

2.3 基礎基盤

2.3.1 遺伝子発現機構

(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）など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的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と機能の相関や生理機能ネットワークを解明する領域を取り上げる。

(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、クロマチン、ゲノム高次構造、ヌクレオーム、ノンコーディングRNA、RNAプロセッシング、RNA修飾、翻訳制御、RNA-タンパク質複合体、液体相分離、核酸医薬、一細胞オミクス、次世代シーケンサー、RNAイメージング、バイサルファイト法、ChIP-seq、Hi-C法

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

ひとつの個体はさまざまな種類・分化段階の体細胞と生殖細胞により構成されている。ヒトは200種類以上、37兆個の細胞で構成されていると言われる。個体を構成する細胞はひとつの受精卵に由来するため、一部の免疫細胞などを除いて体細胞はすべて同じゲノムをもつ。それにも関わらず、個々の分化した細胞は多様な形態と機能をもっている。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（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だけでなく、確率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修飾の態様といえ、DNA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。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、体細胞では一旦受けたメチル化はDNA複製過程で維持され、娘細胞にも継承される。ヒストンはさまざまなアミノ酸が多様な翻訳後修飾を受ける。特にリジン残基のアセチル化、メチル化、ユビキチン化など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・各種疾患に至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、遺伝子の核内配置や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。クロマチン構造や核内高次構造はヒストン修飾など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、さまざま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、さまざま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。

このように遺伝子発現機構の全体像はまだ解明されていないことも多く、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ることから、“ヌクレオーム (Nucleome)” という概念も提唱されている。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、近年の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タログが作られた。また、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) に向けた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Pacific Biosciences社 (米国) が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。例えば2倍体のヒトゲノムの場合、米国illumina社のシーケンサーのデータと比較しながら、ソフトウェアによるデータ処理により精度を99.9% (残り0.1%は多型変異) にまで上げることができる。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。

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⁾。細胞の単離操作には、FACSによる細胞ソーティング、あるいは細胞の単離に特化したFluidigm社のC1システムが利用されている。一方、「細胞の単離」のステップを伴わない、ナノリットルスケールのドロップレットを利用する方法も開発されている (Drop-seq³⁾、inDrop⁴⁾ など)。オリゴDNAビーズと細胞懸濁液をマイクロ流路へ流し込み、形成したドロップレット内で単一細胞由来mRNAのビーズへのキャプチャーあるいは逆転写を行う。この方法では、単一細胞ごとにハンドリングする必要がなく、一度に数千~数万細胞を処理することが可能である。また、転写産物の定量法としては分子バーコード (Unique Molecular Identifier: UMI) により各遺伝子の3'末端のみをカウントする方法が現在の主流であるが、単一細胞レベルにおいて全長の転写産物を解析できる方法RamDA-seqも国内のグループにより報告された⁵⁾。これらに加え、翻訳中のRNAを測定するRibo-seq、キャップ構造を持つRNAのみを測定するTSS-seq、転写中のRNAを測定するNET-seqなどがある。つまり、転写のみならず、スプライシング、翻訳までを含めたより定量的なRNAの測定技術が次々と報告されてきている。

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、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、計算やマーカーとなる遺伝子の発現情報などの利用により、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⁾。空間トランスクリプトーム技術は、「空間網羅タイプ」と「局所深読みタイプ」に大別される⁷⁾。

2.3

俯瞰区分と研究開発領域 基礎基盤

「空間網羅タイプ」は、組織切片上で連続 *in situ* hybridization や *in situ* sequencing を行い蛍光顕微鏡によりRNAを検出する方法、あるいは、バーコード配列をもつDNAによりRNAをキャプチャーし次世代シーケンサーで解析する方法、などが開発されている。「局所深読みタイプ」としては、物理的に目的領域の細胞を切り出す方法や光操作により目的部位のRNAのみを検出する方法がある。空間トランスクリプトーム解析技術は一般的に難易度が高いが、目的によっては市販の装置も利用可能となっている。

【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。エピゲノム情報は多様である。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)。シーケンサーの低コスト化により、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、塩基が変異する率よりも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、重要な発現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現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用いる場合、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。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ており、米国(NIHによるロードマップ計画)、EU(BLUEPRINT3)などが公表されている。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⁸⁾、さまざまなヒト正常組織のエピゲノムデータが6000以上集積している。わが国もJST-CREST(2015年以降はAMED-CREST)「エピゲノム」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病気のエピゲノムなどを進めており、わが国からもAMED-CREST「早期ライフステージ」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。この棲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で2つの領域が空間的に近接して存在したり、ゲノム上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、ヒストン修飾などの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、分子動態など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という概念が形成された⁹⁾。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・数理モデル研究などの異分野が発展、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200 nmを超えることができないとされていたが、さまざまな超解像顕微鏡技術が開発され、100 nm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10 nm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。さまざまな転写因子や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¹⁰⁾。

超解像顕微鏡技術は米国やドイツが先行したが、わが国も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¹¹⁾、クライオ蛍光顕微鏡による超解像技術¹²⁾など独自技術の開発も行われている。また、独自のエピゲノム可視化プローブの開発も行われている。

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) 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¹³⁾、日本では日本新薬¹⁴⁾がライセンスし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、2006年にFDA承認; 日本では大鵬薬品が2011年に承認を取得) などが上市されている。

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などを変化させることで、遺伝子発現を制御するものである¹⁵⁾。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、この人工的な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¹⁶⁾。クロマチンのアクセシビリティを検出するATAC-seq^{17, 18)}、クロマチン高次構造を検出するHi-C^{19, 20)}、ヌクレオソームの位置を検出するMNase-seq²¹⁾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²²⁾。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&RUN²³⁾、抗体と Tn5 トランスポザーゼを結合させた CUT&Tag²⁴⁾、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-seq²⁵⁾ 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²⁶⁾。

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ている^{27, 28)}。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特異性を上げた組換え抗体の利用が推奨されている。ヒストン修飾抗体の特異性に関する包括的データベースの作成²⁹⁾や、NIH 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³⁰⁾など、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。わが国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には限定的である。

【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、20~30塩基程度の鎖長のsmall RNA、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^{31, 32)}(後述のように、非コードとされていたRNAからもペプチド鎖が合成されている場合も多く見つかると、この定義自体を見直す必要もでてきている)。

・ 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が関わるさまざま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)に関してもわが国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、GalNAcなどの糖鎖修飾技術をはじめとした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など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つとして、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る試みも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、韓国とともにわが国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³³⁾。

・ long ncRNA (lncRNA)

数百塩基を超えるlncRNA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、さまざまな疾患においてlncRNA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を用いてlncRNAの機能性が網羅的にスクリーニングされ、多くのlncRNAに細胞種特異的な機能が確認された。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。近年、細胞内の凝集体 (液滴) 形成がさまざまな機能制御に働くことが示されているが、RNA複合体の凝集体についても機能解析が進んでいる³⁴⁾。

古典的RNA生物学と最新知見の融合研究が進められている。ncRNAに関する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二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が関与するさまざまな過程を、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が関与するさまざまな過程において新たな発見がなされている。リボソームプロファイリング技術によって、細胞分化、ストレス応答、脳機能、がんなどの疾患、疾患治療薬の標的としてダイナミックな翻訳制御が用いられていることも明らかになってきた³⁵⁾。さらには、リボソームの衝突や一時停止などに応答したリボソーム品質管理の機構が解明され、それらが老化などの生理現象に与える影響が明らかになっている³⁶⁾。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など、これまでの配列予測からは想定されないタンパク質が合成されることも示されており、ncRNAとmRNAの境界は極めて曖昧である。例えば、lncRNA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^{37, 38)}。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、lncRNAには品質管理機構による分解を免れているものも多い。さらに特殊なスプライシングを受けて環状化し安定化したlncRNAが、microRNAを効率よくトラップする「スポンジ」として働いている例も知られている³⁹⁾。したがって、mRNAかncRNAか、あるいはsmall RNAかlncRNAか、という画一的な区分けにとらわれず、それらの複雑で巧妙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⁴⁰⁾。現時点では、大多数のlncRNAは手つかずの状態であり、今後、「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ことを期待される。

転写後修飾に関しては、mRNAやlncRNAに多数のN6-メチルアデノシン (m6A) 修飾が付加され、スプライシング、mRNA安定性、mRNA輸送、翻訳制御に大きな役割を果たしていることが示された³⁴⁾。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。また、m6A修飾とヒストン修飾の間のクロストークについても研究が進んでいる⁴¹⁾。中国では潤沢な資金援助を受けて、RNA修飾の医学や農学への応用を含めて研究が拡大している。

近年、最先端の解析技術により、翻訳やtRNAに関する新たな知見が得られ、その重要性が再認識されている。同時にリボソームやスプライソソームといった巨大複合体による化学反応の各段階がクライオ電子顕微鏡を駆使した構造解析で明らかにされ、遺伝子発現の流れを原子レベルで理解する時代が到来した⁴²⁾。こうした中でSARS-CoV-2 RNAに見られる新たなキャップ付加や翻訳制御の機構も解明され、さらに、SARS-CoV-2由来の複数のタンパク質が宿主細胞のさまざまな遺伝子発現段階をブロックする機構などウイルスRNAに関する新たな制御機構に注目が集まっている⁴³⁾。

RNA制御には、共通して多数のRNA結合タンパク質 (RBP) が関与することが知られており、ヒトでは1,500種類ほど存在している。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進行しており、RNA研究の有用なリソースとなると考えられる⁴⁴⁾。一方で、各RBPの結合特異性は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。多くのRBPが有する天然変性領域による液-液相分離の研究もlncRNAと関連させて大きく展開しており、相分離を介して形成される細胞内非膜性構造体の機能や動態制御、さらには神経変性疾患などの疾患との関連について研究が進んでいる⁴⁵⁾。

RNA生物学の応用研究も大きく発展を遂げている。特筆すべきは、新型コロナウイルスワクチンとして実用化されたことによって、mRNAワクチンが最新の創薬モダリティとして世界中で開発競争が激化していること

である。わが国でも政府主導のワクチン開発拠点が大学に設置された。mRNAワクチン技術は、これまでのRNAの基礎研究の知見が集約されたものであることから、改めて基礎研究の重要性が認識されるべきである。また、スプライシングを人為的に改変すること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で認可され、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、これに続く治療法の開発が急速に進むと考えられる。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わが国を含めて成果が上がりつつある。今後のトレンドとなりそうな動きとしては、RBPによる細胞内相分離を標的とした創薬開発が欧米を中心に盛んになりつつある。

米国、中国、韓国、欧州ではRNAの公的な研究拠点が設立され、特に重要な研究領域として強力で推進されている。

【論文・特許動向】

- ・ 領域全体の論文数は10年間で2.5倍に漸増している。
- ・ 論文数の国別推移では、中国の増加が顕著であり、2019年に米国を抜いて以降首位となっている。米国、欧州も論文数を増やしているが、シェアは低下している。高被引用論文数では米国が首位を維持している。日本の論文数は中国、米国、ドイツ、英国に次いで5位である。
- ・ 特許ファミリー件数は全体では10年間で1.8倍に漸増している。2022年において、米国の特許ファミリー件数シェアが40%を越えて1位。中国も出願数を増やしており、シェア30%を越えて2位である。日本の特許ファミリー件数は米国、中国、ドイツ、韓国に次いで5位である。
- ・ Patent Asset Indexのシェアは米国が70%に迫る1位で他を圧倒しており、ドイツが2位となっている。Patent Asset Index順では、MITやBroad Instituteなど米国研究機関が上位を占めている。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

・ 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種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、今後の技術開発のトレンドとなることが予想される^{16, 17)}。例えば、CITE-seq⁴⁶⁾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DNAを定量する。scCOOL-seq⁴⁷⁾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-CAR⁴⁸⁾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で、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²⁶⁾。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

米国10x Genomics社の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が導入している。さらに、Chromiumシステムをベースにした単一細胞ATAC-seqキットの販売が開始されている。また、米国BioLegend社と共同で「TotalSeq」というオリゴ結合抗体などのCITE-seq用キットが販売された。空間的遺伝子発現解析システム(Visium)も販売されている。

・ CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 はその操作性、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などにおけるゲノム編集ツールの第一選択になっている。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⁴⁹⁾、遺伝子の核内局在やクロマチン高次構造の編集^{50, 51)}、特定のゲノム領域の可視化への応用⁵²⁾、cell barcodingによるlineage tracing⁵³⁾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。

・ クロマチン高次構造解析

クロマチン高次構造解析のスタンダードである、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GAM⁵⁴⁾、multiplexing法に用いられるsplit-and-poolの概念を応用したSPRITE⁵⁵⁾、Tn5トランスポザラーゼを利用したTRAC-looping⁵⁶⁾などがある。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⁵⁷⁾。また、ゲノム構造の生細胞動態の解析も急速に進んでいる。ゲノム領域の生細胞動態解析と計算機シミュレーションによりクロマチンループが動的であることが示され^{58, 59)}、また、発生過程におけるエンハンサーとプロモーターの相互作用と遺伝子発現についての理解も進んでいる^{60, 61)}。

・ 翻訳制御研究の新展開

リボソームは最も古典的なRNA複合体装置であるが、リボソームの異常を感知する品質管理機構の研究が盛り上がりを見せている。最近ではリボソーム衝突、一時停止、ダイリボソーム形成、MARylationなどの修飾がリボソームや結合mRNAの挙動に大きく影響することが発見された³⁶⁾。一方で、翻訳因子の新たな機能やRBPとその相分離を介した翻訳制御の報告、さらには、記憶の統合などの脳機能、精神疾患への薬理効果、老化などの高次生命現象に、翻訳制御が深く関わっている事例が数多く報告されており、リボソームプロファイリング法による網羅的な翻訳活性の測定技術を組み合わせることによって、さまざまな生命現象や疾患における翻訳制御の重要性の理解が進むことが期待される。一方で、リボソームをはじめとした巨大RNA構造体の高精度な構造解析が主にクライオ電子顕微鏡を用いて、次々と明らかにされており、翻訳やスプライシングなどの多段階反応の各ステップとその流れが原子レベルで理解される時代が到来した⁴²⁾。

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

lncRNAを骨格にした相分離非膜性構造体の研究が特に注目を集めており、NEAT1、NORAD、XISTといった代表的なlncRNAがRBPと足場となる複合体を作り、そこに液-液相分離(LLPS)を介して多数のRBPやエピジェネティック制御因子を集約することが定量的に示された⁶²⁾。これによって、ごく少量のlncRNAを起点してLLPSが誘発された結果、巨大なタンパク質ネットワークとしての非膜性構造体が形成され、細胞内のハブとして機能する概要が理解された。

RBPに共通して含まれ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(LLPS)が、細胞内の非膜系構造体形成の原動力になっていることが明らかになった⁴⁵⁾。この機構は、膜を介さずに特定の因子を空間的に隔離、濃縮し、特異的生化学反応の場、クロマチン構造ハブとして働くことが提唱されている。実際に温度ストレスに応答した遺伝子発現制御に関わる制御因子のリン酸化の場として働くこと⁶³⁾、エピジェネティック制御因子の隔離、ES細胞分化に応じたクロマチン構造変化などの場として働くことなどが報告された。この機構でRNAは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さまざまな様式で関与していることが明らかになってきた。特に少数のlncRNAがRBPと形成した複合体を足場とした相分離によって数百倍ものRBPを非膜構造体に係留できることが、複数のlncRNAで報告され、この相分離誘発がlncRNAの代表的な機能様式と考えることができる⁶⁴⁾。

・RNA-タンパク質複合体

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ている。一方、ディープラーニングによってRNA構造を予測する手法の有効性も示された⁶⁴⁾。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、その成果が公共データベースにて公開されている⁶⁵⁾。さらに網羅的なRBPの結合キネティクス解析のような一歩踏み込んだ相互作用解析系も開発されている。高精度または高感度なRNAのイメージング解析でも新たな進展がある。細胞内mRNAの1分子追跡によって、これまで翻訳阻害されたmRNAの貯蔵場とされていたストレス顆粒で通常の翻訳が行われていることが示された⁶⁶⁾。また、転写途上RNAの1分子解析によってスプライシング動態の詳細が明らかにされた。

・RNA関連創薬

FDAによって認可された脊髄性筋萎縮症治療薬ヌシネルセンは、スプライシングを改変するアンチセンス核酸⁶⁷⁾であり、RNAを標的とした核酸医薬品としての画期的な成果である。その後、10種類を越す疾患を標的としたアンチセンス核酸薬の報告が続いている。一方で、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2018年にFDA認可され、RNA干渉創薬開発にも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。わが国でも神経疾患関連のリポート配列由来RNAに結合する化合物が得られている。一方で、新型コロナウイルスワクチンとして実用化されたmRNAワクチンの有効性から、今後のRNA創薬モダリティの中心になる可能性がある。一方で、RBPによる細胞内相分離体と疾患との関わりが注目されており、相分離体を標的とした創薬開発を中心に行うベンチャー企業が設立された。また相分離体には特定の抗がん剤化合物が濃縮され、相分離が化合物の活性に大きく影響することも報告されており、人為的に相分離体を形成・操作する技術にも注目が集まっている。

[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」として開始され、2022年予算が2800万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⁹⁾。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など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、専門用語などの共通化、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など、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。欧州でも同様のプロジェクトとして4D Nucleome 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500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⁶⁵⁾。現在は、ENCORE (Encyclopedia of RNA Elements) と名前を変えたデータベースサ

イトとして運営されている。

・欧州 EXPERT プロジェクト

mRNAをベースにしたがん、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か国が参加する産学連携の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さまざまな事象について集中的に研究する。mRNAワクチンの実用化を受けて、その重要性に注目が集まっている分野である。

・日本 FANTOM6 プロジェクト (phase 2)

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。これまで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によって解析する機能解析研究を基軸にした優れた成果が得られていたが⁶⁸⁾、2022年度からそのphase2としてlncRNAとクロマチンやタンパク質因子との分子間相互作用を網羅的に解析することを主軸にしたプロジェクトが開始された。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。FANTOM6からもすでに生理活性をもつ新規lncRNAを発見するなどの重要な成果が得られており、今後の相互作用解析によって、細胞毎のRNAを介したエピゲノム制御の網羅的な基盤リソース知見が得られることが期待される。

・JST 戦略的創造研究推進事業、科研費新学術領域研究・学術変革領域研究

ncRNAの機能と作動原理の理解を目指した新学術領域「非コードRNA作用マシナリー」が「ncRNAネオタクソミ」領域に継続され共に事後評価でA+の高い評価を得た。一方mRNA制御についても「RNA制御学」「新生鎖生物学」が2期に渡って継続している。いずれの領域においてもわが国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おり、こうした選りすぐりの基礎的課題に対する継続的なサポートは、わが国のRNA研究の国際的な優位性の確保、国際交流、若手人材の育成の推進に大きく貢献してきた。2021年度からncRNAや天然変性タンパク質に関する学術変革研究A「非ドメイン生物学」領域、2020年度から翻訳制御に関する学術変革研究B「パラメトリック翻訳」領域が発足し、関連領域の継続的な発展が期待される。クロマチン関連では、学術変革研究A「個体の細胞運命決定を担うクロマチンのエピコードの解読」が2024年に発足し、また、2024年度に終了するERATO「胡桃坂クロマチンアトラスプロジェクト」に続いて、CREST生命力の中にも関連プロジェクトが見られる。

(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。個人間のゲノムの差異、RNA-seq技術による遺伝子発現量の定量化、エピゲノムデータの収集は、どれもゲノム配列にDNA断片をアライメントすることで成立している。

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課題と言える。最新の単一細胞ATAC-seq解析においては、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。

現状、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が、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。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などによるアプローチは可能である⁶⁹⁾。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。この観点から、最近生細胞から経時的に細胞質を採取するLive-seq技術が開発された⁷⁰⁾。一方、情報科学的アプローチとしては、Monocle⁷¹⁾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、RNA velocity⁷²⁾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、その中でも情報科学・数理科学分野が要である。これまでも情報科学はハードとソフトの両面から顕微鏡画像解析やゲノム解析の発展を支えてきた。これからのヌクレオーム研究の鍵となるのもまさしく情報・数理科学であり、生物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. ncRNA 作用機構の全貌解明

lncRNA中で機能解析が行われたものは限られており、予想もしない新機能を持つlncRNAが潜んでいる可能性がある。その一例として、最近、糖鎖と結合して細胞表面に提示される一群のglyco RNAが発見された⁷³⁾。また、すでに機能的知見が得られているsmall RNAも含めてncRNAの作動装置の構造と作用機構のさらなる理解が重要である。また、細胞・個体でのncRNAの機能探索を継続的に進めていくことによって、膨大なncRNA機能が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理解につながる。

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的な制御環境を構築することがわかってきた。そうした環境形成によって細胞内がどのように区画され、それによって複雑な生化学反応やシグナル伝達経路がどのように隔離・統合されるのか、さらには細胞核内のクロマチン3D構造を規定する機構などの理解は、今後の重要な課題である。さらに液-液相分離の異常に起因する疾患発症機構の解明が、新しい創薬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、翻訳の各段階の複雑性とそれを支える品質管理の機構、それらの高次生命現象への関与を詳細かつ定量的に理解することが、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

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、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。同じく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。さらに新型コロナウイルスmRNAワクチンには、わが国の研究者を含めたRNA基礎研究者によるmRNAプロセッシング機構やRNA修飾の基盤的知見が凝集している。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。最近注目されているRNAと直接相互作用する低分子化合物は、核酸医薬品と共にRNAを標的とした創薬ツールとして有望であろう。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」の人材育成がわが国独自の医薬品開発を推進するために重要である。

・オリジナル解析系とリソースとサポート体制の整備

次世代シーケンス、高感度質量分析、クライオ電子顕微鏡、光学イメージング、ゲノム編集などは、生物

学全体で共通の先端技術であるが、それらを改変して開発されたRNA解析に特化した基盤技術（CLIP, ChIRP など）が存在する。現在の単一細胞解析、そして今後の組織・個体レベルでの生命活動の包括的理解に向けて、トランスクリプトームやエピゲノム情報に加え、メタボローム、プロテオーム情報などを統合した「トランスオミクス」の理解が求められる⁷⁴⁾。そのためには、各種オミクスデータ量の爆発的増加への対応（インフラ含め）、研究グループ間の緊密な連携体制、分野横断的解析手法の確立が急務となる。

研究分野全体の推進のために、上記解析技術やバイオインフォマティクスのサポート、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、有力研究機関単位で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。わが国でもハブ研究機関の設立や既存機関の整備が望まれる。

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。科学研究費「ゲノム支援」やAMED-BINDSなどによる支援はあるものの、必要量を満たしているとはいいがたく、次世代研究者の育成にも課題がある。さらに、この分野の技術革新は速く、情報インフラなどは規格的にも質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。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集約化と研究者育成が必要となり、国策としての拠点形成が重要である。

Monocle など1細胞解析データを理解するためのさまざまな手法が考案、実装されているが、それを主導しているのはバイオインフォマティクス分野ではなく、統計・数理を専門とする“分野外”の研究者である。現時点では生物系オミクス情報データは1解析当たりのデータ量は膨大であるが、解析コストの制約から解析件数は多くなく、deep learningなど人工知能が活躍する場は限られている。今後、海外と連携して、データベースの活用が進んだ際に人工知能研究者などが参入しやすい状況を整備しておくことが肝要と考える。臨床応用に当たってはゲノム解析・画像解析とも、特に情報分野の圧倒的な人材不足が深刻である。

(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	○	→	論文数や被引用数の多い論文数の低下傾向は、この分野においても例外ではない。突出した研究成果は一部出ているが、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の遅れが顕著。また、次世代シーケンサー導入や情報解析の遅れを取り戻すどころか、ますます差が開いている。そのなかで、ゲノムやクロマチン、RNAに関連する文科省学術変革領域の活動が、本分野の継続的推進や若手育成を支えている。エピゲノムや1細胞解析、ゲノム合成に関連したJSTやAMEDのCREST、さきがけ、PRIMEなどによるサポートは多様な研究の推進に貢献しているが、国産の新規技術の開発には必ずしも結びついていない。さらに、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ない。
	応用研究・開発	○	↘	機能性アプタマー、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、1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はない。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る。

2.3 俯瞰区分と研究開発領域
基礎基盤

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、第二期も多くの成果が出ている。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の研究機関に設立されており、エピゲノムやRNA、関連する情報解析、イメージングなどの研究を多面的かつ集中的に行うことによってさまざま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さまざま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などに委譲し、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	◎	→	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、1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、GSK 社や Novartis 社、Roche 社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。欧米のトップ研究者による細胞内相分離体を標的とした創薬開発のベンチャー企業が設立された。
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目覚ましい。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、欧米の借り物ではない中国国内で生み出された独自の成果が、一流雑誌を占める数が米国をも凌駕しつつあり、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。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。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。次世代シーケンスのベンチャーも多数創出されており、価格面での競争力がある。

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まれている。何人かのレベルの高い研究者によって独自の成果が生まれている一方で、他国に比べると層が薄く分野にも偏りがある感が否めない。IHECにも参加したが目立った成果は出されていない。
	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。
その他の国・地域	基礎研究	○	→	カナダ、シンガポール、台湾、オーストラリアには優れたRNA研究グループが複数存在し、質の高い基礎研究を展開している。
	応用研究・開発	◎	↗	米国のRNA研究を牽引するシンガポール出身の研究者がシンガポールでのトランスレーショナル研究に参与している。オーストラリアではRNA創薬研究を重要分野と認定し関連研究施設が指導した。

(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

参考文献

- 1) Fuchou Tang, et al., “mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell,” Nature Methods 6, no. 5 (2009) : 377-382., doi: 10.1038/nmeth.1315.
- 2) Valentine Svensson, Roser Vento-Tormo and Sarah A. Teichmann, “Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade,” Nature Protocols 13, no. 4 (2018) : 599-604., doi: 10.1038/nprot.2017.149.
- 3) Evan 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) Allon 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) Tetsutaro Hayashi, et al., “Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs,” Nature Communications 9 (2018) : 619., doi: 10.1038/s41467-018-02866-0.
- 6) Darren J. Burgess, “Spatial transcriptomics coming of age,” Nature Reviews Genetics 20, no. 6 (2019) : 317., doi: 10.1038/s41576-019-0129-z.
- 7) 沖真弥, 大川恭行 企画「特集：空間トランスクリプトーム」『実験医学』39 巻 14 号 (2021).
- 8) Hendrik G. Stunnenberg, The International Human Epigenome Consortium and Martin 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.
- 9) 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., <https://doi.org/10.1241/johokanri.60.555>.
- 10) Yuko Sato, Masaru Nakao and Hiroshi Kimura, "Live-cell imaging probes to track chromatin modification dynamics," *Microscopy* 70, no. 5 (2021) : 415-422., doi: 10.1093/jmicro/dfab030.
 - 11) Shinichi Hayashi and Yasushi Okada, "Ultrafast superresolution fluorescence imaging with spinning disk confocal microscope optics," *Molecular Biology of the Cell* 26, no. 9 (2015) : 1743-1751., doi: 10.1091/mbc.E14-08-1287.
 - 12) Taku Furubayashi, et al., "Cryogenic Far-Field Fluorescence Nanoscopy: Evaluation with DNA Origami," *The Journal of Physical Chemistry B* 124, no. 35 (2020) : 7525-7536., doi: 10.1021/acs.jpccb.0c04721.
 - 13) 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」」株式会社大和総研, <http://www.dir.co.jp/consulting/insight/management/101013.html>, (2023年2月14日アクセス) .
 - 14) 日本新薬株式会社「骨髄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」<https://www.nippon-shinyaku.co.jp/news/news.php?id=156>, (2023年2月14日アクセス) .
 - 15) Natecia L. Baskin and Karmella A. Haynes, "Chromatin engineering offers an opportunity to advance epigenetic cancer therapy," *Nature Structural & Molecular Biology* 26, no. 10 (2019) : 842-845., doi: 10.1038/s41594-019-0299-6.
 - 16) Akihito Harada, Hiroshi Kimura and Yasuyuki Ohkawa, "Recent advances in single-cell epigenomics," *Current Opinion in Structural Biology* 71 (2021) : 116-122., doi: 10.1016/j.sbi.2021.06.010.
 - 17) Darren 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.
 - 18) Jason D. Buenrostro, et al., "Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation," *Nature* 523, no. 7561 (2015) : 486-490., doi: 10.1038/nature14590.
 - 19) Takashi 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.
 - 20) Takashi Nagano, et al., "Cell-cycle dynamics of chromosomal organization at single-cell resolution," *Nature* 547, no. 7661 (2017) : 61-67., doi: 10.1038/nature23001.
 - 21) Binbin 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.
 - 22) Assaf Rotem, et al., "Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state," *Nature Biotechnology* 33, no. 11 (2015) : 1165-1172., doi: 10.1038/nbt.3383.
 - 23) Peter J. Skene and Steven Henikoff, "An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites," *eLife* 6 (2017) : e21856., doi: 10.7554/eLife.21856.
 - 24) Hatice S. Kaya-Okur, et al., "CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells," *Nature Communications* 10 (2019) : 1930., doi: 10.1038/s41467-019-09982-5.
 - 25) Akihito Harada, et al., "A chromatin integration labelling method enables epigenomic profiling with lower input," *Nature Cell Biology* 21, no. 2 (2019) : 287-296., doi: 10.1038/s41556-018-0248-3.

- 26) Tetsuya Handa, et al., “Chromatin integration labeling for mapping DNA-binding proteins and modifications with low input,” *Nature Protocols* 15, no. 10 (2020) : 3334-3360., doi: 10.1038/s41596-020-0375-8.
- 27) Andrew Bradbury and Andreas Plückthun, “Reproducibility: Standardize antibodies used in research,” *Nature* 518, no. 7537 (2015) : 27-29., doi: 10.1038/518027a.
- 28) Fredrik Edfors, et al., “Enhanced validation of antibodies for research applications,” *Nature Communications* 9 (2018) : 4130., doi: 10.1038/s41467-018-06642-y.
- 29) Scott B. Rothbart, et al., “An Interactive Database for the Assessment of Histone Antibody Specificity,” *Molecular Cell* 59, no. 3 (2015) : 502-511., doi: 10.1016/j.molcel.2015.06.022.
- 30) Anand Venkataraman, et al., “A toolbox of immunoprecipitation-grade monoclonal antibodies to human transcription factors,” *Nature Methods* 15, no. 5 (2018) : 330-338., doi: 10.1038/nmeth.4632.
- 31) 廣瀬哲郎, 泊幸秀 編『ノンコーディングRNA : RNA分子の全体像を俯瞰する』(京都: 化学同人, 2016).
- 32) Tetsuro Hirose, Yuichiro Mishima and Yukihide Tomari, “Elements and machinery of non-coding RNAs: toward their taxonomy,” *EMBO Reports* 15, no. 5 (2014) : 489-507., doi: 10.1002/embr.201338390.
- 33) Shintaro 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.
- 34) Tetsuro Hirose, et al., “A guide to membraneless organelles and their various roles in gene regulation,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2022)., doi: 10.1038/s41580-022-00558-8.
- 35) Cédric Gobet and Felix Naef, “Ribosome profiling and dynamic regulation of translation in mammals,” *Current Opinion in Genetics & Development* 43 (2017) : 120-127., doi: 10.1016/j.gde.2017.03.005.
- 36) Kevin C. Stein, et al., “Ageing exacerbates ribosome pausing to disrupt cotranslational proteostasis,” *Nature* 601, no. 7894 (2022) : 637-642., doi: 10.1038/s41586-021-04295-4.
- 37) 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.
- 38) Kazuko 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.
- 39) Erika Lasda and Roy Parker, “Circular RNAs: diversity of form and function,” *RNA* 20, no. 12 (2014) : 1829-1842., doi: 10.1261/rna.047126.114.
- 40) Shinichi Nakagawa, “Lessons from reverse-genetic studies of lncRNAs,” *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1859, no. 1 (2016) : 177-183., doi: 10.1016/j.bbagr.2015.06.011.
- 41) Ryan L. Kan, Jianjun Chen and Tamer Sallam, “Crosstalk between epitranscriptomic and epigenetic mechanisms in gene regulation,” *Trends in Genetics* 38, no. 2 (2022) : 182-193., doi: 10.1016/j.tig.2021.06.014.
- 42) Andrei A. Korostelev, “The Structural Dynamics of Translation,” *Annual Review of Biochemistry* 91 (2022) : 245-267., doi: 10.1146/annurev-biochem-071921-122857.

- 43) Abhik K. Banerjee, et al., “SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses,” *Cell* 183, no. 5 (2020) : 1325-1339.e21., doi: 10.1016/j.cell.2020.10.004.
- 44) Daniel Dominguez, et al., “Sequence, Structure, and Context Preferences of Human RNA Binding Proteins,” *Molecular Cell* 70, no. 5 (2018) : 854-867., doi: 10.1016/j.molcel.2018.05.001.
- 45) Simon Alberti and Anthony A. Hyman, “Biomolecular condensates at the nexus of cellular stress, protein aggregation disease and ageing,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 22, no. 3 (2021) : 196-213., doi: 10.1038/s41580-020-00326-6.
- 46) Marlon Stoeckius, et al., “Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells,” *Nature Methods* 14, no. 9 (2017) : 865-868., doi: 10.1038/nmeth.4380.
- 47) Lin Li, et al., “Single-cell multi-omics sequencing of human early embryos,” *Nature Cell Biology* 20, no. 7 (2018) : 847-858., doi: 10.1038/s41556-018-0123-2.
- 48) Junyue 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.
- 49) Sumiyo Morita, et al., “Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions,” *Nature Biotechnology* 34, no. 10 (2016) : 1060-1065., doi: 10.1038/nbt.3658.
- 50) Haifeng 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.
- 51) Stefanie L. Morgan, et al., “Manipulation of nuclear architecture through CRISPR-mediated chromosomal looping,” *Nature Communications* 8 (2017) : 15993., doi: 10.1038/ncomms15993.
- 52) Hanhui Ma, et al., “CRISPR-Sirius: RNA scaffolds for signal amplification in genome imaging,” *Nature Methods* 15, no. 11 (2018) : 928-931., doi: 10.1038/s41592-018-0174-0.
- 53) Justus M. Kecsull and Anthony M. Zador, “Cellular barcoding: lineage tracing, screening and beyond,” *Nature Methods* 15, no. 11 (2018) : 871-879., doi: 10.1038/s41592-018-0185-x.
- 54) Robert A. Beagrie, et al., “Complex multi- enhancer contacts captured by genome architecture mapping,” *Nature* 543, no. 7646 (2017) : 519-524., doi: 10.1038/nature21411.
- 55) Sofia 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.
- 56) Binbin Lai, et al., “Trac-looping measures genome structure and chromatin accessibility,” *Nature Methods* 15, no. 9 (2018) : 741-747., doi: 10.1038/s41592-018-0107-y.
- 57) Bogdan 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.
- 58) Michele Gabriele, et al., “Dynamics of CTCF- and cohesin-mediated chromatin looping revealed by live-cell imaging,” *Science* 376, no. 6592 (2022) : 496-501., doi: 10.1126/science.abn6583.
- 59) Pia Mach, et al., “Cohesin and CTCF control the dynamics of chromosome folding,” *Nature*

- Genetics 54, no. 12 (2022) : 1907-1918., doi: 10.1038/s41588-022-01232-7.
- 60) Philippe J. Batut, et al., "Genome organization controls transcriptional dynamics during development," Science 375, no. 6580 (2022) : 566-570., doi: 10.1126/science.abi7178.
- 61) Michal Levo, et al., "Transcriptional coupling of distant regulatory genes in living embryos," Nature 605, no. 7911 (2022) : 754-760., doi: 10.1038/s41586-022-04680-7.
- 62) Yolanda Markaki, et al., "Xist nucleates local protein gradients to propagate silencing across the X chromosome," Cell 184, no. 25 (2021) : 6212., doi: 10.1016/j.cell.2021.11.028.
- 63) Kensuke Ninomiya, et al., "LncRNA-dependent nuclear stress bodies promote intron retention through SR protein phosphorylation," The EMBO Journal 39, no. 3 (2020) : e102729., doi: 10.15252/embj.2019102729.
- 64) Juan Pablo Unfried and Igor Ulitsky, "Substoichiometric action of long noncoding RNAs," Nature Cell Biology 24, no. 5 (2022) : 608-615., doi: 10.1038/s41556-022-00911-1.
- 65) Eric L. Van Nostrand, et al., "A large-scale binding and functional map of human RNA-binding proteins," Nature 583, no. 7818 (2020) : 711-719., doi: 10.1038/s41586-020-2077-3.
- 66) Daniel Mateju, et al., "Single-Molecule Imaging Reveals Translation of mRNAs Localized to Stress Granules," Cell 183, no. 7 (2020) : 1801-1812.e13., doi: 10.1016/j.cell.2020.11.010.
- 67) Yimin 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.
- 68) Jordan A. Ramilowski, et al., "Functional annotation of human long noncoding RNAs via molecular phenotyping," Genome Research 30, no. 7 (2020) : 1060-1072., doi: 10.1101/gr.254219.119.
- 69) Jeremy A. Schofield, et al., "TimeLapse-seq: adding a temporal dimension to RNA sequencing through nucleoside recoding," Nature Methods 15, no. 3 (2018) : 221-225., doi: 10.1038/nmeth.4582.
- 70) Wanze Chen, et al., "Live-seq enables temporal transcriptomic recording of single cells," Nature 608, no. 7924 (2022) : 733-740., doi: 10.1038/s41586-022-05046-9.
- 71) Cole Trapnell, et al., "The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells," Nature Biotechnology 32, no. 4 (2014) : 381-386., doi: 10.1038/nbt.2859.
- 72) Gioele La Manno, et al., "RNA velocity of single cells," Nature 560, no. 7719 (2018) : 494-498., doi: 10.1038/s41586-018-0414-6.
- 73) Ryan A. Flynn, et al., "Small RNAs are modified with N-glycans and displayed on the surface of living cells," Cell 184, no. 12 (2021) : 3109-3124.e22., doi: 10.1016/j.cell.2021.04.023.
- 74) Katsuyuki Yugi, et al., "Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical Networks Across Multiple 'Omic' Layers," Trends in Biotechnology 34, no. 4 (2016) : 276-290., doi: 10.1016/j.tibtech.2015.12.013.