

2.4 基礎基盤科学技術 分子・細胞

2.4.1 遺伝子発現機構 (RNA、エピゲノム、クロマチン)

(1) 研究開発領域の定義

遺伝情報の発現機構、つまり遺伝子の情報が細胞における構造および機能に変換される過程の作用機序と生理機能の解明は、次世代シーケンサー (NGS) 等の技術進展を受け近年大きく解析が進んでいる。ここでは、ゲノム、RNA、エピゲノム、クロマチン高次構造の視点から、多種の医学・生物学現象の遺伝子的あるいはゲノムの基盤を明らかにすると同時に、プロセッシング、修飾、翻訳といった分子レベルで構造・機能の相関や生理機能ネットワークを解明する領域である。

(2) キーワード

エピゲノム・エピジェネティクス、DNAメチル化、ヒストン修飾、バイサルファイト法、ChIP-seq、Hi-C 法、クロマチン、ゲノム高次構造、ヌクレオーム、一細胞オミクス、次世代シーケンサー、ノンコーディング RNA、RNA プロセッシング、RNA 修飾、RNA-タンパク質複合体、液体相分離、核酸医薬

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

ひとつの個体は、多様な種類・分化段階の体細胞と生殖細胞により構成されている。ヒトの場合はおよそ 200 種類、30 兆個の細胞が存在していると言われる。個体を構成する細胞はひとつの受精卵に由来するため、一部の免疫細胞等を除いて体細胞はすべて同じゲノムをもつ。それに関わらず、個々の分化した細胞は多様な形・機能をもっている。言い換えれば、受精卵が増殖・分化して細胞、組織、器官、個体を形成する過程において、ゲノム DNA 情報は維持されるが、ゲノム上で使われる (すなわち、RNA やタンパク質が生産される) 遺伝子が異なるため、細胞独自の機能を持つようになる。一般的に、分化した細胞において遺伝子発現パターンは安定に維持されるため、細胞が増殖してもその形質は維持される。このような遺伝子発現の調節は、生命の維持や機能発現に極めて重要であり、セントラル・ドグマ (DNA (転写) → RNA (翻訳) → タンパク質) と呼ばれる一連のプロセスは、細菌からヒトなどの高等真核生物まで全ての生物種で保存されている。この過程では多様な因子が関与して、どの細胞で、どのタイミングでどの遺伝子が発現するかを調整している。この調節は、完全にプログラムされているばかりでなく、確率論的に決定されることがあることもわかってきている。

エピゲノムは、遺伝子発現制御に関わるゲノムの修飾の態様といえ、DNA の塩基配列の変化を伴わずに、細胞世代を超えて安定的に表現形質を維持・継承させるシステムといえる。このゲノム上の遺伝子を選択的に活性化あるいは不活性化する仕組みとして、DNA 自体の修飾と DNA に強く結合しヌクレオソーム構造を形成するヒストンタンパク質の翻訳後修飾が知られている。DNA の修飾は、酵母やショウジョウバエではみられないものの、高等真核生物の発生や分化の制御に重要である。ヒトの細胞では、CpG 配列のシトシンの大部分がメチル化されており、転写開始点付近のメチル化は遺伝子発現抑制に働く。生殖細胞や受精卵では、DNA メチル化がダイナミックに変動するが、体細胞では一旦うけたメチル化は DNA 複製過程で維持され、娘細胞にも継承される。ヒストンは、様々なアミノ酸が多様な翻訳後修飾をうける。特に、リジン残基のアセチル化、

2.4

メチル化、ユビキチン化等が遺伝子発現制御に働いている。一般的に、アセチル化は転写の活性化、メチル化は転写の抑制に働く（特定のアミノ酸残基のメチル化は転写活性化に働く）。これらの修飾を介したエピジェネティクス制御は、発生から老化・各種疾患にいたるまでの生命活動全般に幅広く関係する。

また、広い意味でのエピゲノム制御の一つとして、遺伝子の核内配置・ゲノム高次構造も重要であることがわかっている。遺伝子の発現制御には、DNA に直接結合する転写因子が必須であるが、その転写因子の DNA への結合は、ゲノムの凝縮状態や核内構造による局在化によっても制御される。すなわち、遺伝子発現の差異は、ゲノム DNA とその機能を司る核内タンパク質が相互作用する場であるクロマチン構造で生み出される。このクロマチン構造や核内高次構造は、ヒストン修飾等と密接に関係している。さらに、ゲノム上でタンパク質をコードしないジャンク領域と従来見なされてきたゲノム領域から膨大な量の RNA が転写されていることが明らかとなった。またこれらの RNA 群が、RNA を始めとする多様な生体分子と相互作用し、様々な生命現象を特異的に制御していること、その機能の破綻ががん、神経疾患や感染症など、多様な疾患に深く関与していることが明らかにされつつある。

このように遺伝子の発現機構の全体像はまだ解明されていないことも多く、また、エピゲノム状態やクロマチン構造の統合的理解が必要とされ“ヌクレオーム（網羅的細胞核）”という概念による研究の重要性が言われ始めている。細胞核内で起こる遺伝子発現の制御機構を理解することで、生命科学の深化のみならず、疾患の原因解明や治療法の確立などへの貢献が期待される。本領域は、これまで医学・生物学の特定の分野を指すものであったが、近年における次世代シーケンサーをはじめとする技術の急速な進歩により、方法論を中心とした医学・生物学全体の基盤となる領域に変貌している。

【研究開発の動向】

2000 年代前半に、国際 HapMap 計画によりヒトゲノム遺伝多型のカatalogが作られた。2004 年頃より NIH が 1,000 ドルゲノム（=個人のヒトゲノム全配列の解読コストを 1,000 ドルにする試み）技術開発として投資してきたシーケンサー技術が実用化されている。2011 年に米国 Pacific Biosciences 社が研究開発し市場化した第三世代シーケンサー PacBio RS II の性能が著しく高く、状況は大きく変化した。2013 年に同社が微生物のゲノム配列をギャップなく配列決定し、99.999% の塩基配列の精度を出すソフトウェアを発表した。2014 年初頭に、Illumina 社が大型 NGS 機器である HiSeq X Ten シリーズを発表し、1,000 ドルゲノムを達成したと報告された。

近年、次世代シーケンサーを用いた解析技術（単一細胞シーケンシング）の発展により、個々の細胞におけるトランスクリプトーム、エピゲノムを解析することが可能になりつつある。中でも、単一細胞 RNA-seq 技術は 2009 年に登場して以来¹⁾、多くの手法が開発、発表されており、現在最も汎用されている単一細胞シーケンシング法となっている²⁻⁵⁾。単一細胞トランスクリプトーム解析は、比較的低コストでスループットも高い優れた手法であるが、もともとそれらの細胞が持っていた空間情報を失うという問題があった。そのため、マーカーとなる遺伝子の発現情報や計算等により、個々の細胞の空間的な分布を推定する方法なども開発されてきた。一方、実際に空間分布を維持したままの単一細胞トランスクリプトーム解析技術が開発されるなど、空間トランスクリプトームの需要は高まっている⁶⁾。

【エピゲノム】

1980 年代にがんにおけるメチル化異常の報告がなされ、1990 年代前半にがんの抑制遺伝子のメチル化異常による不活化が発見されたことを契機としてがん分野でのエピゲノム研究が大きく進展した。2000 年代

に入り転写因子やヒストン修飾部位を解析できるクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法が普及したことに伴い、世界各国においてエピゲノム研究が積極的に推進された。まず DNA メチル化は微生物と脊椎動物では様式が大きく異なるが、ここでは脊椎動物に普遍的な CpG のシトシンメチル化の検出について述べる。ゲノム中の CpG サイトは非常に多く、ヒトゲノムの場合、全ゲノム配列の 1% 程度を占める (約 3,000 万箇所)。シーケンサーにより、すべての CpG サイトのシトシンメチル化状態を検出するバイサルファイト法 (非メチル化シトシンをウラシルに変換することでメチル化シトシンとの違いを明確化する方法) を低コストで実施することが可能になった。この結果、例えば、世代ごとに CpG サイトのシトシンメチル化が変化する率は、塩基が変化する率よりも 3 桁近くも高く、生物が環境に適応する能力を高めていること、重要な発生関連遺伝子をコードするゲノム領域の多くは、低メチル化かつヒストン H3 の 27 番目のリジンがメチル化されることで初期胚における発現が抑えられており、細胞運命決定が進む過程で高メチル化へと変化し発生関連遺伝子が転写されるようになるという現象が発見されている。バイサルファイト処理を使う場合、シトシンメチル化判定にはパーソナルゲノム解読と同程度のリード量 (ゲノムを 30 倍程度被覆) が必要になり、バイサルファイト処理した DNA 断片を解読したリードはゲノム上に高速にアラインメントする必要がある。

2010 年頃から世界各国でエピゲノムに関する国家 (間) プロジェクトが開始され、国際的なプロジェクトの一つとして、国際ヒトエピゲノムコンソーシアム (International Human Epigenome Consortium : IHEC) が 2010 年から活動しており⁷⁾、様々なヒト正常組織のエピゲノムデータが 6,000 以上集積している。本コンソーシアムには、米国、EU、韓国、ドイツ、カナダ、イタリアが参加している。日本も JST-CREST (2015 年以降は AMED-CREST) 「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」を主体として 2011 年から 2018 年まで IHEC メンバーとなり、500 以上のデータセットを取得している。IHEC は 2020 年度から第 2 ステージとなり、データセットの統合解析や疾患のエピゲノムなどを進めており、日本からは AMED-CREST 「健康・医療の向上に向けた早期ライフステージにおける生命現象の解明」のメンバーが参画している。

エピゲノムや転写因子の局在を 1 次元のゲノム情報の上にマッピングすると、遺伝子の抑制と活性化に働く修飾が異なる場所に存在していることがわかる。このすみ分けがうまくできていることにより、発現する遺伝子と発現しない遺伝子の分別と継承が行われる。しかしながら、これらの標識は必ずしも安定に保持されるわけではなく、むしろダイナミックに変化しつつ定常状態として維持されることがわかってきた。また、ヒトゲノムの非コード領域が個人の多様性を決定する上で極めて重要であることも明らかになってきた (SNPs の大部分は非コード領域に存在する)。このように、非コード領域の役割を理解するためにはエピゲノム解析は重要であり、ヒトの疾患、老化の本質的な理解とともに、治療戦略、創薬の上でも鍵となると認識されている。

実際の細胞核中では、1 次元的にはゲノム上の距離が離れているにもかかわらず、ループ構造を作ることによって 2 つの領域が空間的に近接して存在したり、近接しているにもかかわらず空間的に離れて存在したりする場合がある。このような空間局在性は、転写因子間の結合や転写そのものに影響される場合もあるが、2 本の DNA をつなぎ留めるタンパク質も寄与すると考えられている。したがって、遺伝子発現の制御機構を理解するためには、転写因子や DNA メチル化、ヒストン修飾等の 1 次配列上のエピゲノム情報のみならず、細胞核内の高次構造を知ることやその制御機構を解明することも重要である。

細胞核内の遺伝子制御機構を解明するためには、ゲノム配列、転写因子、エピゲノム状態、空間配置と凝縮状態、さらには核内構造体の役割、分子動態等を統合的に理解する必要があるとの考えが広がり、細胞核の包括的な理解という意味で「ヌクレオーム (Nucleome)」という概念が形成された⁸⁾。この「ヌクレオーム」研究は、次世代シーケンサーによるゲノム・エピゲノム解析と顕微鏡解析、計算機科学・数理モデル研究等の異分野が発展、融合して萌芽し、展開されつつある。

なかでも遺伝子発現制御機構の解明に関わる近年のイメージング技術の発展は眼を見張るものがある。光学顕微鏡の分解能は理論的に200nmを超えることができないとされていたが、様々な超解像顕微鏡技術が開発され、100nm以下の分解能での検出が可能になった。特殊な方法を用いれば10nm以下の分解能も達成できることが示されている。さらに、蛍光タンパク質を用いた生細胞解析により遺伝子発現制御の時空間動態も明らかにされ始めた。様々な転写因子やRNAポリメラーゼ、ヒストンの生細胞動態がフォトブリーチ法や1分子イメージング法により解析され、転写開始複合体がダイナミックに構成されることが示された。また、ゲノム編集に用いるタンパク質からDNA切断活性を除くことで、特定のゲノム領域を可視化することができる。転写産物に関しても、特定のRNAに結合するタンパク質や蛍光アンチセンス鎖を用いた検出が可能となっている。さらに、DNAメチル化やヒストン修飾を検出するプローブも開発され、エピゲノム状態と遺伝子発現のダイナミクスを生細胞で捉えることが可能になってきた。

エピゲノム制御に着目した創薬開発も進められており、抗がん剤として既に2種類のDNAメチル化酵素阻害剤と3種類のヒストン脱メチル化酵素阻害剤が米国で承認されている。azacytidine (DNAメチル化阻害剤: 米国 Celgene 社が開発) は骨髄異形成症候群の治療薬として米国で2004年に上市され⁹⁾、日本では日本新薬¹⁰⁾がライセンス生産し2011年に承認された。他にも皮膚T細胞リンパ腫の治療薬 vorinostat (ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤: 米国 Merck 社が開発し 2006年にFDA承認; 日本では大鵬薬品が2011年7月に承認を取得) 等が上市されている。

低分子化合物によるエピゲノム制御は特定の遺伝子に作用するものではないため、特定の遺伝子のエピゲノム状態を人工的に制御し、遺伝子発現を自在に操作できるような「エピジェネティック編集」技術の開発が進められている。これは、上述のゲノム可視化技術と転写の活性化や不活性化に働くタンパク質ドメインを用いることにより、特定のゲノム上のヒストン修飾状態等を変化させることで、遺伝子発現を制御するものである¹¹⁾。その制御を低分子化合物や光により自在に操作できる系も開発されるなど、この制御技術は急速に進展している。

エピゲノム情報を単一細胞レベルで解析する技術の開発も進んでいる。クロマチンのアクセシビリティを検出する ATAC-seq^{12), 13)}、クロマチン高次構造を検出する Hi-C^{14), 15)}、ヌクレオソームの位置を検出する MNase-seq¹⁶⁾ も単一細胞解析への最適化が行われている。一方、ゲノムワイドなヒストン修飾状態や転写因子の結合の解析には ChIP-seq が広く用いられてきた。ChIP-seq の単一細胞解析への応用としてドロップレットを用いた手法が報告されている¹⁷⁾。さらには免疫沈降を伴わない手法の開発が行われ、カルシウム依存性エンドヌクレアーゼ Micrococcal nuclease (MNase) を結合させた抗体により特定のゲノム領域を切断、回収する CUT&RUN¹⁸⁾、抗体と Tn5 トランスポザーゼを結合させた CUT&Tag¹⁹⁾、抗体に結合させたオリゴ DNA を Tn5 トランスポザーゼにより近傍のゲノムへと挿入する ChIL-seq²⁰⁾ が報告された。特に ChIL-seq は抗体による単一細胞エピゲノム解析を達成した唯一の国産の解析法であり、顕微鏡レベルでの局在情報との同時取得や2つ以上の標的を同時に解析できるユニークなものである²¹⁾。

ヒストン修飾や転写因子の結合部位の解析には、それらの特異的抗体が必要であるが、抗体の特異性や再現性の問題が科学的・産業的観点から改めて取り上げられることが増えている^{22), 23)}。すなわち、ポリクローナル抗体を用いた場合の再現性や特異性の検証が不十分な抗体を用いた場合の問題が無視できないほど大きく、モノクローナル抗体や組換え抗体の利用が推奨されている。ヒストン修飾抗体に関する特異性に関する包括的データベースの作成²⁴⁾や、NIH のプログラムの一環として転写因子に対する免疫沈降グレードのモノクローナル抗体の大規模な樹立、バリデーションが行われる²⁵⁾等、信頼性の高い抗体の作製と選択を促す試みが進められており、多種多様なエピゲノム解析が発展する土壌形成が行われている。これらの技術開発は

米国が圧倒的に主導している。日本でも網羅的な抗体作製が試みられたこともあるが広がりは限定的である。

【RNA】

RNA 研究は、古典的な RNA (mRNA、rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA) に加え、近年ではタンパク質をコードしないとされる非コード (non-coding RNA: ncRNA) に関する研究が精力的に進められている。ncRNA は極めて多様性に富む生体分子群であるが、大別すると、① 20 ~ 30 塩基程度の鎖長の small RNA、② 200 塩基を超える鎖長の long ncRNA の2つのグループに分けられる^{26), 27)} (ただし、後述のように、非コードとされていた RNA からペプチド鎖が合成されている場合も多く見つか、この定義自体を見直す必要もでてきている)。

① small RNA

真核生物の small RNA 研究は 1998 年の RNA 干渉の発見に端を発する。small RNA のうち、二本鎖構造の small interfering RNA (siRNA) は mRNA の分解 (RNA 干渉) を、一本鎖構造の microRNA (miRNA) は mRNA の翻訳阻害を引き起こすことが明らかとなり、RNA サイレンシングと総称される。これら small RNA による遺伝子発現抑制機構の分子メカニズムの理解は急速に進みつつある。これらは「アルゴノート」と呼ばれる共通タンパク質と共に RISC という作動装置を形成し、翻訳制御、mRNA の安定性制御、クロマチン制御を抑制する制御因子群であることが明らかにされた。現在では、RISC 構築機構全貌の理解、small RNA が関わる様々な生理現象や疾患メカニズムの理解に向けた研究が拡張を続けている。この他には生殖細胞のゲノムをトランスポゾンによる卵・精子形成異常から守る PIWI-interacting RNA (piRNA) の複雑な生成経路や作用機構に関しても、欧米、中国に加え日本の研究者による研究が積極的に積み重ねられている。

Small RNA の医療応用研究も世界中で進められており、siRNA の糖鎖 (GalNAc) 修飾などの基盤技術が整えられつつある。しかし、効率的なドラッグデリバリーシステム (DDS) や生体内での安定化等のための化学修飾デザインなど複数の技術的ボトルネックが顕在化している。また、リキッドバイオプシーの一環として、体液に含まれるエクソソーム中の microRNA のプロファイリングをバイオマーカーに用いようとする試みも日本で大規模に進められている。特に、がんの診断目的での期待が高い。また、「原核生物における RNA 干渉」とも言える、CRISPR/Cas9 システムも RNA 生物学としては非常に大きなトピックである。Small RNA 研究では、米国、欧州、韓国とともに日本の研究者が先導的な成果を上げ、その発展に大きく貢献してきた²⁸⁾。

② long ncRNA

数百塩基を超える long ncRNA については、ヒトのゲノムから少なくとも 20,000 種類を超える膨大な種類が転写されていると言われている。タンパク質をコードする遺伝子の種差に比較して、ncRNA は種差が大きく、進化における生物の複雑性や種特異的機能の獲得に重要な役割を果たしていると考えられている。また、近年の疾患シーケンスの結果から、様々な疾患において long ncRNA に特異的な変異が入っており、それに伴うエピゲノムの変化が異常な遺伝子発現制御の原因になっていることが示唆されている。がんをはじめとした多数の lncRNA の疾患への関与例が多数報告され、さらにはゲノム編集技術やアンチセンス核酸を用いて lncRNA の機能性が網羅的にスクリーニングされ、多数の lncRNA の細胞腫特異的な機能性が確認され、lncRNA の制御因子群としての確固な機能概念が確立された。long ncRNA はすでに知られているエピ

ゲノム制御や細胞内構造体形成のみならず、多彩な生命現象と関係しているものと予想される。

ncRNA についての最新の知見が蓄積していく中で、わが国が伝統的な強みを持つ翻訳やスプライシングといった古典的な RNA 生物学が再び大きな脚光を集めている。例えば、ncRNA の1つである microRNA は、標的 mRNA からの翻訳開始を阻害すると同時に、標的 mRNA の poly-A 鎖を分解しその安定性を下げるという2重の作用様式によって、標的 mRNA からのタンパク質合成を抑制することが知られている。このように、ncRNA の働きを解明するためには、翻訳をはじめとした古典的な RNA が関与する様々な過程を、最新の知見をふまえて正しく理解することが不可欠であると言える。また、コドンの新たな意味づけ (mRNA 安定化に関係)、リボソーム品質管理、RNA 修飾など、古典的な RNA が関与する様々な過程において新たな発見がなされており、リボソームプロファイリングといった革新的な解析技術は新旧 RNA 研究や翻訳研究を大きく加速させている。最近の翻訳研究において、真核生物においても非 AUG からの翻訳開始、繰返し配列からの翻訳開始等、これまでの配列予測からは想定されなかったタンパク質が合成されることも示されている。なお、ncRNA と mRNA の境界は極めて曖昧である。例えば、long ncRNA として同定されていたものが、実は非常に短いペプチドをコードしており、そのペプチドが生理活性を有している例がいくつも報告されている^{29), 30)}。一方、タンパク質をコードする mRNA 遺伝子のイントロン部分には、多数の microRNA が含まれていることもよく知られている。また、mRNA のスプライシング異常によって「ncRNA 化」した異常な mRNA は、リボソームの品質管理機構によって速やかに排除されるが、long ncRNA には品質管理機構による分解を免れているものも多い。さらにバックスプライシングと呼ばれる形式によって生み出される環状 RNA が多数発見され、マイクロ RNA やタンパク質因子のスポンジなどの機構を介して様々な生理機能や疾患での重要な役割が明らかになっている。またスプライシングによって上流プロモーターが活性化される新規制御機構やスプライシングの中心的因子 U1 snRNA の新規機能の発見など既に確立された基盤的機能概念を修正するような知見が相次いでいる。

したがって、mRNA か ncRNA か、あるいは small RNA か long ncRNA か、という様な画一的な分けにとらわれず、それらの複雑で巧みな関係を正しく理解することが重要である。動物個体を用いた lncRNA 変異体の表現型解析が本格化しており、生理機能も徐々に明らかになっている³¹⁾。現時点では、具体的な機能解析が行われた lncRNA はほんの一部に過ぎないが、上記最先端技術による今後の解析によって、「lncRNA ならでは」の作用機序や生理機能の理解が進み、ゲノムの広範な領域から生み出される lncRNA による新しい遺伝ルールの解明につながる事が大いに期待される。

転写後修飾に関しては、mRNA や lncRNA に多数の m6A 修飾が付加され、スプライシング、mRNA 安定性、mRNA 輸送、翻訳の制御に大きな役割を果していることが示された³²⁾。また lncRNA の機能にもこの修飾が必要であることが報告された。m6A 修飾を介した制御が、がんなどの疾患、性転写後修飾決定、生物時計などの重要な生理現象に関わっていることも報告されている。m6A 修飾制御は、メチル化と脱メチル化のバランスによって決定される動的なものであるというエピトランスクリプトミクス説と、一度付加されたメチル化は変動しにくいという説が相反した状態にある³²⁾。

タンパク質発現過程の RNA 制御には、共通して多数の RNA 結合タンパク質 (RBP) が関与し、ヒトでは 1,500 種類ほどが存在している。米国の ENCODE 関連プロジェクトでは、eCLIP、ゲノム編集、次世代シーケンスなどの先端技術を駆使して、各 RBP の結合 RNA 配列、細胞内局在、トランスクリプトームへの影響を網羅的に解析するプロジェクトが行われ最近その成果が発表され、今後の RNA 研究の有用なリソースとなると考えられる³³⁾。しかし一方で、各 RBP の結合特異性は一見明瞭でない場合が多く、細胞内での特異性獲

得の詳細な機構は未だ完全には理解されていない。さらに、制御因子としての RNA 結合タンパク質が誘発する液-液相分離 (LLPS) 現象による RNA を起点とした局所的な細胞内環境の形成原理が注目されている。特にこの LLPS では、RNA が重要な役割を果たしており、特定の RNA が合成されることによって、そこに RBP が集約されて LLPS が誘発され、一方で RNA の分解によってそれが解消される動的な制御環境形成が細胞内で局所的に起こっており、最近では複数遺伝子の転写制御エレメントであるスーパーエンハンサー領域から合成された ncRNA (eRNA, elncRNA) が特異的なエピジェネティック制御因子を集約してその場で相分離を誘発することが示され³⁴⁾、今後これらの現象が多彩な生理現象に関わっていることが期待されている。

RNA 生物学の応用研究も近年盛り上がりを見せている。スプライシングに関わる複数の基盤因子の変異が様々な癌の原因となっていることが疾患ゲノム解析によって明らかにされ、スプライシング因子が重要な創薬標的として浮上した。またスプライシングを人為的に改変すること³⁵⁾によって難病の神経筋疾患治療を可能にしたアンチセンス核酸、脊髄性筋萎縮症治療薬ヌシネルセンが米国 FDA で初めて認可され (2016 年)、RNA を標的とした核酸医学の扉を開いた。依然デリバリーと副作用の問題は残るが、今後これに続く治療法の開発が急速に進むと考えられる。一方で、スプライシング関連タンパク質を低分子化合物で機能制御し、スプライシング異常に起因した神経疾患を治療しようとする応用研究も日本を含めて成果が上がりつつある。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

・ RNA-タンパク質複合体

遺伝子発現を網羅的かつ定量的に測定する RNA の次世代シーケンス解析は、1 細胞で実施されるようになり、その手法の改良が著しく進展している。一本鎖の RNA は柔軟に高次構造を形成し、その構造が相互作用因子によって認識され、作動装置としての RNA-タンパク質複合体が形成される。この RNA 高次構造を RNA の化学修飾、架橋、ライゲーシオンと次世代シーケンスを組み合わせるゲノムワイドにマッピングする手法 (例: SHAPE, PARIS, RIC) が複数考案され、RNA 構造情報が収集され始めた。一方、RNA と相互作用するタンパク質の結合部位のマッピング法 (eCLIP) が簡便化され、米国の ENCODE プロジェクトの一環として体系的に実施され、膨大な情報が蓄積しつつある³³⁾。この RNA 構造とタンパク質相互作用部位の情報を組み合わせることによって、細胞内 RNA の挙動とそれを規定する規則性の理解につながると考えられる。

・ 単一細胞マルチオミクス技術

単一細胞シーケンシング技術の急速な発展により、現在では単一細胞から 2 つ以上の情報を同時に取得する単一細胞マルチオミクス技術の報告が相次いでおり、今後しばらくの技術開発のトレンドとなることが予想される。例えば、CITE-seq³⁶⁾ではタンパク質情報の「核酸化」によりタンパク質とトランスクリプトームの同時定量が可能となった。この手法では、poly-A を含むオリゴ DNA を結合させた抗体を細胞に反応させ、単一細胞 RNA-seq のプラットフォームにおいて mRNA とともに抗体結合オリゴを定量する。scCOOL-seq³⁷⁾は、細胞内での DNA CpG のメチル化状態と GpC メチル化酵素によるオープンクロマチン領域のマーキングを bisulfite sequencing により同時解析する。sci-CAR³⁸⁾では、逆転写プライマーや Tn5 トランスポザラーゼによる indexing と split-and-pool PCR による indexing を組み合わせることにより、数千の同一細胞からの ATAC-seq と cDNA ライブラリーの同時構築を可能とした。2 つの修飾や転写因子の結合部位を同時に解析できる mtChIL-seq 法も開発された²¹⁾。これらの indexing の組み合わせによる multiplexing

法は他のマルチオミクス技術にも原理上応用可能であるため、今後の単一細胞解析のハイスループット化において重要な概念となると考えられる。

・米国 10x Genomics 社

Chromium システムというドロップレットベースの単一細胞解析プラットフォームの開発が進んでいる。マイクロ流路装置から試薬類、解析ソフトウェアまでをパッケージ化しており、国内でもいくつかの研究機関において導入されている。また、Chromium システムをベースにした単一細胞 ATAC-seq キットの販売が既に開始されており、さらには米 BioLegend 社とともに「TotalSeq」という名称でオリゴ結合抗体等の CITE-seq 用キットが販売された。また、空間的遺伝子発現解析システム (Visium) も販売されている。

・クロマチン高次構造解析

いわゆる 3C 系アッセイに代わる技術の報告が増えつつある。例として、核の凍結超薄切片を用いた GAM³⁹⁾、multiplexing 法に用いられる split-and-pool の概念を応用した SPRITE⁴⁰⁾、Tn5 トランスポザゼを利用した TRAC-looping⁴¹⁾ 等がある。これらの新技術は、いずれも「in situ でのゲノムの制限酵素切断とライゲーション」という 3C 系アッセイの原則とは別の動作原理に基づいている。また、次世代シーケンサーをベースにした解析法とは別のアプローチとして、連続的 smFISH と超高解像度顕微鏡の組み合わせによりクロマチン高次構造を可視化する試みも報告されている⁴²⁾。

・液-液相分離 : liquid-liquid phase separation : LLPS

多くの RBP が有する天然変性領域同士が、複雑な相互作用ネットワークを形成して相分離した液滴を形成する現象 (液-液相分離 : liquid-liquid phase separation : LLPS) が挙げられる。この LLPS は、細胞内に存在する膜構造を持たない顆粒状構造体形成の原動力になっており、膜を介さずに特定の因子を空間的に隔離、濃縮したり、特異的生化反応の場、クロマチン構造ハブとして働くことを可能にしており、その意義の解明が今後進むと考えられる。この機構で RNA は上記タンパク質を集約するだけでなく、RNA-RNA 相互作用によっても相分離を促進しており、細胞内での相分離の誘導に様々な様式で関与していることが明らかになってきた。また相分離を制御する因子として RNA ヘリカーゼ、修飾酵素なども同定され始めており、今後 RNA を中心とした局所的な相分離制御の研究が、様々な細胞内現象を説明するために大きく展開していくと考えられる。

・CRISPR/Cas9

その操作性、簡便性、フレキシビリティから、現在では遺伝子改変マウス作成等におけるゲノム編集ツールの第一選択になりつつある。さらには、DNA 切断活性を持たない dCas9 と DNA・ヒストン修飾酵素との結合によるエピゲノム編集⁴³⁾、遺伝子の核内局在やクロマチン高次構造の編集^{44), 45)}、特定のゲノム領域の可視化への応用⁴⁶⁾、cell barcoding による lineage tracing⁴⁷⁾ など幅広いアプリケーションに応用されており、現在のゲノム、エピゲノム研究において欠くことのできないツールとなっている。

・RNA 関連創薬

2018 年になって遺伝性 ATTR アミロイドーシスの RNA 干渉治療薬パティシランが初めて FDA 認可され、RNA 干渉創薬開発に弾みがつくことが期待される。また RNA と低分子化合物の直接相互作用の研究が盛

んになり、RNA-タンパク質、RNA-RNA 相互作用を低分子化合物で阻害する試みが試行されている。こうした RNA モチーフは、バクテリアでリボスイッチとして盛んに研究されてきたが、最近でヒトの RNA に結合する化合物スクリーニングが産学双方で盛んに行われ、日本でも神経疾患関連のリピーター配列由来 RNA に結合する化合物が得られており、低分子化合物と RNA の相互作用は今後の注目すべき創薬シーズとなることが期待される。一方で、mRNA をベースにしたナノテクノロジー技術を取り入れた遺伝子治療技術開発が盛んになってきている。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

・米国 4D nucleome project

2015 年に米国 NIH の「Common Fund」で予算化された。2018 年予算だけで約 2 千万ドルという大型研究費である。「4D nucleome」とは、3 次元空間 + 時間で「4D」、核を意味する「Nucleus」に全てを意味する「-ome」を付加し、「Nucleome」となっており、核内におけるゲノムの時空間的制御機構を包括的に理解しようという試みである。3C 系アッセイによるクロマチン高次構造解析、イメージング解析、ポリマーシミュレーション等の数理モデリングを含む多角的なアプローチによる解析、技術開発をサポートし、数多くの成果を挙げている。また、解析に用いるセルライン、データフォーマット、専門用語等の共通化、標準化を進める他、ポータルサイトでは承認された実験プロトコルを公開し、プログラムの支援を受けた論文に関しては学術誌への投稿前に bioRxiv などのプレプリントサーバーにアップロードする方針をとる等、透明性、オープン性を重視している。技術開発に特化した第 1 期の成功を受けて、2020 年から第 2 期がスタートした。なお、欧州でも同様のプロジェクトとして 4DNucleome Initiative in Europe が存在している。

・米国 ENCODE プロジェクト

RBP に関する情報整備が精力的に行われている。すでに 250 種類もの RBP の特異的抗体が作成され、これを用いた各 RBP の結合部位のゲノムワイドマッピング、細胞内局在の解析、トランスクリプトームへの影響解析が、若手の気鋭研究者によって精力的に行われている。この基盤的リソース情報は、特異的な RBP によって制御されているスプライシング、RNA 安定性、翻訳などの制御機構、ncRNA 機能の理解に大きく貢献すると考えられる。

・欧州 metaRNA ネットワーク

RNA と低分子代謝物との相互作用にフォーカスした中規模プロジェクトであり、欧州各国の 8 つの先導的な RNA 研究グループが参加して、リボスイッチ、アプタマーのような機能性 RNA モチーフに注目し、一方で細胞内での代謝産物自体の研究を並行して行い、その接点としての RNA- 低分子化合物の相互作用を利用したセンサーなどの RNA デバイスの開発を目指している。RNA に直接相互作用する化合物のスクリーニングは、製薬会社を含めて今後のトレンドになりつつあり、本プロジェクトから画期的な成果が生み出されることが期待できる。

・欧州 EXPERT プロジェクト

mRNA をベースにした癌、心疾患の遺伝子治療技術の改善を目的として 2020 年に開始された 5 年間のナノメディシンに関する欧州 10 か国が参加する研究プロジェクトである。mRNA のデリバリーを行う上で障壁となる様々な事象について集中的に研究する。

2.4

・中国科学院 (CAS) Key Laboratory of RNA

CAS の生物物理分野の1つの重点領域として ncRNA が掲げられ、米国在住の著名な中国人研究者の指揮のもとで、12 名の気鋭 PI が重要な機能性 ncRNA のネットワーク解析、ncRNA と相互作用因子解析、ncRNA の生物学的機能を3点について多面的かつ集中的に研究する体制が組織され、論文が量産されている。

・日本 FANTOM6 プロジェクト

理化学研究所が長年実施してきた FANTOM プロジェクトの 6 期目として、lncRNA に特化したプロジェクトが実施されている。特に各 lncRNA をアンチセンス核酸によって個別に機能阻害した結果、それによって影響を受ける遺伝子発現を理研オリジナルな CAGE-seq によって解析する研究を基軸にし、そのほかにも lncRNA とクロマチンとの相互作用を網羅的に解析する手法を開発し、エピジェネティック制御に関係する lncRNA 及び mRNA を網羅的に取得するなどの基盤的研究が大規模に展開し、最近主要な成果を複数の論文に報告した⁴⁸⁾。FANTOM プロジェクトは発足時から、遺伝情報リソースとして国際的にも評価が高い成果を生み出してきた。

・新学術領域「非コード RNA 作用マシナリー」

「ncRNA ネオタクソノミ」領域の後継領域として、ncRNA の機能と作動原理の理解を目指した。mRNA 制御についても「RNA 制御学」「新生鎖生物学」が2期に亘って継続してきた。いずれにおいても日本オリジナルな国際的に注目される先駆的成果が数多く生み出されている。例えば、lncRNA の共通機能を指標にした機能分類を目指しており、新たな機能としての細胞内構造体の骨格機能をもつ lncRNA をオリジナルな分類群として提唱した⁴⁹⁾。ここでは国際連携推進事業として国際交流が特に促進され、国内の優れた研究成果を海外に向けて発信するのに重要な役割を果たしている。

(5) 科学技術的課題

現在のゲノム科学は、脆弱なゲノム概要配列の上になんとか立脚している。最も完成度の高いヒトゲノム配列でさえ解読されているのは 90% 程度である。欠けている情報としては、Alu, LINE, LTR などの繰り返し配列の分布、セントロメア、長いゲノム重複領域などある。理由は、繰り返し配列が存在するゲノム上の位置を、従来の短いシーケンシング技術では確定しにくいからである。ヒトゲノムには 10 万塩基を超えるような繰り返し配列領域が存在し、解明は当面困難であろう。典型的な例はセントロメアであり、2,000～5,000 塩基を単位とした配列が数千個繰り返していると考えられ、全長は数百万塩基に達する。他にも脳疾患関連の遺伝子をコードした数百万塩基の長さの領域がコピーされている場所も知られている。単一細胞シーケンシングにおいて、1 遺伝子あたり数十～数千コピー存在する mRNA を解析する RNA-seq とは異なり、2 コピーしかないゲノムを対象とするエピゲノム解析では検出感度の向上が当面と課題と言える。例えば、最新の単一細胞 ATAC-seq 解析の報告においても 1 細胞あたり得られるリード数は数千～数万であり、ゲノムサイズを考慮するとそのカバー率は圧倒的に低い。

単一細胞解析において、位置情報取得への試みは行われているのに対し、時間情報に対するアプローチはほとんど行われていないのが現状である。一般に、単一細胞シーケンシング解析では細胞を溶解して DNA、RNA を抽出するため、時系列データを同一細胞から得ることはできない。ただし、トランスクリプトーム解析ではヌクレオチドアナログのパルスラベル等によるアプローチは可能である⁵⁰⁾。よって、時間解像度に優れる (ライブセル) イメージングとの連携など異なるアプローチが求められる。一方、情報科学的アプローチと

しては、Monocle⁵¹⁾ に代表される、データの並べ替えにより擬似的に時間情報を作り出す pseudo-time reconstruction の手法、最近では RNA velocity⁵²⁾ のようなスナップショットのトランスクリプトームデータから時間情報を抽出するような解析手法が提案されている。

ヌクレオーム研究の機軸となるのは、(1) 顕微鏡解析、(2) ゲノム解析、(3) 情報・数理解析であるが、これからのヌクレオーム研究の鍵となるのは情報・数理科学であり、生物科学との融合研究が期待されている。また、理論研究や機械学習が重要となる一方で、機械学習の教師となるようなさらに質や網羅性の高いデータを得る必要性も増してきている。

膨大な種類の long ncRNA による生体制御機構の全体像を理解し、医療応用への道筋をつけるためには、個々の long ncRNA 分子の機能を分子・細胞・個体レベルで丁寧に解析し、その特性に応じて分類・整理した上で、体系的に研究を推進するための戦略が必要である。

① lncRNA 作用機構の全貌解明

最近ゲノム編集やアンチセンス核酸を用いた lncRNA の機能スクリーニング成果が報告され、様々な生理活性を有する lncRNA の存在が明らかにされた。今後、それらの作用機構に関する個別の深掘り研究によって、small RNA も含めた ncRNA の多彩な作用機構や基盤ルールが明らかにする研究を速やかに推進する必要がある。また並行して個体レベルの ncRNA の機能探索を進めていくことによって、膨大な ncRNA の機能がタンパク質機能だけでは実現不可能な複雑な生命現象にどのように関与しているかの理解につながる。ncRNA の機能や作用ルールの解明は、これまで隠れていたゲノムの新機能とそれを支える新規な遺伝ルールという生物学上の本質的な知見の獲得につながる。

② RNA による細胞内制御環境形成の理解

ヒトのタンパク質全体の約 5% を占める RNA 結合タンパク質は、特異性を持って RNA に結合してその挙動を制御する役割を果たし、またその天然変性領域を介した多価的なタンパク質間相互作用によって、液体相転移によって空間的に隔離した局所環境を構築し、因子の隔離、生化学反応場、構造ハブとしての機能があることがわかってきた。例えば、そうした環境形成によって細胞核内のクロマチン 3D 構造が規定される際の lncRNA の役割の理解は、今後の重要な課題である。さらに液体相分離の原理に基づいた細胞内の環境構築機構やその動態、さらに生物学的意義を理解すること、またその異常に起因する疾患発症機構の解明が、新しい細胞内動態の制御コンセプトの確立につながる。

③ タンパク質合成過程における RNA 制御の複雑性と精密性の理解

解析技術の進展に伴って俯瞰的視点によって明らかになってきた RNA プロセッシング、輸送、翻訳の各段階の RNA 制御の複雑性と相互の連携、それらを支える品質管理の機構を、さらに深部まで理解することによって、複雑かつ堅牢な生命現象を支える RNA 制御の重要性の理解につながる。

(6) その他の課題

- ・ 基礎研究から応用技術開発への橋渡し体制の整備

最近 FDA によって認可されたアンチセンス核酸によるスプライシング改変を介した脊髄性筋萎縮症治療薬は、もともとスプライシング研究のパイオニアであった基礎研究者が、長年のノウハウを駆使して成し遂げた偉業である。また同じく FDA 認可までこぎつけた RNA 干渉治療薬開発も、RNA 干渉現象の発見から 20

年かけて成し遂げられたものである。このように、基礎研究者が自ら発見・構築したオリジナルな知見や技術を重視し、それを実用化に向けて、長い時間をかけてシームレスにサポートする体制が必要である。応用研究者と基礎研究者の認識のギャップは常に存在するものなので、双方の重要性を理解しマッチングするような「目利き」の人材育成が日本独自の医薬品開発を推進するために重要であろう。患者由来サンプルなどヒト検体の活用は、本領域の発展において不可欠である。一方で、倫理申請等の手続きが機関ごとに細分化されているため、許諾に時間がかかり、かつデータへのアクセスも容易ではなく、海外と比べても明らかに立ち遅れた状況にある。法的な整備も含めた国レベルでのシステムの整備は喫緊の課題である。

・最先端機器を用いた解析プラットフォームの整備

研究分野全体の推進のために、計測技術やバイオインフォマティクスのサポート、また抗体や遺伝子改変細胞株などのリソースを総合的にサポートする体制の構築が望まれる。欧米、中国、韓国では、最新鋭のサポート体制を効率化し、センター内外の研究推進に大きく貢献している。ゲノムに限っては、東北メディカルメガバンク、理化学研究所バイオリソース研究センター、東京大学ヒトゲノム解析センター、国立遺伝学研究所など小中規模の拠点の形成は行われている。しかし、今後見込まれるシーケンス量に対応できる規模はない。また、技術革新は早く、情報インフラなどは規模的にも不足することが予想される。大型研究機器（次世代シーケンサー、質量分析機など）は世代交代が早く、高価である上に、メンテナンスや運用、データ解析において高度な専門知識を要する。ゲノム解析・画像解析共、特に情報分野の人材不足が深刻である。これらは単独のラボで対応可能なレベルを大きく越えており、機器およびデータ解析環境の双方における大規模集約化が必要となり、国策としての拠点集約化が重要である。その際、拠点での利益誘導の排除やリソースへの他の研究者のアクセスの確保などの配慮が必要である。例えば、最近理研 FANTOM グループがアンチセンス核酸を用いた lncRNA 機能スクリーニングの成果を発表したが、このような貴重な日本オリジナルな基盤リソースを国内研究者が効率よく利用できる体制の整備が重要であろう。

(7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	○	→	一部の突出した研究成果が出されているものの、層が薄いことは否めない。特に、基本原理の発見や新規概念の創出、基盤技術開発などの基礎分野で米国や欧州に遅れをとり始めている。 また、次世代シーケンサーの導入や情報解析の遅れを取り戻すに至っておらず、新規技術・装置の導入の遅れはクライオ電子顕微鏡などにも見られている。そのなかで、ゲノムやクロマチン、RNAに関連する文科省新学術領域の活動が、本分野の継続的推進や若手育成を支えている。エビゲノムや一細胞解析に関連したJSTやAMEDのCRESTによるサポートも国産の新規技術の開発や多様な研究の推進に貢献している。 日本も1分子蛍光イメージング分野の開拓に貢献してきたことに加え、生細胞イメージングに適した超解像技術 ⁵³⁾ 、クライオ蛍光顕微鏡による超解像技術 ⁵⁴⁾ など独自技術の開発で世界に対峙している。また、独自のエビゲノム可視化プローブの開発も行われている。 一方、ゲノムコホートやFANTOMのような大型プロジェクトで構築されたリソースが国内研究者に十分に有効利用されているとはいえず、先駆的基礎研究に効率的に結びつける道筋の整備や予算配分の再検討も重要であろう。研究の裾野拡大と設備共用化等による効率化等により、この分野で実績を積み重ねてきた日本独自の研究を継続的にサポートし、次世代に向けて発展させていく体制作りと人材育成が重要な課題である。

2.4
俯瞰区分と研究開発領域
分子・細胞
基礎基盤科学技術

	応用研究 ・開発	○	→	NEDO/AMED プロジェクトによって推進された血中エクソソーム内マイクロ RNA による癌診断法は先導的な成果である。機能的アプタマー、核酸や化合物によるスプライシング病治療では、独創的な応用研究が成果に結びつきつつある。さらに、一細胞解析の技術移転やエピゲノム関連ベンチャーの導出なども行われており、一定の実用化が見られる。しかし、これらは稀な例であり、日本独自の優れた基礎研究成果を応用に向けて有機的につなげて行く試みは多くない。基礎と応用の守備範囲のギャップを埋めることに成功していない。リスクの許容、優れたシーズを見極めるセンス、最終的な実用化までを想定した息の長い研究体制を整備するなど多くの課題が存在する。製薬企業では化合物と相互作用する RNA を模索するなど、基礎研究に根ざした新しい RNA 創薬への展開を目指している動きもあり、今後の本格的な産学連携体制の整備が望まれる。
米国	基礎研究	◎	→	世界中から一流の研究者が集まり、依然として ゲノム、エピゲノム、RNA 研究の先端をリードしている。研究者の層が厚く、先駆的知見の獲得にとどまらず、その知見を補完し拡張していく二次的な動きが迅速であり、新しい研究分野の構築に至らせる力強さと精密さを兼ね備えている。4D Nucleome Initiativeの第一期が成功し、第二期の開始が決まっている。この Initiative でサポートされた研究成果の迅速なリリースやデータを統合するプラットフォームなどが整備され、研究成果が次の研究に広がる仕組みが構築されている。エピゲノムや RNA に特化した研究所が多く、研究機関に設立されており、エピゲノムや RNA 研究を多面的かつ集中的に行うことによって様々な先駆的な成果が生まれ、応用研究に向けた産学連携の拠点としても機能している。
	応用研究 ・開発	◎	→	基礎研究によって生み出された基盤的成果の中から様々な形での応用を想定したシーズを選定し、速やかにベンチャー企業等に委譲し、効率よく実用化を目指す仕組みがうまく機能している。基礎研究者はベンチャー企業のアドバイザーの役割を果たすことで互いに有益な関係性を確保し、大多数の若手研究者の受け皿としても機能している。
欧州	基礎研究	◎	→	日本と同様、伝統的な強みを生かした新しい独創的な研究が進められている。GAMや1細胞Hi-C、1細胞DamIDなどの新規技術は、欧州発である。各国独自のグラントに加えて、ECRグラントにより最先端研究や若手研究がサポートされる仕組みができています。また、複数国にまたがる共同研究の推進を行うためのグラントも整備されている。エピゲノム関連では多くの成果を挙げたBlueprintが2016年に終了したが、FLAGSHIPが2018年から始まっている。また、日本の新学術領域程度の中規模のグループグラントで、RNA生物学のホットトピックスを選りすぐりの研究グループで集中的に研究する体制が生まれ、高い成果を上げている。ドイツでは、独自のエピゲノム解析プロジェクトDEEPの終了後、一細胞解析やゲノムアーキテクトに関するグループグラントが発足しており、伝統を維持しつつも最先端研究を推進している。また、ドイツMax Plank研究所やオーストリアIMBA など、若手の優秀な研究者を世界中から集め、充実したリソースのもとで高い成果を生み出すことに成功している。
	応用研究 ・開発	○	→	米国ほどではないが、Galaxo-WellcomeやNovartis、Rocheなど大手製薬企業による基礎から応用研究までをカバーする研究所や研究費のサポートなど、シームレスな実用化への取り組みが行われている。mRNAナノメディシンに注力した国際プロジェクト（EXPERT）が開始され、今後の発展が期待される。

2.4

 俯瞰区分と研究開発領域
分子・細胞
基礎基盤科学技術

中国	基礎研究	◎	↗	次世代シーケンサーやクライオ電子顕微鏡などの最先端機器を多数整備し、豊富なマンパワーを投入するスタイルの大規模研究でも発展がめざましい。 発生初期や幹細胞のエピゲノム解析などで目覚ましい成果を挙げている。中国科学院（生物物理分野）の重点課題にノンコーディング RNA を挙げて、Key Laboratory を設置し、気鋭の研究者を結集させて研究費や研究環境を手厚くサポートし RNA 生物学を強力に推進している。 さらに、米国在籍の指導的な中国人研究者のリーダーシップによる RNA 修飾分野に、多大な研究資金を投入し、世界をリードしている。 近年では、中国国内で生み出された独自の成果が、一流雑誌に占める数が明らかに増加しており、こうした研究体制が高い成果に結びついていると言える。一方で、成果全体を俯瞰すると未だ玉石混交であり、高いレベルにあるのは一部の卓越した機関に限られている。
	応用研究・開発	○	↗	エピゲノムや RNA 分野に限ったことではないが、国家の研究費全体に占める応用研究費の割合は他の国に比べて極めて高い。その分、国内外で得られた多様な研究シーズを利用した応用研究に豊富な資金が投入されている。こちらも未だ玉石混交の感は否めないが、近いうちに中国発の画期的応用技術に結びつき、その動きはさらに加速していくものと思われる。
韓国	基礎研究	○	→	国家プロジェクトとして基礎研究に特化した Institute for Basic Science という組織の一部門に Center for RNA Research が設立され、国際的に著名なリーダー研究者に牽引されて優れた RNA の基礎研究成果が生み出されている。COVID-19 RNA の解析についても世界を牽引する先駆的成果を得ている。 IHECに参加したが目立った成果は出ていない。
	応用研究・開発	△	→	目立った活動・成果は見えていない。RNA 構造、機能の基盤的知見をナノテクノロジーと融合させた新規デバイスを開発する試みが盛んであり、今後独自の技術を用いた応用研究が進む可能性はある。

(註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

(註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDS の調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：顕著な活動・成果が見えていない

×：特筆すべき活動・成果が見えていない

(註3) トレンド ※ここ1～2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

参考・引用文献

- 1) F. Tang et al., “mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell”, *Nat. Methods* 6, no. 5 (2009) : 377-382. doi : 10.1038/nmeth.1315
- 2) V. Svensson, R. Vento-Tormo and S. A. Teichmann, “Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade”, *Nat. Protoc.* 13, no. 4 (2018) : 599-604. doi : 10.1038/nprot.2017.149
- 3) E. Z. Macosko et al., “Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets”, *Cell* 161, no. 5 (2015) : 1202-1214. doi : 10.1016/j.cell.2015.05.002

- 4) A. M. Klein et al., “Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells”, *Cell* 161, no. 5 (2015) : 1187-1201. doi : 10.1016/j.cell.2015.04.044
- 5) O. Hayashi et al., “Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 619. doi : 10.1038/s41467-018-02866-0
- 6) D. J. Burgess, “Spatial transcriptomics coming of age”, *Nat. Rev. Genet.* 20, no. 6 (2019) : 317. doi : 10.1038/s41576-019-0129-z
- 7) H. G. Stunnenberg, International Human Epigenome Consortium and M. Hirst, “The International Human Epigenome Consortium : A Blueprint for Scientific Collaboration and Discovery”, *Cell* 167, no. 5 (2016) : 1145-1149. doi : 10.1016/j.cell.2016.11.007
- 8) 木村 宏, 佐藤 優子 「ゲノム, エピゲノムからヌクレオームへ : 遺伝情報発現制御機構の包括的理解に向けて」『情報管理』60巻8号 (2017) : 555-563. doi : 10.1241/johokanri.60.555
- 9) 渡邊 愛 「新たな創薬アプローチとして期待される「エピゲノム創薬」」『大和総研グループ』, <https://www.dir.co.jp/report/consulting/other/101013.html> (2021年2月15日アクセス) .
- 10) 日本新薬 「骨髓異形成症候群治療剤「ビダーザ®注射用100mg」製造販売承認取得のお知らせ」『日本新薬』, https://www.nippon-shinyaku.co.jp/company_profile/news.php?id=156 topics/ns2011/2332 (2021年2月15日アクセス) .
- 11) N. L. Baskin and K. A. Haynes, “Chromatin engineering offers an opportunity to advance epigenetic cancer therapy”, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26, no. 10 (2019) : 842-845. doi : 10.1038/s41594-019-0299-6
- 12) D. A. Cusanovich et al., “Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing”, *Science* 348, no. 6237 (2015) : 910-914. doi : 10.1126/science.aab1601
- 13) J. D. Buenrostro et al., “Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation”, *Nature* 523, no. 7561 (2015) : 486-490. doi : 10.1038/nature14590
- 14) T. Nagano et al., “Single-cell Hi-C reveals cell- to-cell variability in chromosome structure”, *Nature* 502, no. 7469 (2013) : 59-64. doi : 10.1038/nature12593
- 15) T. Nagano et al., “Cell-cycle dynamics of chromosomal organization at single-cell resolution”, *Nature* 547, no. 7661 (2017) : 61-67. doi : 10.1038/nature23001
- 16) B. Lai et al., “Principles of nucleosome organization revealed by single-cell micrococcal nuclease sequencing”, *Nature* 562, no. 7726 (2018) : 281-285. doi : 10.1038/s41586-018-0567-3
- 17) A. Rotem et al., “Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state”, *Nat. Biotechnol.* 33, no. 11 (2015) : 1165-1172. doi : 10.1038/nbt.3383
- 18) P. J. Skene and S. Henikoff, “An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites”, *eLife* 6 (2017) : e21856. doi : 10.7554/elife.21856
- 19) H. S. Kaya-Okur et al., “CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells”, *Nat. Commun.* 10, no. 1 (2019) : 1930. doi : 10.1038/s41467-019-09982-5
- 20) A. Harada et al., “A chromatin integration labelling method enables epigenomic profiling

- with lower input”, *Nat. Cell Biol.* 21, no. 2 (2019) : 287-296. doi : 10.1038/s41556-018-0248-3
- 21) T. Handa et al., “Chromatin integration labeling for mapping DNA-binding proteins and modifications with low input”, *Nat. Protoc.* 15, no. 10 (2020) : 3334–3360. doi : 10.1038/s41596-020-0375-8
- 22) A. Bradbury and A. Plückthun, “Reproducibility : Standardize antibodies used in research”, *Nature* 518, no. 7537 (2015) : 27-29. doi : 10.1038/518027a
- 23) F. Edfors et al., “Enhanced validation of antibodies for research applications”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 4130. doi : 10.1038/s41467-018-06642-y
- 24) S. B. Rothbart et al., “An Interactive Database for the Assessment of Histone Antibody Specificity”, *Mol. Cell* 59, no. 3 (2015) : 502-511. doi : 10.1016/j.molcel.2015.06.022
- 25) A. Venkataraman et al., “A toolbox of immunoprecipitation-grade monoclonal antibodies to human transcription factors”, *Nat. Methods* 15, no. 5 (2018) : 330-338. doi : 10.1038/nmeth.4632
- 26) 廣瀬 哲郎, 泊 幸秀『ノンコーディングRNA—RNA分子の全体像を俯瞰する—』DOJIN BIOSCIENCE SERIES 25 (京都: 化学同人, 2016) , <https://www.rnaj.org/publications/item/363-noncoding-rna>.
- 27) T. Hirose, Y. Mishima and Y. Tomari, “Elements and machinery of non-coding RNAs : toward their taxonomy”, *EMBO Rep.* 15, no. 5 (2015) : 489-507. doi : 10.1002/embr.201338390
- 28) S. Iwasaki et al., “Defining fundamental steps in the assembly of the Drosophila RNAi enzyme complex”, *Nature* 521, no. 7553 (2015) : 533-536. doi : 10.1038/nature14254
- 29) T. Kondo et al., “Small peptides switch the transcriptional activity of Shavenbaby during Drosophila embryogenesis”, *Science* 329, no. 5989 (2010) : 336-339. doi : 10.1126/science.1188158
- 30) K. Hanyu-Nakamura et al., “Drosophila Pgc protein inhibits P-TEFb recruitment to chromatin in primordial germ cells”, *Nature* 451, no. 7179 (2008) : 730-733. doi : 10.1038/nature06498
- 31) S. Nakagawa, “Lessons from reverse-genetic studies of lncRNAs”, *Biochim. Biophys. Acta.* 1859, no. 1 (2016) : 177-183. doi : 10.1016/j.bbagr.2015.06.011
- 32) K. D. Meyer and S. R. Jaffrey, “Rethinking m6A Readers, Writers, and Erasers”, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33 (2017) : 319-342. doi : 10.1146/annurev-cellbio-100616-060758
- 33) D. Dominguez et al., “Sequence, Structure, and Context Preferences of Human RNA Binding Proteins”, *Mol. Cell* 70, no. 5 (2018) : 854-867.e9. doi : 10.1016/j.molcel.2018.05.001
- 34) B. R. Sabari et al., “Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control”, *Science* 361, no. 6400 (2018) : eaar3958. doi : 10.1126/science.aar3958
- 35) Y. Hua et al., “Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model”, *Nature* 478, no. 7367 (2011) : 123-126. doi : 10.1038/nature10485
- 36) M. Stoeckius et al., “Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells”,

- Nat. Methods* 14, no. 9 (2017) : 865-868. doi : 10.1038/nmeth.4380
- 37) L. Li et al., “Single-cell multi-omics sequencing of human early embryos”, *Nat. Cell Biol.* 20, no. 7 (2018) : 847-858. doi : 10.1038/s41556-018-0123-2
- 38) J. Cao et al., “Joint profiling of chromatin accessibility and gene expression in thousands of single cells”, *Science* 361, no. 6409 (2018) : 1380-1385. doi : 10.1126/science.aau0730
- 39) R. A. Beagrie et al., “Complex multi-enhancer contacts captured by genome architecture mapping”, *Nature* 543, no. 7646 (2017) : 519-524. doi : 10.1038/nature21411
- 40) S. A. Quinodoz et al., “Higher-Order Inter-chromosomal Hubs Shape 3D Genome Organization in the Nucleus”, *Cell* 174, no. 3 (2018) : 744-757.e24. doi : 10.1016/j.cell.2018.05.024
- 41) B. Lai et al., “Trac-looping measures genome structure and chromatin accessibility”, *Nat. Methods* 15, no. 9 (2018) : 741-747. doi : 10.1038/s41592-018-0107-y
- 42) B. Bintu et al., “Super-resolution chromatin tracing reveals domains and cooperative interactions in single cells”, *Science* 362, no. 6413 (2018) : eaau1783. doi : 10.1126/science.aau1783
- 43) S. Morita et al., “Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions”, *Nat. Biotechnol.* 34, no. 10 (2016) : 1060-1065. doi : 10.1038/nbt.3658
- 44) H. Wang et al., “CRISPR-Mediated Programmable 3D Genome Positioning and Nuclear Organization”, *Cell* 175, no. 5 (2018) : 1405-1417.e14. doi : 10.1016/j.cell.2018.09.013
- 45) S. L. Morgan et al., “Manipulation of nuclear architecture through CRISPR-mediated chromosomal looping”, *Nat. Commun.* 8 (2017) : 15993. doi : 10.1038/ncomms15993
- 46) H. Ma et al., “CRISPR-Sirius : RNA scaffolds for signal amplification in genome imaging”, *Nat. Methods* 15, no. 11 (2018) : 928-931. doi : 10.1038/s41592-018-0174-0
- 47) J. M. Kebschull and A. M. Zador, “Cellular barcoding : lineage tracing, screening and beyond”, *Nat. Methods* 15, no. 11 (2018) : 871-879. doi : 10.1038/s41592-018-0185-x
- 48) J. A. Ramilowski et al., “Functional annotation of human long noncoding RNAs via molecular phenotyping”, *Genome Res.* 30, no. 7 (2020) : 1060-1072. doi : 10.1101/gr.254219.119
- 49) T. Yamazaki et al., “Functional Domains of NEAT1 Architectural lncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation”, *Mol. Cell* 70, no. 6 (2018) : 1038-1053.e7. doi : 10.1016/j.molcel.2018.05.019
- 50) J. A. Schofield et al., “TimeLapse-seq : adding a temporal dimension to RNA sequencing through nucleoside recoding”, *Nat. Methods* 15, no. 3 (2018) : 221-225. doi : 10.1038/nmeth.4582
- 51) C. Trapnell et al., “The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells”, *Nat. Biotechnol.* 32, no. 4 (2014) : 381-386. doi : 10.1038/nbt.2859
- 52) G. La Manno et al., “RNA velocity of single cells”, *Nature* 560, no. 7719 (2018) : 494-498. doi : 10.1038/s41586-018-0414-6

- 53) S. Hayashi and Y. Okada, “Ultrafast superresolution fluorescence imaging with spinning disk confocal microscope optics”, *Mol. Biol. Cell* 26, no. 9 (2015) : 1743-1751. doi : 10.1091/mbc.E14-08-1287
- 54) T. Furubayashi et al., “Cryogenic Far-Field Fluorescence Nanoscopy : Evaluation with DNA Origami”, *J. Phys. Chem. B* 124, no. 35 (2020) : 7525-7536. doi : 10.1021/acs.jpcb.0c04721

2.4

俯瞰区分と研究開発領域
基礎基盤科学技術
分子・細胞