

生命科学の未来を切り拓く「はさみ」

近年、生命の設計図である遺伝情報(ゲノムDNAの塩基配列)を書き換える

「ゲノム編集」技術が注目されている。

微生物のもつCas9タンパク質(DNA切断酵素)の発見により

効率的なゲノム編集が可能になり、医学・生命科学研究に革命がもたらされた。

ゲノム編集技術は、品種改良や遺伝子治療などへの応用も期待されている。

2015年、Cas9とは異なる特徴をもつDNA切断酵素Cpf1が発見され、

新たなゲノム編集ツールとして注目を浴びている。

今回、我々はCpf1-ガイドRNA-標的DNAからなる複合体の結晶構造を決定し、

そのDNA切断機構の解明に成功した。

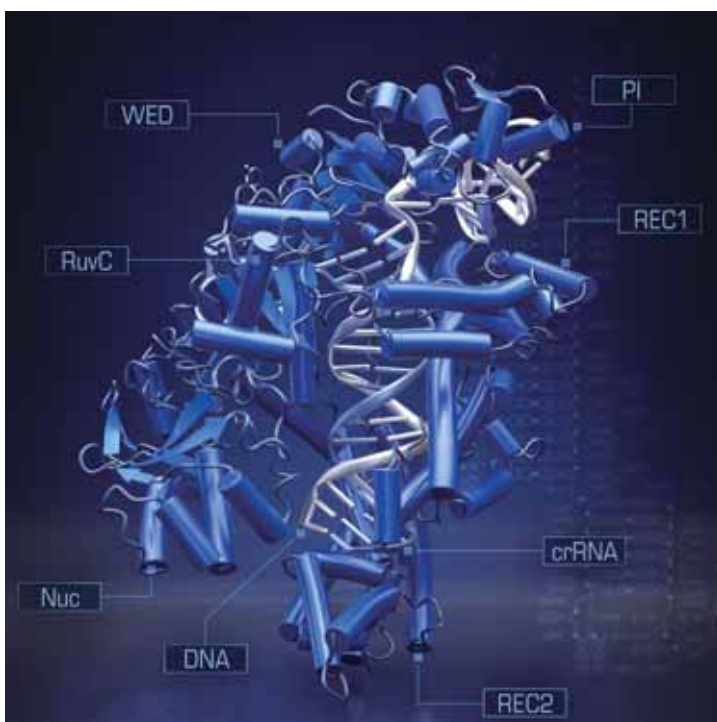
原核生物はCRISPR-Cas系とよばれる免疫機構をもち、ファージなどによる感染から自身を保護している。Cas9はII型のCRISPR-Cas系にかかわるタンパク質であり、ガイドRNAと複合体を形成し、ガイドRNAの一部(ガイド配列)と相補的な二本鎖DNAを特異的に切断する。したがって、ガイド配列(約20塩基)を変更することにより、ゲノムDNAの任意の標的配列を選択的に切断・改変することが可能である。2013年、Cas9を応用したゲノム編集の成功例が報告され、Cas9は効率的なゲノム編集ツールとして広く利用されている。生命科学研究の現場においてCas9を用いた遺伝子ノックアウト技術は欠かせない存在となっており、さらに、ゲノム編集によりマウスの筋ジストロフィーが回復したという遺伝子治療の成功例も報告されている。

2015年、V型のCRISPR-Cas系に関与する新規のDNA切断酵素Cpf1が発見された。Cpf1はCas9と異なる特徴をいくつかもつ。まず、Cas9は2種類のガイドRNAを必要とする一方、Cpf1は1種類のガイドRNAのみを必要とする。さらに、切断後のDNAの「切り口」も異なる。Cas9は両方のDNA鎖がそろった平滑末端を作るのに対し、Cpf1は片方のDNA鎖が突出した突出末端を作る。2014年にCas9の立体構造が解明されていたが⁵(Nishimasu *et al.*, Cell 2014; Anders *et al.*, Nature 2014), Cpf1の立体構造は不明であり、その作動機構は謎に包まれていた。

Cpf1によるDNA切断機構の解明を目指し、我々はCpf1のX線結晶構造解析に着手した。細菌*Acidaminococcus sp.*に由来するCpf1タンパク質とガイドRNAおよび標的DNAからなる複合体を精製、結晶化し、大型放射光施設SPring-8およびSwiss Light SourceにおいてX線回折データを測定し、複合体の結晶構造を決定した。その結果、Cpf1はCas9とは大きく異なる立体構造をもつことが明らかとなり、両者のあいだの機能的な違いを原子レベルで説明することができた。特に、標的DNAを切断する「はさみ」としてはたらく部分の構造と配置が大きく異なっていた。この違いはCpf1とCas9によるDNAの「切り口」の違いとよく一致していた。今回の研究成果は、Cpf1を改変した強力な新規の研究ツールの開発につながることも期待される。

本研究は、Yamano *et al.*, Cell 165 (2016)に掲載された。

(2016年4月22日プレスリリース)

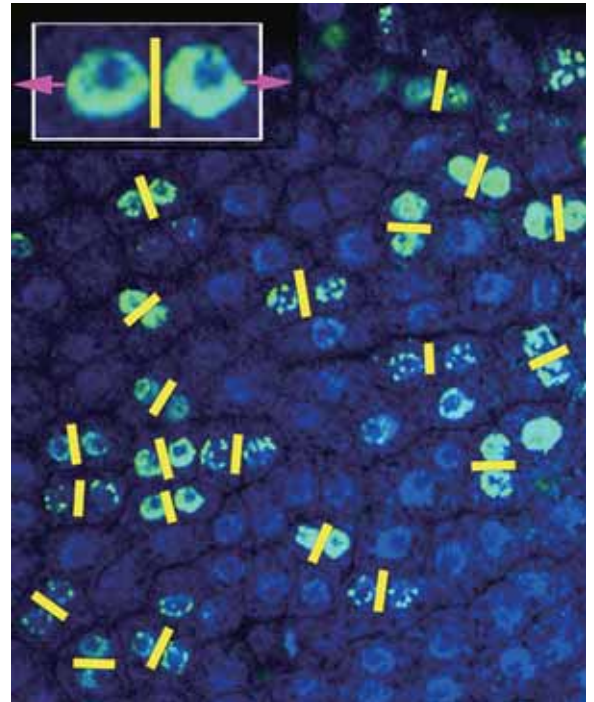


Cpf1-ガイドRNA-標的DNA複合体の結晶構造。原子座標に基づくコンピューターグラフィックを示した。ガイドRNA(crRNA)と標的DNAが形成する二重らせんがCpf1により認識されていることがわかる。

CASE 2

細胞分裂の挙動を見る
ちよつとした工夫で

細胞分裂がどの角度にどのようになされるのかは、多細胞生物の体作りの理解にとって、古くから重要なポイントとされてきたが、分子遺伝学の知見が豊富となった今でも、その様相はまだよく分かっていない。その難しさは、組織中での各細胞分裂のタイミングも、分裂の角度も予め予測できないところにある。今回私たちは、その細胞分裂の挙動を容易に短時間でモニターする方法を開発し、植物の葉で実際に使えることを示した。この方法は応用範囲が広く、今後、動植物を問わず利用されると期待される。



多細胞生物の体では、あちこちで細胞分裂がおきている。この細胞分裂は、でたらめではない。決まった形とサイズの器官、組織、そして体を作るためには、細胞分裂の角度と頻度は、ある決まった範囲に収まっている必要があるからだ。

しかしそうかといって、縦の次は横、横の次は斜め、のような決まった順番で細胞分裂がなされるのかといえば、これもそうではない。受精卵の卵割のようなごく初期段階での分裂や、特定の組織における分裂ではそういう事例も見られるが、たいがいの組織内の細胞分裂は、それほど決まり切った順番と角度でなされていないのである。

となると、その挙動やその仕組みを知りたくなるが、各細胞が一見ランダムに分裂しているため、その方向を一つ一つ確かめるのも大変な作業になる。しかも細胞ごとに分裂するタイミングがまちまちのため、全体のように知るのも一苦労だ。これまで、いろいろな研究者がいろいろなトリックを使って解析してきたが、その技法はいずれも時間がかかったり、遺伝子組み換えを必要としたりと、汎用性が乏しいものであった。

いっぽう、私たちは葉の形態形成の仕組みを知る目的で、少し以前から、生物が間違っただけでDNAに組み込んでしまう性質のある化合物EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) を使って、葉の発生途上での細胞分裂頻度を確かめてきた。チミジンのアナログであるEdUはDNAに取り込まれた後も安定であるため、その官能基を利用することで、EdUを保有する細胞核を蛍光標識することができ

る。しかし単純にこれを取り込ませるだけでは、組織が輝く細胞核で満天の星のようになってしまい、空間的な分裂活性の疎密は分かるものの、個々の細胞の挙動までは分からない。

そのうちにふと思いついたのが、EdUを短時間だけ与えれば(パルス投与と言う)、パルスの間にDNA合成した細胞だけが標識され、しかもそのあとEdUなしの状態でも適当時間待てば(チェイスと言う)、分裂して2つに割れた核の対が選択的に検出できるだろうというトリックである。やってみると、これは期待通りで、2つづつ並んだ核が、組織の中にきれいに検出されたのだ。これで、核の対から容易に細胞分裂の角度が分かるようになった。

その後、実験条件を検討して最適化した結果、シロイヌナズナの葉の発達中に、どの部分でどのように細胞分裂の角度が制御されているか明らかになった。この方法の応用範囲は広く、植物でも動物でも何にでも使える。簡便で時間も短時間で済むため、今後、利用実例が増えてくるものと期待している。本研究は、Yin and Tsukaya (2016) *New Phytologist*, 211, (4) に掲載された。

新手法で見たシロイヌナズナの葉の原基。2つ並んで緑に光っているのは、1つの細胞核から分裂してできた娘核のセット。核の間の短い補助線は、それぞれのセットの境界面を示す。この境界面を見ることで、分裂の方向が一目瞭然と分かる。背景で薄く青く染まっているのは、この間に分裂をしなかった細胞の核。左上の拡大図は、2つの娘核とその境界線(短い線)、そして分裂した方向(矢印)を示す。Yin and Tsukaya (2016) より改変。

(2016年5月16日プレスリリース)

CASE 3

単結晶ハードフェライト棒磁石

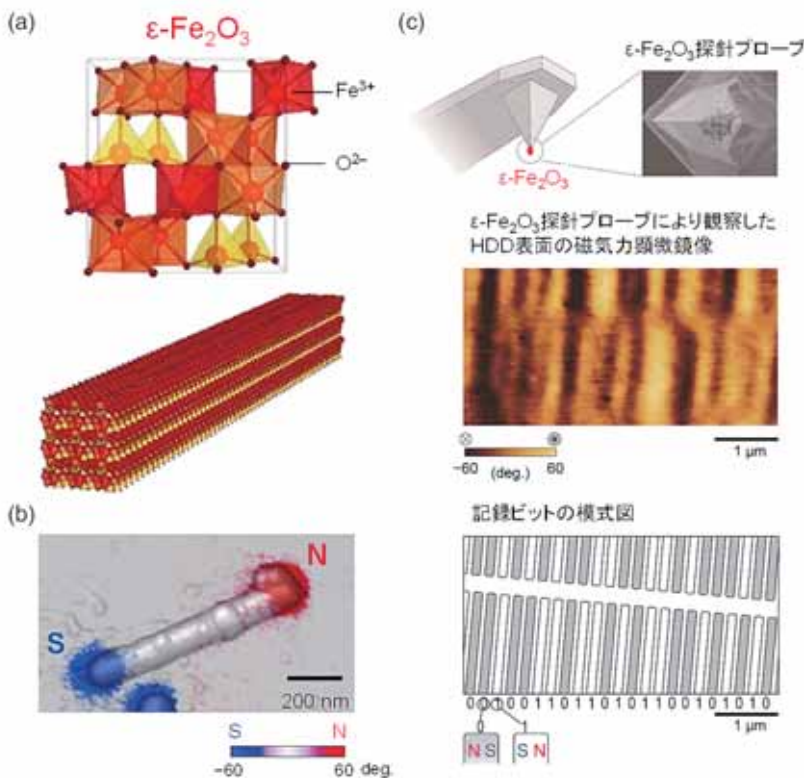
イプシロン型-酸化鉄($\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$)ナノ磁性体を、
 ミクロンサイズまで結晶成長させた単結晶フェライト棒磁石では、
 一対のN極とS極からなる単磁区構造をとることが分かった。
 このフェライト棒磁石は、大きな磁場をかけても磁気が失われず、
 また絶縁体であり、
 化学的にも耐久性が優れて錆びることのない、
 単なる酸化鉄からできた棒磁石である。
 このフェライト磁石は、
 磁性材料の表面を観察できる磁気力顕微鏡の探針プローブや、
 高速無線通信用の高周波ミリ波吸収材料としての応用が期待される。

酸化鉄からできたフェライト磁石は、古来より
 広く用いられてきており、現在では、自動車用品
 部品、モータ、磁性流体などの産業用途から、玩具、
 工芸品などの日常生活にも使われている。一般
 に知られている棒型形状をしたフェライト棒磁石
 は、磁性粉を固めて加熱成形した後、磁場を印加
 して製造するため、粒界や欠陥が多く、磁壁で囲
 まれた磁区の磁極がいろいろな方向を向いた多磁
 区構造をとっており、N極とS極が一対だけ存在
 する単磁区構造を作れないという課題があった。

今回私たちは、大きな保磁力*を有するイプシロ
 ン型-酸化鉄($\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$)と呼ばれる物質の単結晶
 のフェライト棒磁石を合成することにより、単磁
 区構造を有する、数百ナノメートルから1ミクロ
 ン程度のサイズの単結晶フェライト棒磁石を開発
 した。この $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ フェライト棒磁石は、外部か
 ら強い磁場が印加されても磁極が反転しにくく、
 その保磁力は、25キロエルンステッド(kOe)と市
 販のフェライト永久磁石(3~5kOe)と比べて極
 めて高い。また、絶縁体であるため電流も流れず、
 化学的にも安定で錆びることがない。このような
 $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ フェライト棒磁石の特徴を活かして、磁
 石表面を観察できる磁気力顕微鏡の探針プローブ
 の開発を行い、市販のハードディスク表面の磁気
 記録ビットを観察した。この $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ フェライト
 磁気力顕微鏡は、これまで測定が困難であった強
 力な磁石の表面や、強磁場下での観察が可能にな
 ると期待されている。また、電磁波吸収測定を行っ
 た結果、181ギガヘルツ(GHz)という極めて高い
 周波数のミリ波を吸収することが明らかになり、
 $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ フェライトフィルムの開発も行った。
 $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ フェライトは、ビッグデータ時代に向け
 た高密度磁気記録用部材として期待されているほ
 か、超高速無線通信用の高周波ミリ波吸収部材と
 して、IoT(Internet of Things)社会に貢献する新素材
 としても脚光を浴びており、2016年7月より英国
 立ロンドン科学博物館にて特別展示されている。

本研究は、S. Ohkoshi *et al.*, *Scientific Reports*, 6, 27212(2016)に掲載された。

(2016年6月7日プレスリリース)



(a) $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ の結晶構造。八面体は FeO_6 、四面体は FeO_4 。(下図)結晶のa軸方向に成長した $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 。(b)原子間力顕微鏡像(白黒)と磁気力顕微鏡像(赤青)を重ね合わせた像。(c)開発した $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 探針プローブの模式図と先端部の走査型電子顕微鏡像(上図)。 $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 探針プローブを用いた市販のHDDのデモ観察では、磁気力顕微鏡像が得られ(中図)、磁気記録ビット(下図)が観測された。

*保磁力とは、磁極を反転させるために必要な外部磁場の大きさである。私たちは2004年に $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ がフェライト磁石として最大の保磁力を示すことを初めて見出した。