

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「新たなバイオテクノロジーを用いて得られた食品の安全性確保と
リスクコミュニケーションのための研究」
分担研究報告書（令和2年度）

ゲノム編集の特性、安全性に関する調査研究

研究分担者 吉場 聡子 （国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨:

本研究では、ゲノム編集技術の発展に伴って発展している RNA 編集技術について、その技術の特徴や有効性、研究開発状況の調査を行い、現状の把握を行なった。まず、文献データベースを用いて、ゲノム編集全般に関する文献調査を行い、研究分野についてその傾向の分析を行った。さらに、その中から RNA 編集に関係するキーワードを抽出し、RNA 編集技術を利用した研究の文献収集を行って、その情報をもとに、技術の概要及び応用研究、課題等についてまとめた。本調査より、RNA 編集技術は現在、ヒトを対象とする研究が主であり、疾患の原因となる遺伝子が明らかになっている中枢神経系を中心とする神経疾患やがんの治療研究が始まっている一方で、植物における RNA 編集の応用研究は見当たらず、現時点では食品分野への応用は可能性が低いと考えられた。

A. 研究目的

CRISPR/Cas9 をはじめとするゲノム編集技術は、現在医療から農業・畜産などさまざまな分野で研究が行われ、実用化も進んでいる。ゲノム編集は、比較的容易にゲノムの恒久的な改変が行われることから、実用においては、特にオフターゲット（意図しない DNA の改変）リスクを低減すること、適切に安全性評価を行うことが重要な課題となっている。

一方で、ゲノム編集技術の発展に伴って、さまざまな技術や新たな分野が派生的、相乗的に発展してきている。その中で RNA 編集技術は、ゲノム DNA を改変することなく、RNA 配列を編集することで遺伝情報を書き換えるため、リスクの高いゲノム編集に比べてより安全に遺伝情報を操作できると期待されている。

本研究では、まず近年のゲノム編集技術に関する研究の動向を調査し、その傾向を把握する。さらに RNA 編集技術について文献調査を行い、その技術の特徴、有効性、技術的な問題点などを把握し、現在医療分野での研究開発が著しいこの技術の、食品分野への応用の可能性を探ることを目的とする。

B. 研究方法

文献データベースとして、PubMed (NCBI) を用いて、以下の通り、キーワードによる検索及び情報取得を行った。調査に使用した検索キーワードを表 1 に示す。

ゲノム編集に関する文献調査

E-utilities (Entrez API)を利用して、Python を用いて論文の情報 [PMID, Journal, Title, Doi, Abstract, Year, Month, Status, MeSH, Keyword] を csv 形式で取得した。さらに取得した文献情報の中から、Title、Abstract、MeSH に含まれる単語を抽出して、クラスター分析及び tSNE による可視化を行った。

クラスター分析は、対象のテキストを TF-IDF 法により特徴付けし、Mini Batch K-平均化法を用いて分類を行った (TfidfVectorizer, MiniBatch KMeans from scikit-learn; number of clusters: 60, random sampling size: 4,000)。

文献の収集及びデータ分析にあたっては、参考文献 1、2 を参考とし、Python の実行は全て JupyterLab 上で行った。

RNA 編集技術に関する文献調査

ゲノム編集に関する文献のクラスター分析を元に、RNA 編集に関する 5 種類の検索用キーワ

ードを選び(表1)、ゲノム編集と同様に、論文の情報[PMID, Journal, Title, Doi, Abstract, Year, Month, Status, MeSH, Keyword]をcsv形式で取得した。さらに、ファイルの統合と重複除去を行った後(1,753報)、項目の整理及び雑誌名と内容による選別を行い(106報)、「RNA編集に関する文献」とした。また、特にRNA編集技術の開発に関する18報の論文を抽出して、「RNA編集技術に関する文献」(表2)とした。

C. 研究結果と考察

1. ゲノム編集に関する文献調査

研究方法に記載の方法で、ゲノム編集に関する文献を17,499報(2010.1.1-2020.10.8)取得した後、クラスター分析により、ランダムに選んだ4,000の文献を60のクラスターに分類した(表3)。その結果、deaminase(4)、adar(2)、adenosine(3)などのRNA編集に係るキーワードを含むクラスターに多くの論文が含まれることがわかった(数字はクラスターの数)。この結果をtSNEにより可視化した(図1)。類似性の高いキーワードを含むクラスターはより近傍に配置されるが、RNA編集に係るキーワードを含むクラスターの近くにはmitochondria、plant、transcriptome、histone、chromatinなどのキーワードを含むクラスターが見られた。また、plant(12)は、crop(2)、breeding(2)などと合わせて、ゲノム編集に関わる多くのクラスターに含まれており、広い分野に渡って研究されていることが推察される。

2. RNA編集技術に関する文献調査

研究方法に記載の方法で、RNA編集技術に関する文献(2017.1.1-2020.10.13)を取得した。キーワードにより回収した文献数は多かった(1,753報)ものの、RNA編集技術を用いた研究の数は少なく、その多くはゲノムの塩基編集(base editing)に係る研究であった。

ゲノム編集技術に比べるとRNA編集技術はまだ開発途上であること、応用分野が限られることなどが考えられ、また、現時点では医療分野での研究が主であり、食品分野への応用はほぼ見られなかった。RNA編集技術の説明及び文献による

研究動向の調査については、次の項目にまとめる。

3. RNA編集技術について

RNA編集技術は、一度編集を行うと恒久的にその遺伝情報が細胞に変化が受け継がれるゲノム編集と異なり、DNA配列には変化を加えず、転写産物であるRNAに対して塩基の書換えを行う技術である。広義にはメチル化などの修飾なども含まれるが、ここでは特にタンパク質を機能分子として、遺伝情報の書換えを行う、塩基編集を中心に調査した。ゲノム編集技術とRNA編集技術について、その編集方法や効果についての比較を表4に示す。

RNA編集は、細胞が持つ進化的に保存されたシステムであり、1987年に脱アミノ化酵素 adenosine deaminase (ADAR)がRNA編集活性を持つことが報告されてから、そのメカニズムの研究および酵素を利用したRNA編集技術の開発が行われてきたが、近年のゲノム編集技術の発展で改めて注目されることになった。ADARは、ゲノムの塩基編集にも利用されている。

(RNA編集酵素の種類と機能)

主なRNA編集酵素の種類と機能について、概要を図2に示す。ADARは、動物で広く保存された分子で、ターゲットの二本鎖RNA中のAをI(G)に置換する。ADARはほとんどの細胞で発現しているが、特に神経細胞で編集が活発であり、神経疾患と深く関わりと考えられている。もう一種類の塩基置換、C-to-Uタイプの酵素にはほ乳類のAPOBECや植物のPPRタンパク質が知られているが、RNA編集技術への応用はほとんど見られない。CRISPRシステムを利用して開発されたC-to-Uの編集には、改変したADARが用いられている(RESCUE)。

(ADARを用いたRNA編集システム)

現在最もよく利用されているADARを用いたRNA編集システムは、2種類に大別される。1つは、内在のADARを利用することで、核酸オリゴの導入のみでも編集が可能なRESTORE、LEAPERなどのシステム、もう一つは、ADARの酵素活性を含むデアミナーゼドメインにCas13

などの RNA 認識モジュールを連結した、REPAIR、RESCUE などのシステムである。それぞれのシステムの特徴を図 3 にまとめた。特に医療分野においては、*in vivo* での治療で、外来遺伝子の導入が不要になるかもしれない前者のシステムは、安全性の面からも大きなメリットがある。また酵素を導入する場合も、ヒト由来の ADAR は、ゲノム編集で用いられるバクテリア由来の Cas9 に比べて免疫応答のリスクが低いとされており、今後実用が期待される。

(RNA 編集技術を用いた作物の開発について)
文献調査の結果、RNA 編集技術の利用が見られたのは、全て動物細胞であり、植物への応用は見られなかった。特に、内在の ADAR を利用する方法は、ADAR を持たない植物では作動しないので、RNA 編集を作物に利用するためには、外から酵素を導入する必要がある、さらに効果を持続させるために、酵素をゲノムに組み込む必要がある。現時点では RNA 編集は、作物の品種改良に利用するメリットはなさそうに思われる。

(RNA 編集技術の今後の課題)
RNA 編集技術の問題の 1 つは、編集効率が低いことである。実用的な技術とするためには、酵素やシステムの改良、新たな編集酵素の利用、化学修飾オリゴの利用などによって、編集効率の向上が必要になる。また二本鎖の DNA と異なり、一本鎖の RNA は、相補鎖ターゲットによる G から A、U から C の編集ができない。現時点では A から G、C から U への編集のみ可能であり、適用できる対象が限られているため、編集の拡張が望まれる。RNA を編集する際のオフターゲットの予測や検証方法についても、さらに研究・議論される必要がある。

D. 結論

RNA 編集は、ゲノム DNA に恒久的な変化を加えることなく、効果も一過性のため、ゲノム編集に比べてリスクが低いというメリットがある。一方で、編集効率が低いこと、編集の多様性が不十分であること、またオフターゲットの予測や検証方法などの情報が少ないことなど、テクノロジー

としてはまだゲノム編集ほど確立されていない分野である。現時点では RNA 編集技術は、医療分野での利用が主であり、特に点変異を病因とする中枢神経系疾患の治療で研究が進んでいる。一方で、編集効果の持続が重要になる、作物への利用はあまりアドバンテージがなく、食品分野への応用は可能性が低いと思われる。

参考文献：

- 1) <https://github.com/tatsuya-takahashi/PubMed-API-Script>
- 2) <https://nbviewer.jupyter.org/github/tatsuya-takahashi/PubMed-API-Script/blob/master/PubMed.ipynb>

E. 研究発表・業績

該当なし

表 1 文献検索に使用したキーワード

対象	キーワード
ゲノム編集	genome+editing 2010/01/01 - 2020/10/08
RNA編集	1) ADAR or C-to-U or A-to-I or adenosine-to- inosine or cytidine-to-uridine 2) mRNA+editing 3) messenger+RNA+editing 4) site-directed+RNA+editing 5) Cas13+RNA+editing 2017/01/01 - 2020/10/13

表 2 RNA 編集技術に関する文献

ref_ID	PMID	Techniques 技術	Type 編集の種類	Animal/Plant 動物/植物	Species 種名	Journal 雑誌名	Title タイトル	Year 年	DOI	説明
1	29070703	Cas13-ADAR (REPAIR)	A-to-I	animal	human	Science	RNA editing with CRISPR-Cas13.	2017	10.1126/science.aag0180	CRISPRシステムを利用した新たなRNA編集技術
2	29099293	ΔN-ADAR	A-to-I	animal	human	RNA biology	Abundant off-target edits from site-directed RNA editing can be reduced by nuclear localization of the editing enzyme.	2017	10.1080/15476286.2017.1387711	核移行シグナル付加によるオフターゲットの低減
3	28984845	MS2-ADAR	A-to-I	animal	human	Gene therapy	Site-directed RNA editing by adenosine deaminase acting on RNA for correction of the genetic code in gene therapy.	2017	10.1038/gt.2017.90	ADARの酵素活性ドメインにRNA結合タンパク質MS2を融合させたRNA編集システム
4	28148949	ADAR	A-to-I	animal	human	Scientific reports	Construction of a guide-RNA for site-directed RNA mutagenesis utilising intracellular A-to-I RNA editing.	2017	10.1038/srep41478	ADARは改変せず、gRNAにADAR結合記列を融合させた
5	28098820	ADAR	A-to-I	animal	human	Genes	Applying Human ADAR1p110 and ADAR1p150 for Site-Directed RNA Editing–G/C Substitution	2017	10.3390/genes8010034	ADAR1を用いたRNA編集
6	29078406	ΔN-ADAR	A-to-I	animal	human	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	Stabilizes GuideRNAs against Editing.	2017	10.1073/pnas.1715320114	ret症候群の培養神経細胞を用いて、原因遺伝子 Mecp2の変異をRNA編集により修復した
7	28562030	SNAP-ADAR	A-to-I	animal	human	ACS synthetic biology	Site-directed RNA repair of endogenous Mecp2 RNA in neurons.	2017	10.1021/acssynbio.7b00113	RNA編集を利用したタンパク質の局在操作
8	29860393	Cas13-ADAR	A-to-I		yeast	Nucleic acids research	Switching Protein Localization by Site-Directed RNA Editing under Control of Light.	2018	10.1093/nar/ky433	酵母でRNA編集
9	29967493	SNAP-ADAR	A-to-I	animal	human	Nature methods	Implementation of the CRISPR-Cas13a system in fission yeast and its repurposing for precise RNA editing.	2018	10.1038/s41592-018-0017-z	SNAP-ADARを用いて、病気に関連するKRAS, STAT1を効率的にRNA編集
10	30581135	ADAR	A-to-I	animal	human	Cell chemical biology	Efficient and precise editing of endogenous transcripts with SNAP-tagged ADARs.	2018	10.1016/j.chembiol.2018.10.025	ADAR2変異体E488Yによるオフターゲットの低減
11	31296551	Cas13-ADAR (RESCUE)	C-to-U	animal	human	Science	A Bump-Hole Approach for Directed RNA Editing.	2019	10.1126/science.aax7063	RNAでC-to-Uの編集が可能になった
12	30692694	ADAR (RESTORE)	A-to-I	animal	human	Nature biotechnology	A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing.	2019	10.1038/s41587-019-0013-6	内在のADARと化学修飾されたgRNAを用いた効率的なRNA編集
13	30737497	ADAR/ MS2-ADAR	A-to-I	animal	human	Nature methods	Precise RNA editing by recruiting endogenous ADARs with antisense oligonucleotides.	2019	10.1038/s41592-019-0323-0	RNA編集をin vivoで検証。テロメラー型筋ジストロフィーモデルマウスにおいてジストロフィンの回復
14	31308540	ADAR (LEAPER)	A-to-I	animal	human	Nature Biotechnology	In vivo RNA editing of point mutations via RNA-guided adenosine deaminases.	2019	10.1038/s41587-019-0178-z	内在ADARと長鎖gRNAを用いた高効率かつオフターゲットの少ないRNA編集システム
15	32668759	MS2-ADAR	A-to-I	animal	human	International journal of molecular sciences	Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs.	2020	10.3390/ijms21144943	MS2-ADARを用いた効率的なRNA編集
16	33147453	Cas9-ADAR /Cas13-ADAR	A-to-I	animal	human	Cell Reports	Development of a Single Construct System for Site-Directed RNA Editing Using MS2-ADAR.	2020	10.1016/j.celrep.2020.108350	CRISPRシステムを利用したRNA編集技術の比較検討
17	32668243	ADAR	A-to-I	animal	mouse	Cell Reports	Evaluation of Engineered CRISPR-Cas-Mediated Systems for Site-Specific RNA Editing.	2020	10.1016/j.celrep.2020.107878	マウスの胚体を用いて、ret症候群の原因遺伝子 Mecp2の変異をRNA編集により修復した
18	32640650	Cas13-ADAR (REPAIR v2)	A-to-I	animal	human	International Journals of Molecular Sciences	In Vivo Repair of a Protein Underlying a Neurological Disorder by Programmable RNA Editing.	2020	10.3390/ijms21134781	REPAIRv2を用いて、薬毒性繊維症原因となるCFTRのmRNAのPremature stop codonを修復した

表3 ゲノム編集研究の論文の傾向分析で抽出されたキーワード

cluster	num_articles	keywords						
0	275	crispr,editor,dna,cytosine,editing,adenine,cytidine,deaminase,editors,base						
1	5	palindromic,mutation,interspaced,regularly,repeats,mutations,crispr,vivo,response,unexpected						
2	523	cas,gene,editing,short,repeats,clustered,interspaced,palindromic,regularly,crispr						
3	1282	efficient,genetic,cells,systems,cas,gene,editing,genome,cas9,crispr						
4	152	dyw,mitochondria,pentatricopeptide,arabidopsis,editing,plant,mitochondrial,proteins,rna,ppr						
5	801	gene,lung,proliferation,neoplasms,expression,breast,cells,cell,tumor,cancer						
6	178	tcr,receptors,adoptive,receptor,chimeric,cells,immunotherapy,cell,antigen,car						
7	428	animal,kidney,cell,cells,organoids,pluripotent,human,stem,models,disease						
8	229	dsrna,alu,sites,adars,deaminase,editing,inosine,adar,adenosine,rna						
9	280	genetic,editing,development,genome,cas9,animals,model,gene,crispr,zebrafish						
10	315	dna,zfn,activator,gene,editing,zfns,genome,finger,zinc,nucleases						
11	268	replication,immunodeficiency,infections,infection,cells,vif,ccr5,viral,virus,hiv						
12	373	traits,agricultural,improvement,wheat,genome,plant,food,crop,crops,breeding						
13	154	skeletal,exon,gene,therapy,muscle,duchenne,dmd,dystrophin,dystrophy,muscular						
14	35	genome,tubers,gene,tetraploid,cas9,crispr,plant,solanum,tuberosum,potato						
15	69	protein,transfer,trnas,aminoacylation,rna,synthetases,aminoacyl,amino,synthetase,trna						
16	1	transplantation,safety,apoptosis,pluripotent,cells,caspase,inducible,stem,aml,ipscs						
17	238	cas,gene,modified,genetically,editing,genome,cas9,crispr,plant,plants						
18	240	sequence,genome,guided,cleavage,crispr,target,guide,rna,cas9,dna						
19	449	homologous,breaks,cas9,double,crispr,end,joining,hdr,dna,repair						
20	424	expression,transcriptome,rnas,splicing,sequence,sites,seq,sequencing,editing,rna						
21	220	editing,gene,expression,histone,chromatin,dcas9,epigenome,dna,epigenetic,methylation						
22	633	editing,engineering,cell,throughput,high,screening,crispr,gene,genetic,genome						
23	439	therapies,disease,vectors,editing,clinical,diseases,genetic,clinical,gene,therapy						
24	78	replication,circular,infection,chronic,dna,viral,ccc dna,virus,hepatitis,hbv						
25	39	testis,crispr,gene,insect,pest,female,pheromone,male,determination,sex						
26	353	vectors,viral,vivo,cells,editing,gene,nanoparticles,crispr,cas9,delivery						
27	213	target,editing,genome,crna,cas9,dna,crispr,cas12a,pam,cpf1						
28	351	genetic,research,genome,public,humans,germ,gene,germline,editing,human						
29	86	esophageal,neoplasms,cancer,tumor,cell,squamous,liver,hcc,hepatocellular,carcinoma						
30	122	gene,injection,mouse,crispr,mice,microinjection,cas9,embryos,zygotes,electroporation						
31	152	gene,animals,modified,genetically,transplantation,swine,xenotransplantation,porcine,pig,pigs						
32	397	transgenic,editing,animals,models,cas9,knockout,gene,crispr,mouse,mice						
33	45	genome,gene,mutagenesis,plants,cas9,crispr,mays,plant,zea,maize						
34	34	united,humans,systems,editing,cas,gene,crispr,patent,topic,patents						
35	142	regulation,genetic,gene,transcription,chromatin,expression,regulatory,elements,enhancers,enhancer						
36	365	gene,genome,differentiation,disease,cell,induced,human,cells,pluripotent,stem						
37	362	genetic,bacterial,engineering,gene,genome,editing,bacteria,systems,cas,crispr						
38	184	reprogramming,disease,patient,cell,induced,cells,ipsc,stem,pluripotent,ipscs						
39	377	crop,cas9,breeding,gene,editing,genome,crispr,plants,rice,plant						
40	1	foundations,laid,clinical,regenerative,cell,areas,transplantation,stem,hscs,hematopoietic						
41	2962	genetic,crispr,proteins,protein,expression,genome,editing,cells,cell,gene						
42	140	plants,genomes,editing,genes,chloroplasts,genome,plant,plastid,rna,chloroplast						
43	77	disease,therapy,gene,regulator,transmembrane,conductance,cf,cftr,fibrosis,cystic						
44	203	gene,dna,like,nucleases,transcription,tale,effecter,activator,talens,talen						
45	238	gene,editing,genomes,genes,dna,genome,rna,mitochondria,mtdna,mitochondrial						
46	1	deaminase,transcriptome,adenosine,editing,alters,non,sites,coding,rna,recoding						
47	256	fatty,genes,plants,acid,abiotic,arabidopsis,plant,tolerance,rice,stress						
48	244	editing,rna,genome,sgnas,design,guide,cas9,crispr,sgna,target						
49	146	gene,cas9,metabolic,fungal,genome,crispr,engineering,yeast,saccharomyces,cerevisiae						
50	87	cell,inosine,binding,expression,editing,dsrna,deaminase,adenosine,rna,adar1						
51	13	maintenance,damage,human,tert,length,cells,telomeric,telomeres,telomerase,telomere						
52	180	reproductive,genome,issues,gene,germline,editing,human,research,ethical,ethics						
53	160	editing,small,regulation,expression,microrna,rna,mir,micrnas,mirnas,mirna						
54	53	poultry,crispr,cells,genome,primordial,germ,chickens,pgcs,avian,chicken						
55	546	regulation,transcription,mrna,gene,expression,binding,proteins,splicing,rna,protein						
56	221	editing,escherichia,genetic,dna,coli,genome,metabolic,engineering,biology,synthetic						
57	221	parasites,crispr,gene,parasite,resistant,drug,malaria,falciparum,plasmodium,resistance						
58	2	did,crispr,cas,cancer,organogenesis,colorectal,transition,epithelial,mesenchymal,emt						
59	437	editing,transplantation,human,differentiation,gene,embryonic,hematopoietic,cell,cells,stem						

表 4 ゲノム編集と RNA 編集の比較

技術	ゲノム編集	RNA編集
ターゲット	DNA	RNA
細胞あたりのターゲット数	1 または 2	数コピー ~ 10^4
編集方法	二重鎖切断によるDNA修復 組換えまたは塩基置換	塩基置換 (A-to-I または C-to-U)
手法	TALEN, CRISPR/Cas など	ADAR, engineered editase
効果	不可逆、恒常的	一過的
ターゲットの種類	非ターゲットDNAの編集	非ターゲットRNAの編集、抑制
ターゲットの予測	CRISPRdirect等gRNA設計ツール及び SITE-seq (in vitro), DISCOVER-seq (in vivo) など	BLAST など in silico のみ
検証方法	whole-genome-seq, amplicon-seq	transcriptome RNA-seq
分野	食品・医薬品開発、遺伝子治療、 基礎研究など多岐	がん・神経疾患などの遺伝子治療に期待

図1 キーワードによるゲノム編集研究の論文の傾向分析

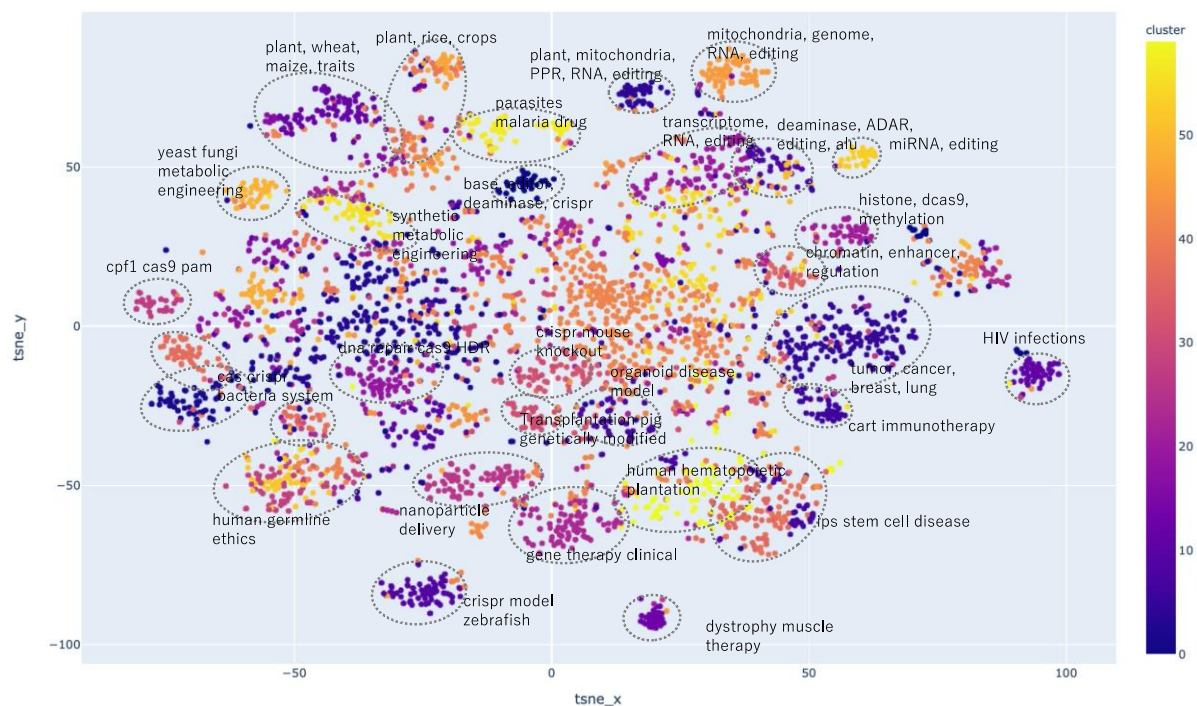


図2 主な RNA 編集酵素と機能

塩基置換	酵素	タイプ	ターゲット	生物
A-to-I	ADARs	adenosine deaminase	主にnon-coding RNA 多くの編集箇所	動物
C-to-U	APOBECs	cytidine deaminase	主にnon-coding RNA	ほ乳類
C-to-U	PPR proteins	cytidine deaminase	葉緑体、ミトコンドリアmRNA	植物

脱アミノ化反応による塩基置換

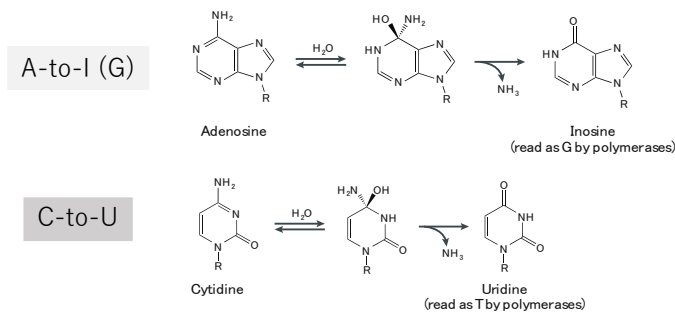
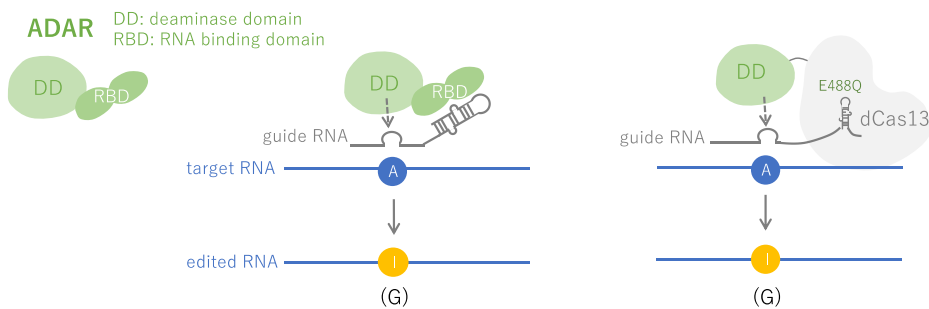


図3 ADAR を用いた RNA 編集システムの種類



	内在型ADAR	Engineered Editases
特徴	内在型のADARを利用する	ADARのデアミナーゼドメイン(ADARdd)にCas13などのRNA認識モジュールを連結
技術	RESTORE, LEAPERなど	SNAP-ADAR, λ N-ADAR, REPAIR, RESCUEなど
長所	核酸オリゴの導入のみで編集できる (ADARを導入しない場合)	酵素の量の調節が可能 A-to-IとC-to-Iの編集が可能
短所	標的組織のADARの発現量に依存する A-to-Iの編集のみ可能 編集効率が低い	酵素の導入が必要 酵素の過剰発現によるオフターゲットの増加