近、TALEN法をヒトの培養細胞に用いてみると、思ったようにゲノムが切断され高い確率でノックアウトが取れるのである。本当に時代が変わったと実感している。

TALEs (transcription activator-like effectors) は植物病原細菌キサントモナス属がもつタンパク質で、34アミノ酸からなるモジュールが繰り返されており、1モジュールが1塩基を認識する。しかも、12番目と13番目のアミノ酸を置換すればG, A, T, Cの認識特異性が変わるのである。この特徴を利用すれば、自分が狙っているゲノム領域を特異的に認識する17個くらいの連結モジュールを設計するのは容易である。TALEsにFokIというendonucleaseを融合させ（合わせてTALEN）、ゲノムの5'側と3'側をTALEsにより適当なスペーサーを挟んで特異的に認識させれば、2量体となったFokIがゲノムを切断し、フレームシフトが起こったりノックインが起こったりしてゲノムが見事に改変されるのである。

TALEsの上述の特性を明らかにしたグループは、最初からゲノム編集応用を目指していたわけではない。キサントモナス属がなぜ350種もの植物の病原細菌となるのかわりたくて研究した結果、1モジュールが1塩基を認識することを見だし、亜鉛フィンガードメインが3塩基を認識するZFN法よりも遙かに特異性が高いDNA結合タンパク質を簡便に設計できることに気づいたのである。これぞまさにボトムアップ的な研究の成果と言えるのではないだろうか。ころころ変わるトップダウン的な研究費ばかりが増えていく我が国の現状を憂えているのは私だけではない。

*京都大学大学院理学研究科