

中谷RIES最終報告書

氏名:中嶋彩香

所属:東京大学農学部応用生物学専修3年

ジョージア工科大学での所属先: School of Chemical & Biomolecular Engineering

Host Lab : Wilson Research Lab

PI : Professor Corey J. Wilson

Mentor : Caitlyn Davis

1. ジョージア工科大学での研究活動

Wilson Research Labでは、「CRISPRiシステムのBacteroidesへの導入と遺伝子発現制御 - 腸内細菌叢(マイクロバイオーム)の代謝解明に向けた遺伝学的ツールの開発-」というテーマで研究していました。

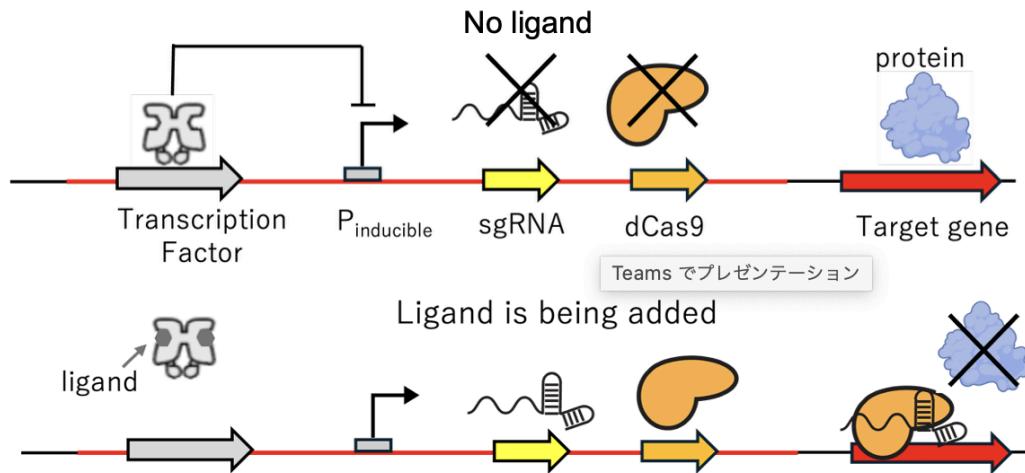
まず、腸内微生物叢とは、「腸管内に生息する微生物集団とその遺伝情報」のことです。腸内微生物は、実は免疫に関わる代謝プロセスに組み込まれており、人間の健康に大きく関わります。これまでの研究から、消化管内にどのような代謝経路が形成されているのかというのは徐々に明らかになってきています。ですが、微生物のどの遺伝子がどのように代謝経路に関わっているのかというのは研究があまり進んできませんでした。その大きな理由として、従来の遺伝子発現コントロールツールは腸内微生物の約8割を占めるBacteroidesとFirmicutesという細菌に直接導入することができないことが挙げられます。これまで遺伝子発現コントロールツールは、シンプルな構造を持ち増殖が早く、培養が容易かつ安全で、全ゲノム配列が明らかになっている大腸菌を用いて行われてきました。しかしながらBacteroidesとFirmicutesは大腸菌と異なり嫌気性で、かつ転写・翻訳機構にも違いがあります。そこで今回は、合成生物学の知見を元に、Bacteroidesの遺伝子発現をコントロールすることを目指して研究しました。

着目したのが、CRISPRi(CRISPR interference)という、的確に狙った遺伝子の発現を「抑制」するゲノム編集技術です。ノーベル賞を取ったことでも知られるCRISPR-Cas9とは、guide RNAによって特異的なDNA配列へ誘導されたCas9が、標的部位でDNA二本鎖切断を引き起こし、それに対する細胞の修復機構を利用して部位特異的なゲノム編集を行う技術です

。CRISPRiでは、Cas9ではなくdCas9というCas9タンパク質の変異体を用います。dCas9はguide RNAに導かれた先の標的遺伝子の転写領域に結合し、DNA二本鎖を切断することはしませんが、物理的にRNAポリメラーゼや基本転写因子のDNAへの結合を阻みます。そのため、CRISPRiを用いるとDNAの二本鎖の塩基配列に変化を加えることなく遺伝子の発現を抑制できます。

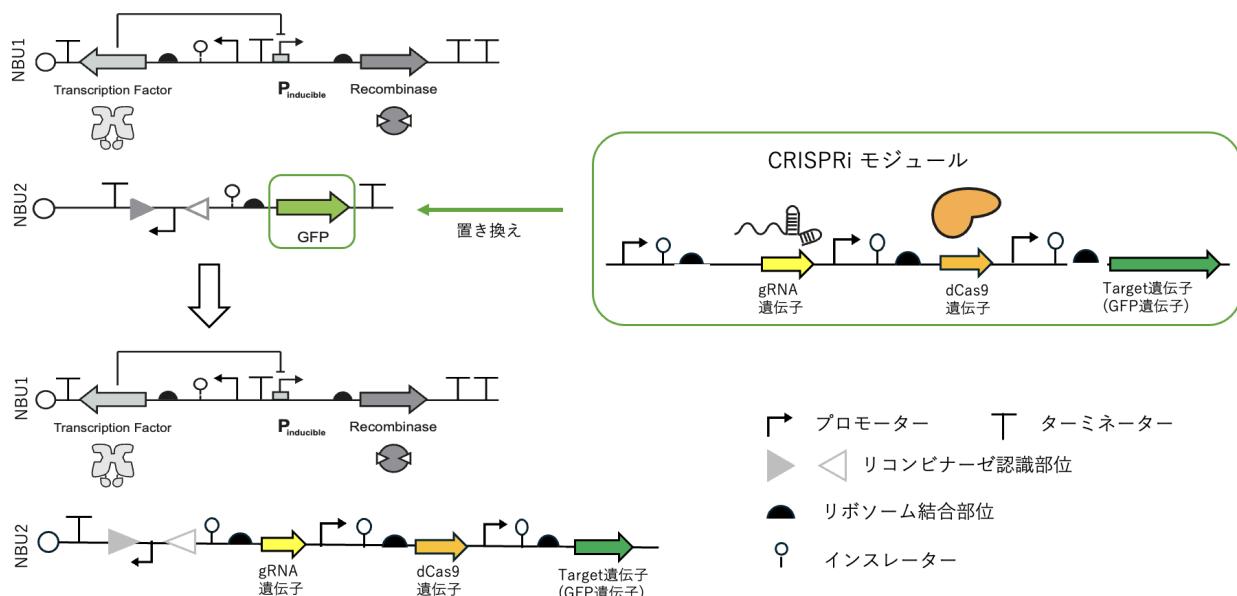
すでにこれまでの研究からCRISPRiを応用してBacteroidesの遺伝子を発現抑制し、かつ抑制開始時点をコントロールする方法は開発されました。従来の方法はBacteroidesへの毒性が課題でした。そこで今回の研究では合成生物学の知見をもとにこの課題解決することを目指しました。遺伝子抑制を開始するスイッチを作りたいのは代謝に関わる遺伝子は複数あるため、いずれはこれらを時間差でONにすることでその相互作用を見たいためです。

まず、先行研究では、転写因子を用いたCRISPRiのスイッチングに成功しています。リガンドの添加により転写因子がDNA二本鎖から離れることでRNAポリメラーゼがプロモーターに結合し、guide RNAとdCas9を発現し、ターゲット遺伝子の発現の抑制が開始されます。(下図参照)この回路の問題点は、CRISPRiを作動させる間、Bacteroidesに取って毒性のあるリガンドを加え続けなければいけないことです。



そこで我々が新たに考案したのが、リコンビナーゼ回路をCRISPRiと組み合わせる方法です。リコンビナーゼとは、二本鎖DNAの特定の部分の相同組換えを触媒するタンパク質のことです。リコンビナーゼ回路はNBU1とNBU2の二つの領域からなります。NBU、nonreplicating Bacteroides unitsとは、Bacteroidesに移行したい配列とそれをBacteroidesDNAまで運び組み込む船のようや役割を担う配列からなるユニットです。リガンドを加えるとNBU1の転写因子がDNA二本鎖から離れ、プロモーターにRNAポリメラーゼが結合しリコンビナーゼが発現します。これによりNBU2のリコンビナーゼ認識部位間の相同組換えが起こり、この間のプロモーターにRNAポリメラーゼが結合して右方向に伸長することでGFPが発現します。重要なのは、一度組換えが起こればリガンドはそれ以上必要ないことです。

今回の研究では、このリコンビナーゼ回路のGFP部分をCRISPRiモジュール(dCas9遺伝子, guide RNA遺伝子を含む領域)で置き換えることで、恒常的なリガンド添加なしでCRISPRiが働き続けるという仮説を立て、検証しました。なお、今回は定量化の簡易性からターゲット遺伝子としてBacteroidesが元々持つ遺伝子ではなく、GFP遺伝子を用いました。



事前の予想は下記のとおりです。

この回路を持つBacteroidesにリガンドを加えるとNBU1の転写因子がDNA二本鎖から離れ、プロモーターにRNAポリメラーゼが結合しリコンビナーゼが発現します。これによりNBU2のリコンビナーゼ認識部位間の相同組換えが起こり、この間のプロモーターにRNAポリメラーゼが結合して右方向に伸長することでguide RNA遺伝子が発現します。そして恒常にdCas9遺伝子が発現していたらguide RNAとdCas9の複合体がGFP遺伝子の発現を抑制します。(一度相同組換えが起こればGFP遺伝子発現抑制は恒常に起こると考えられます。)逆にリガンドを加えなければ、GFP遺伝子は発現は抑制されないと考えられます。なお、今回の実験ではリガンドの有無で発現されるか決まる遺伝子と恒常に発現される遺伝子がguide RNA遺伝子とdCas9遺伝子の両方の組み合わせを行いました。

本研究の流れとしては、まずBacteroides由来の遺伝子からなるNBU1, NBU2をそれぞれ持つ2つのプラスミドを大腸菌を用いて作成・増殖し、それをBacteroidesに移行させ、GFP遺伝子の発現量を測定しました。GFP遺伝子発現量の他に、Bacteroides由来のプラスミドを大腸菌内でうまく作成・増殖させられるかというのも着目した点でした。

時間の都合上、GFP遺伝子発現量の測定までいけたのはリガンドの有無で発現されるか決まる遺伝子をdCas9遺伝子、恒常に発現される遺伝子をguide RNA遺伝子としたケースのみでした。結果としては、予想に反し、リガンドの有無に関係なくGFP遺伝子発現量は低水準でした。そこでシーケンシングを行ったところ、NBU2のうちguide RNA遺伝子とGFP遺伝子はBacteroidesのDNAに挿入されず欠失していたことがわかりました。この原因として、NBU2中の二箇所のターミネーターが同一のものを用いており、ターミネーター間で相同組換えが起こりプラスミドが2分割された可能性と、使用していたターミネーターの強さが不十分だったためRNAポリメラーゼが両方向から進んでくるという事象が生じたために制限酵素によってguide RNA遺伝子とGFP遺伝子の領域が切り取られた可能性の二つを考えました。そのため、まずターミネーターが相同でない条件ではCRISPRiモジュールを全てBacteroidesのDNAに挿入できるか調べるため、ターミネーターの置き換えを帰国前に始め、帰国後はメンターさんが引き継いで実験をしてくださっています。

ターミネーターの置き換えと、必要に応じて他のリカバリー操作も行った後は、GFP遺伝子ではなくBacteroides固有の遺伝子もCRISPRiによって抑制できるかの検証、そしてプラスミドをマウスや人の腸内のBacteroidesに導入する方法の開発に着手する予定です。

2. 研究活動における日米の違い

研究のやり方の違い、キャリアの考え方、学生の自覚、日米のいいところ、悪いところ

2-1 研究の進め方について

私のお世話になったラボは新しい建物内にあり、とても開放的で、研究するエリアもデスクワークをするエリアも隣の研究室との壁による明確な区切りがありませんでした。一方で各研究室のPI(日本でいう研究室のトップの教授)たちの個室が集まったエリアは同じ階の少し離れた場所にありました。そのため、最初は「アメリカのラボはとてもオープンな雰囲気だな、PIとは少し物理的にも精神的にも距離があるのかな」と思いましたが、他のプログラム参加者に聞いたところ、研究室ごとにラボの物理的なオープンさや教授との距離感はかなり違っているようでした。確かに、日本でもこれらの点に関しては研究室ごとにかなり違いますし、「アメリカだからこう、日本だからこう」と主語を大きくするのではなく、自分が院進する際には研究室を一度訪問したり画面越しに案内してもらうことで、そのラボ自体の雰囲気を事前に掴み取るのが大切だと感じました。

また、アメリカではラボノートはPCなどでとるのかなと思っていたのですが、私がいたラボでは基本的に紙のラボノートを使っていました。一方、基本的にPCに記録をとるというラボもあたので、こちら

に関してもやはり「アメリカだからこう、日本だからこう」というわけではなく、研究室ごとに違っているようです。

比較的アメリカのどのラボでも共通していたのは、研究や学部生の指導に当てる時間帯は個人に委ねられているという点です。例えば私のラボには朝8時すぎにはきて夜も20時過ぎまでいる方、渋滞に巻き込まれないように朝7時にはラボにくるが、その分17-18時には絶対に変える方、朝は9,10時にして夕方に一度家に帰ったりジムに行き、また夜ラボに戻る方など、様々なライフスタイルの方がいらっしゃったのですが、お互いにお互いのスタイルを尊重しあい、ラボに遅い時間にきても早く帰つても誰も気にしていなさそうでした。日本と比べると全体的に来るのが早く変えるのも早い印象でしたが、もしかしたらアトランタの治安がよくなことも関係しているのかもしれません。

2- 大学院生の意識やキャリア、資金面について

大学院生の意識に関しては、アメリカと日本で大きく異なっていると感じました。特に違いを感じたのは、研究を自分の仕事として捉えている大学生が多かった点です。日本では修士課程・博士課程の学生も「学生」であるという認識が世間的にも院生本人たちにも強いように感じます。その理由として院生も授業料を払い先生から指導を受ける立場で、生活するのに十分な給料をもらっている人は少数派なことが挙げられると思います。私は今回を除きアメリカで研究したことはないので、あくまで私が所属していた研究室で見聞きした話にはなりますが、アメリカでは基本的に博士課程(日本でいう博士修士一貫課程)の学生は学費や生活費を貰える給与を受け取っている人も多く、もちろん学生として研究のアドバイスをPIから受ける機会はありますが、院生たちも学部生を数人受け持ち、責任持って彼らの研究計画を立てたり研究指導を行っているようでした。(私が行ったラボではTAを頑張るほど給料として反映されているようでしたが、近くのラボの中には受け持っている人数が多くなっても給料は変わらないというところもあったので、金銭面でのシステムはかなり研究室ごとに違うのかかもしれません。)院進しても親に経済的負担をかけずにする制度はとても羨ましいです。

また、大学院生たちの話を聞いていて感じたのが、「大学院進学・卒業が自分のキャリアをより高みに押し上げてくれる」という意識を彼らが共通して持っていることです。私は3年生に上がった頃から友人たちとどこの院に行くか、そもそも院進するか、院生である間の生活費や学費をどうするか、将来どんな仕事をしたいか話すことが多くなったのですが、よく話すのが「修士課程まで行く分には企業での研究という道が開けるし、文系就職する分にも損はないけど、博士課程まで進むと就ける職も減るし、研究者になるなら裕福な生活とか二十代で結婚・出産は諦めないと云うよ」という話題です。実際にこれが正しいのかは私に判断はできないですが、博士課程まで行くことが自分のキャリアやライフプランにとって確実にプラスだという認識をしている日本の学部生が少ないので事実ではないかと思います。博士課程に進むことが自分の人生にプラスだと信じている学生が多い点はとても魅力的で、この点はアメリカの科学技術人材のレベル・人数の担保にも貢献しているのではないかと考えました。

一方でアメリカの大学院生は学部生の指導やTA業務で忙しく、自分の研究時間の確保が日本の大学院生より大変そうな印象も受けました。この点に関しては給与とのトレードオフではありますが、もし自分がアメリカの大学院に進学できたとしても、学部生の指導やTA業務だけで時間を使いつまいそうで、時間の使い方はとても難しそうだと感じました。

3. 米国の文化・生活面での発見・苦労等

3-1. 生活して感じたこと

今回アメリカに滞在して感じたことは、格差です。キャンパス内は肥満体型の方をほとんど見かけず、清潔感のある格好を皆さんなさっていました。しかしながら街中に出でみると、路上で生活をなさっている方や肥満体型の方もよく見かけました。本で得た知識として、いわゆる貧困層の方は安いファーストフードを食べる機会が多く、逆に中流以上の層ではヘルシーな食生活を意識しジムに通つて細身を保っている傾向があると知っていましたが、それを目の当たりにしてとても生々しく感じました。

また、三連休のタイミングでボストンに旅行に行ったのですが、アメリカでは都市によって人口に占める各人種の割合や建物の雰囲気が異なるというのも肌で体感できました。

今回はアトランタとボストンとサンフランシスコの3都市に滞在しましたが、いずれの都市でも子どもや若者が多いなというのも感じました。

本や授業から得た知識を一次情報として知ることができるというのがやはり違う国に行く一番の醍醐味かなと思います。

3-2. 食に関して

私は朝食はホテルのビュッフェで食べ、昼食には朝食で出していただいたものをタッパーに詰めて持つて行き食べ、夕飯は家でパスタを作つて食べることが多かったです。もっと外で色々食べたいなという気持ちもありましたが、物価も高く、今回は旅行ではなく研究が主目的ということもあり外食は控えめにしました。

朝食ビュッフェではパンやスクランブルエッグ、トルティーヤ、ワッフルは毎日固定で出て、ポテト料理や肉料理は何種類かが日毎に順番に出てきました。私はワッフルを毎日焼いて食べていました。自分で焼くと好みのカリカリ具合にできますし、ハチミツやジャムやバターなどがいろんな種類あるので全く飽きませんでした。個人的に、同じものを毎日のように吃べるのは苦ではないですし、胃腸も強いので、食に関しては苦しい思いを全くしませんでした。強いていうなら、普段は和食が多いので最初1週間は心持ち胃もたれしていました。自分の食に関する海外生活への適応能力は高いんだなと再確認しました。

アトランタとボストンでスーパーに行った時に、並んでいる商品に日本とかなり違ひがあるように感じました。個人的にはクラッカーやクッキー、プレッツェルの種類が豊富で、紅茶も日本よりはるかにたくさんの種類が売られていたのが嬉しかったです。

3-3. 生活面での苦労

今回は財団の方やアルムナイ、メンターのおかげで特に苦労せずにすんだのですが、アメリカでは車がないと非常に生活しにくそうでした。

また、シャワーから出てくる水が硬水よりだったのか、あるいは温度調整がしにくいタイプのシャワーで温度が高めのお湯を浴びていたからか、帰国する頃には髪の毛がかなり傷んでしまいました。またアメリカに行く機会があればヘアケア用品は必ず持つていこうと思います。

4. 本プログラムに参加の成果・意義

私はプログラム応募時、「このプログラムに参加することで自分の価値観が劇的に変わるのかな」と思っていました。ですが、そもそも、たった5,6週間海外で研究したからといってすぐに劇的な変化を感じられるほど、人間が20数年かけて様々な経験をし作り上げてきた価値観は即時に変化しないのだと思います。

もちろん、一緒にアトランタに行った同期やプログラムの先輩方との繋がりや、自分の母語が通じない場所で研究を行うというあまりに高いハードルを乗り越えたんだという自信、アメリカでの大学院生活の過増度が上がったことなど、とても素敵なものを今回のプログラムを通して得られたと感じています。しかしながら、本当に今回プログラムに参加して自分が得たものの大きさを理解できるのはきっと5年、10年、あるいはもっと時間が経ってからなのかなと思います。

肥料を撒けば作物の収量は比較的すぐ伸びるけれども、その作物を育てている土壤自体の物理性・化学性・生物性を向上させるには長い時間と手間暇がかかります。本プログラムに参加して得たものを糧とし、そして今回多くのことを得られたことに満足仕切るのではなく、さらに様々なことにこれから挑戦し、いつか「自分はこんなに大きなものをこんなにたくさん実らせられたのか」と自分自身を驚かせられるよう精進していきたいと思います。

5.その他

この文章を読んでくださっている方の中には、本プログラムに応募しようか迷っている方もいらっしゃると思います。私は本プログラムに応募する前、「自分がアメリカで研究できるわけないんじゃないのか」「絶対すごい実績を持っている人しか応募していないよ」「今後研究者になるかもわからないのに、応募していいのかな」ととても弱気になることが多かったです。しかしながら、そこで気押されず思い切って応募して見て本当に良かったと思っています。迷っている方はぜひチャレンジしてみてください。

最後になりましたが、今回このような貴重な機会をくださいました小川研之様を始めとする中谷財団の皆様に感謝申し上げます。またメンターとして支えてくださった Caitlyn、受け入れてくださった Wilson教授、本プログラムの運営のためにご尽力いただいたジョージア工科大学の高山教授、Dr Soojung Leelにも感謝いたします。また、多くの助言をくださったアルムナイの方々、アトランタでの生活を支え、また楽しい時間をくれたジョージア工科大学の学生の方々、そして様々な困難をともに乗り越えたプログラム同期の方々にもお礼申し上げます。

多くの方々のおかげで、最高に楽しく充実した夏を過ごすことができました。本当にありがとうございました。