〔ミニレビュー〕

ポストゲノムシーケンスの現状と将来展望

山村 研一

熊本大学発生医学研究センター 熊本市九品寺 4-24-1 (〒862-0976)

Current status and future perspective of post genomic sequence

Ken-ichi Yamamura

Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University,
Kuhonji 4-24-1, Kumamoto 862-0976, Japan

1. はじめに

20世紀は、物理学や化学の時代であったが、21世紀は生物学あるいは生命化学の時代であると考えられている。時を同じくして、ヒトゲノムの構造解析がほぼ終了、ヒトゲノムの機能解析の時代に突入している。ゲノム機能解析と同時に、当面は、ゲノム創薬やヒト疾患への応用が焦点となり、テーラーメイド医療の実施が現実問題となる。これらは、いかにもゲノム解析から新しく成立した概念かのように受け止められているが、実際は古典遺伝学の時代からすでに予測されていたことであり、したがって、今後の主役は分子生物学から遺伝学へと移りつつある。そのような状況とそれを推進するための方法論に着いてを概説したい。

2. ゲノム研究の位置付け

ゲノム研究は、典型的なサーチ研究であり、リサーチ研究ではない。サーチ研究とは、リサーチのためのリソースの探索を行うもので、したがって、本来その研究は大規模かつ網羅的である必要がある。また、これが国家的事業で行われるのであれば、それらの成果を共有するという思想が必要である。このように、サーチ研究への大型資本の投下に対する理解が不可欠であるが、我が国では必ずしもサーチ研究に対する理解が得られているとは言えず、リサーチとの区別も曖昧なまま実行されている。

3. 日本において欠如している思想

サーチ研究に対する理解が不足していることすでに述べたが、このサーチ研究の実施においては特に研究組織のあり方が問題となる。サーチ研究を戦争に例えると分かりやすい。戦争においては、実戦部隊はもちろんのこと、その実戦部隊を支える後方支援部隊が必

要である。つまり、武器弾薬、食料等の補給が必要であり、これはテクニシャンや技術者が相当する。日本では、誰もが研究者であり、その結果、2流、3流の研究者が多数を構成することとなる。一方、テクニシャンや技術者を雇用する体制になっておらず、研究者が同時にテクニシャンを兼ねることになっている。第2次大戦時の、食料の現地調達方式は、まさに我が国の後方支援の思想のなさを露呈しており、これが現代にもそのまま受け継がれている。

4. ゲノム解析における各国の思想

米国の思想は、常にフロントランナー型であり、他国を量的に凌駕するという思想でゲノム解析を押し進めた。したがって、その評価基準は、決定した塩基配列の数である。きちんとやることにより、それに応じた研究費が配分される。ヨーロッパでは、米国ほどの経済力はないので、独自路線型をとる。つまり、まける分野には投資せず、特徴を活かした方法を展開する。一方、我が国では、遅れている分野に投資し、そのため少しでも効率化をはかるため、配列決定よりも、遺伝子の発見にこだわることとなる。遅れている分野に投資するという姿勢は、IT分野でも顕著であり、別の観点からいえば、安全だからである。つまり、すでにフロントランナーがおり、そこまでは到達できるという目標があるからである。この方法論では、2番手にはなりえても、勝つことはできない。

5. ゲノム機能の意味とその方法論

ゲノム機能解析の時代に突入という言葉を使ったが、実際には遺伝子機能解析というべきであろう。ゲノム上の遺伝子部分は約5%に過ぎず、残りは反復配列が多いものの、その機能は全く不明である。この部

分の機能解析には新たな方法論が必要である。また、遺伝子機能といっても、直接作用と間接作用がある。例えば、ある遺伝子産物が転写因子であるとして、DNAに結合することは直接作用である。その結果、A遺伝子の発現、そのA遺伝子が発現したX細胞の増殖分化、個体レベルでのX細胞の増加というものが間接作用であり、これらがすべて遺伝子機能に含まれる。

したがって、遺伝子機能解析系として、cDNAの単離と構造解析、cDNAからの蛋白の産生と抗体作製とうがあげられているが、これらの方法論では、遺伝子機能のごく一部しか推定できないことは明白である。遺伝子は、複数の機能ドメインを持つが、すべての機能ドメインが知られているわけではなく、また機能ドメインの内どれが主たる役割を果たしているかは構造だけでは推定できない。良くいわれるように、例えばRb遺伝子は、多くの組織で発現しているが、それが破壊された時に以上が生じるのは腎臓だけであり、それがなぜかは今持って不明である。したがって、遺伝子機能の物的証拠を得るには、個体を用いた解析系が必要となる。動物の中でも、マウスはほ乳類であること、多数の近交系が存在し解析が容易であること、飼育が容易であること、胚操作ができ遺伝子導入や遺伝子破壊マウスが作製できることから、もっとも注目されているといえる。

6. 遺伝子研究の限界

遺伝学の伝統的な研究の進め方は、表現型から出発してそれを支配する遺伝子の解析へと向かうものであり、順遺伝学といわれる。これによる典型的な研究の進め方は、遺伝病の家系の集積、リンケージスタディーによる原因遺伝子座のマッピング、ポジショナルクローニングによる原因遺伝子の単離解析、そして患者における突然変異の同定と原因遺伝子の確定である。このような典型例の一つが、頭顔面症候群の研究であろう。Jackson-Weiss症候群、achondroplasia、Apert症候群、Pfeiffer症候群、Crouzon症候群等は頭部と顔面に頭蓋骨癒合、両眼間離開といった共通の症状はあるものの、それぞれに特徴的な症状、たとえばApert症候群やPfeiffer症候群では合指症があるが、Crouzon症候群では眼球突出といった臨床的には区別しうる形態的異常を呈する。これらの疾患の原因遺伝子座が連関解析によって、achondroplasiaでは4p16、Crouzon症候群とJackson-Weiss症候群が10q25-26、Pfeiffer症候群が8cenと10q25-26、Apert症候群が10q25-26に同定された。一方、線維芽細胞増殖因子リ

セプター (FGFR) ファミリーの遺伝子座が、FGFR 1型が8cen、FGFR 2型が10q25-26、FGFR 3型が4p16にあることがわかった。すなわち、これらの症候群の遺伝子座とFGFRファミリーの遺伝子が一致していたのである。そこで、それぞれの症候群の患者のFGFR遺伝子が解析された結果、突然変異が発見された。ここまでは、頭顔面の形態形成にはFGFRが必要で、それぞれが一部特異的に機能しており、必ずしもお互いの機能を保証できないので、欠損状態になれば形態異常を呈すると理解できる。ところが驚いたことに、たとえばPfeiffer症候群とCrouzon症候群の両方で、FGFR 2型の342番目のシステインのアルギニンへの変異が発見されたのである。このことは、遺伝子がわかっていても病気は説明できないことを如実に示している。これに関する論説がNature Genetics (Mulvihill, J. J. 1995)に掲載されている。この文章は「ヒトゲノムプロジェクトは、ついに分子遺伝学者を仕事から追いだし、蛋白生化学者や臨床遺伝学者を雇う時代になった」という書き出しで始まっており興味深い。

一方、組換えDNA技術の発展とそれを背景とした分子生物学の台頭で、まず遺伝子ありきで、その遺伝子がどのような表現型に関与するのかを解析する逆遺伝学が発展した。ゲノムプロジェクトはこの最たるものであり、まず遺伝子ありきから始まる。この研究方法論の限界はもちろんある。例えば、Cbfa1 (Core binding factor alpha 1) はリンパ球で働く遺伝子の転写因子として同定されたが、その破壊マウスを作製してみると骨形成が全くみられず、骨形成のマスター遺伝子と判明した (Ducyら、1997 ; Komoriら、1997)。これは遺伝子の構造だけでは機能は十分推定できないことを明瞭に示している。つまり、これまで種々の実験の積み重ねで、特定の塩基配列 (モチーフ) が、例えばDNA結合能があると決められた部分については、当然機能は推定できるが、それ以外の部分については無力であるということである。つまり、逆遺伝学の手法においても限界があることを示唆している。遺伝子とその産物だけの情報から、ゲノム創薬を行う危険性もここにあるといってよい。つまり予期せぬ副作用が生じることは当然の帰結であろう。

7. ミュータジェネシス

上記2つの例は、ヒトゲノムの構造解析から機能解析の時代に入ったこと、さらには、今後ヒト疾患の発症過程の解析が重要課題となること、これらの解析のためのシステムが必要であることを示唆している。その

方法論の一つとして提案したいのが、マウスミュタジェネシスである。既述したように、全長cDNAの解析、DNAチップ、タンパクに対する抗体等いずれも重要ではあるが、これらから得れる情報は機能に関する状況証拠にすぎないことが多い。本当の機能を確定する物的証拠を得るためには、遺伝子が破壊されたマウスを作製し解析することが必要である。ではどのような方法が考えうるのかということである。これまでES細胞を用いた相同組換えによる「個々の」遺伝子破壊マウス作製は大きな威力を発揮し、その機能解析のための「戦術」として用いられてきた。しかし、この方法では、膨大なコストと労力と時間が必要であるという欠点がある。例えば、1系統の破壊マウス樹立には最低500万円かかるとしても、10万個の遺伝子については5,000億円必要である。それも、1種類の変異しか導入できない。また、この方法による律速段階はES細胞を用いた相同組換えであり、遺伝子破壊ESクローンの樹立には経験のある研究者が行なっても最低3カ月必要である。したがって、1年間に4クローンしか単離できず、これだと25,000人×年必要となる。現在、世界中で作製されている遺伝子破壊マウスの数がいくら多くても1年間約1,000系統であり、これだと100年かかることになり、22世紀に突入してしまう。このように、ES細胞を用いた相同組換えによる方法は現実的でないことになる。そこで、ランダムに大規模に突然変異マウスを作製し、ゲノム全体の機能の解明やヒト疾患モデルマウスの作製を「網羅的」に行なう構想が浮上した。つまり、マウス変異体作製がこれまでの「戦術」から「戦略」目標となったのである。そのための手段として世界的に注目を浴び行なわれているのが、マウスにおける飽和突然変異体作製である。これは、10万個と推定される遺伝子すべてについて、ランダムな方法で網羅的に変異体を作製する計画である。これには変異原物質、主にエチルニトロソウレアによる方法と遺伝子トラップによる方法とがあげられている。エチルニトロソウレア法では、雄マウスに投与すると精原細胞に突然変異が生じるので、その雄マウスと雌マウスを交配することにより、簡単に変異マウス系統が樹立できる。1つの精子のゲノム上にランダムに50～100個所に変異が生じるため、1遺伝子座位あたり1/1,000の頻度で変異が入る(Russellら、1979)。簡単にいえば、1,000系統を樹立すれば、その中の一つは興味のある遺伝子の変異が生じているということである。しかしながら、表現型が出現したマウスについて交配を行ない、遺伝的なもの、この場合は

優性遺伝を示すものは約1%であり、数をこなすのは容易ではないということである。また、変異が生じた遺伝子を同定単離するためには、リンケージ解析とそれに続くポジショナルクローニングが必要で、現時点でこれもそれほど容易ではない。一方、遺伝子トラップ法は、トラップベクターのES細胞ゲノム上へのランダムな組み込みと定義される。このとき、マウス内在性遺伝子に組み込まれたときにベクター内のレポーター遺伝子が発現するようにデザインしてあるので、トラップクローンは簡単に選別できる。遺伝子トラップにより多くの場合マウス内在性遺伝子は破壊される。したがって、トラップES細胞によるキメラマウス作製を通して遺伝子破壊マウス系統を樹立できるが、それなりの技術が必要である。しかし、トラップした遺伝子の単離は容易で簡単に同定することができる。このように、変異原物質法と遺伝子トラップ法は互いに相補的であり、両者を同時に進めるべきであろう。これまで遺伝子トラップ法では小さな変異が導入できないという欠点があったが、変異型loxの利用により、一旦トラップした後に変異lox部位に、自在に遺伝子を挿入する方法を開発した(Arakiら、1999)。この方法では、最初にプロモーター直下へのトラップを行ない、完全破壊クローンを得ておけば、後でそのプロモーター直下にあらゆる遺伝子を挿入できる。したがって、10万個のトラップクローンをとれば、遺伝子の機能解析が詳細に行なえるばかりでなく、マウスの遺伝子をヒト遺伝子で置き換えることも可能で、モデルマウスの作製も容易になった。

8. ES細胞と発生医学

ゲノム機能解析で、今後大いなる発展を遂げると思われるのが、発生分化の領域であろう。それは、試験官内で発生再生させた組織や臓器を移植医療に用いることができるからである。この中でもっとも注目されているのが、ES細胞と言ってよいであろう。

ES細胞は、日本語では胚性幹細胞と呼ぶが、2つの意味で注目を集めている。第1は、前述のゲノム機能解析時代の立場からであり、ミュタジェネシスにおける活用で注目されている。第2は、発生・再生医学からの移植医療の立場からである。

我が国でも脳死をヒトの死として認められたことから、脳死判定と、それに続く臓器移植が大きな注目を集めている。欧米では、個人が確立されており、本人の意思次第で臓器提供が可能であるが、日本では家族の同意を必要としているため、日常に行なわれている

わけではなく、いまだに海外へ救いの手を求めることもある。このような状況の中、1998年にヒト胚盤胞および流産した胎児由来のヒト始原生殖細胞からあらゆる細胞に分化しうるとされるヒトES細胞の樹立の報告がなされ注目を浴びている。マウスES細胞を用いた研究では、血液細胞、神経細胞、心筋細胞等の特定の細胞への分化誘導が可能となっており、ヒトES細胞を用いた分化誘導の実験が注目されている。ES細胞が他の胚とキメラになることにより、生殖細胞も含めあらゆる細胞に分化できること、即ち全能性を持つことが示されている。ここでいう全能性とは、キメラにすればという条件付きであることを認識しておく必要があるが、このこと自体は古くから知られており、それほどインパクトはない。しかし、最近になって、*in vitro*でES細胞が種々の細胞に分化誘導できるという報告が相次ぎ、それゆえに医療への応用という観点から強烈なインパクトを与えた。21世紀は、移植医療が中心になり、細胞、組織、臓器を用いての治療が可能になると予測されている。これまでは、免疫応答による拒絶反応があるがゆえに、移植は限られたものとなっていた。しかし、ES細胞を利用することにより、自分の細胞、組織、臓器が再生できるとなれば、その問題は解決される。したがって、ES細胞の登場により、移植も含めた発生医学や再生医学が脚光を浴び始めたといえる。この技術と、核移植技術を組みあわせれば、自分と同じDNAを持つES細胞が樹立でき、将来的にはそのES細胞を用いて試験管内で自己の組織・臓器形成が可能になると思われ、移植医療への応

用がフィクションではなく現実問題となった。これにより、薬中心の医療が21世紀には大きく変わろうとしている。

文 献

- Araki, K., Imaizumi, T., Sekimoto, T., Yoshinobu, K., Yoshimuta, J., Akizuki, M., Miura, K., Araki, M. and Yamamura, K. Exchangeable gene trap using the Cre/mutated lox system. *Cell. Mol. Biol.* 45: 737-750, 1999.
- Ducy P. Zhang R. Geoffroy V. Ridall AL. Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast Differentiation. *Cell.* 89(5): 747-54, 1997.
- Komori T. Yagi H. Nomura S. Yamaguchi A. Sasaki K. Deguchi K. Shimizu Y. Bronson RT. Gao YH. Inada M. Sato M. Okamoto R. Kitamura Y. Yoshiki S. Kishimoto T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 89(5): 755-64, 1997.
- Mulvihill JJ. Craniofacial syndromes: no such thing as a single gene disease. *Nature Genetics.* 9(2): 101-3, 1995.
- Russell WL. Kelly EM. Hunsicker PR. Bangham JW. Maddux SC. Phipps EL. Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76(11): 5818-5819, 1979.