

領域融合レビュー, 3, e008 (2014)
DOI: 10.7875/leading.author.3.e008
2014年7月15日 公開

ゲノム編集がひらく遺伝子改変マウスの未来

Genome editing in mice opens a new era for biological and biomedical researches

伊川 正人
Masahito Ikawa

大阪大学微生物病研究所 附属感染動物実験施設

要約

遺伝子改変動物を用いた研究の醍醐味は、培養細胞や試験管内ではみられないダイナミックな高次生命現象を、個体レベルで観察あるいは解析できることにある。とくに、ヒトと同じ哺乳類に属するマウスは、全ゲノム塩基配列が明らかにされているだけでなく、ES細胞における相同組換えを利用した標的遺伝子の破壊が可能であることから、遺伝子機能解析ツールとしてだけでなく、ヒトの疾患の病態モデルとして、生命科学的研究および医学研究の礎を担っている。さらに最近では、黒船襲来ともいべきゲノム編集技術、とくにRNAにより標的配列を認識するCRISPR/Cas法の開発により、1塩基レベルから染色体レベルでの遺伝子の挿入、欠損、置換、さらには、エフェクターとの組合せによる転写制御、ゲノムの可視化、エピゲノム修飾の操作などの可能性が大きく広がっている。このレビューでは、従来の遺伝子改変マウスの作製技術をふまえ、ゲノム編集がひらく遺伝子改変マウスの未来について解説する。

はじめに

マウスは約20~30gと小さく穏やかな性質をもち多産な動物である。また、性成熟（雄で約6週間、雌で約4週間）や妊娠期間（約20日間）を含めて比較的ライフサイクルが短いことから、古くから実験動物として供されてきた。さらに、全ゲノム塩基配列の解読によりヒトの遺伝子の99%はマウスにも保存されていることが明らかにされたこと、体外受精や胚操作などの生殖工学的な手法も確立されていることなどもあり、マウスは遺伝学的にも微生物学的にも制御されたすばらしい実験動物であるといえ

る。

個体レベルにおいてマウスのゲノム遺伝子进行操作する試みは古く、さまざまな手法が活用されてきた。もっとも古典的な方法は自然変異マウスのスクリーニングであり、胸腺を欠損するヌードマウスや、T細胞およびB細胞を欠損するSCIDマウスなどが有名である。つづいて、放射線の照射や化学変異原の投与などの人為突然変異法が開発された。たとえば、エチルニトロソ尿素（ethylnitrosourea: ENU）の投与は自然変異の約100倍~1000倍の確率で点変異を誘発し、ヌル欠損変異だけでなくアミノ酸置換変異なども得られる。方法は簡単で、エチルニトロソ尿素を投与した雄と野生型の雌を交配させて得られる子孫を表現型によりスクリーニングする。しかしながら、ゲノムにおいて変異を同定することは非常に困難であった。近年の塩基配列解析技術の飛躍的な進展にともない、ランダムに導入された変異をさきにスクリーニングするというアプローチも可能にはなっているが、思いどおりの変異を導入できないという難点は残る。なお、自然変異マウスおよび人為突然変異マウスはいずれも遺伝子組換え実験の規制にとらわれず、野生型のマウスと同様に扱うことができる。

変異マウスを用いて表現型からその原因となる遺伝子を探りあてる順遺伝学（フォワードジェネティクス）に対し、遺伝子を改変して表現型との関連を探るアプローチを逆遺伝学（リバースジェネティクス）という。1970年代に外来の遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが、1980年台後半に内在性の遺伝子を破壊したノックアウトマウスが開発されたことにより、逆遺伝学は大きく進展した。さらに2010年台に入り、ゲノム編集技術を活用した遺伝子改変マウスの可能性が大きく広がっている。以下、遺伝子組換えマウスの作製技術とその可能性について解

説する。

1. トランスジェニックマウス

一般的には、トランス遺伝子とよばれる外来性の遺伝子を宿主のゲノムに人為的に組み込み、これが世代をこえて受け継がれるマウスをさす。宿主がもたないタンパク質を発現させたり、野生型あるいは変異型のタンパク質を過剰に発現させたりする目的で作製されることが多い。たとえば、筆者らが開発した蛍光タンパク質 EGFP を発現するグリーンマウスは移植やがん転移など幅広い基礎研究に、また、*rasH2* マウスは発がん試験に用いられている。組織特異的なプロモーターや薬剤誘導型のプロモーターを使うことにより、より複雑な遺伝子発現の制御も可能となる。

トランスジェニックマウスは受精卵の前核にガラス管を用いて直鎖状の DNA を直接注入することにより作製されることが多い (図 1a)。トランス遺伝子はゲノムの 1 箇所タンデムに複数のコピーが組み込まれることが多く、挿入位置やコピー数により発現パターンや強度が左右される。数は少ないが、レンチウイルスベクターを受精卵に感染させる手法も使われる (図 1b)。この場合は、ゲノムの複数の個所に 1 コピーずつ組み込まれるため、位置効果を相殺することができる。また、前核に注入する方法に比べ作製効率が 10 倍近く改善されることから、稀少な変異マウス系統を使うときや第 1 世代での発現解析などに威力を発揮する。

なお、従来の方法では胎仔と胎盤の両方に遺伝子が導入されるため、胚性致死などの解析が困難であった。筆者ら

は、発生の進んだ胚盤胞期の胚にレンチウイルスベクターを感染させれば、胎仔に遺伝子導入することなく胎盤に特異的に遺伝子導入することができることを見出した (図 1c)。妊娠期の遺伝子機能解析ツールとして活用が期待される。

2. ノックアウトマウスの開発

ノックアウトマウスは内在性の遺伝子が破壊されたマウスの総称として使われており、点変異によるフレームシフト、ナンセンス変異、ミスセンス変異による機能の欠失、のちに述べるゲノム編集技術などにより遺伝子を破壊されたマウスを含む。一般的には、内在性の遺伝子を破壊した ES 細胞 (embryonic stem cell, 胚性幹細胞) からキメラマウスを介して生殖系列に変異した遺伝子を伝達するマウスをさすことが多い。

1981 年、マウスの胚盤胞から ES 細胞が樹立され、胚盤胞に混合すればキメラマウスが作製できること、さらに、交配により ES 細胞に由来する子孫を得られることが報告された。そのうち、薬剤により選択することのできる培養細胞株の利点を生かし、ES 細胞を用いたマウスの遺伝子破壊法として有名な 2 つの方法が開発された。ランダムに遺伝子を破壊する遺伝子トラップ法と、標的とした遺伝子を破壊する遺伝子ターゲティング法である。遺伝子トラップ法は、外来性の薬剤耐性遺伝子がゲノムにランダムに挿入される際に、偶然に内在性の遺伝子座に挿入されたものを薬剤により選択する。遺伝子ターゲティング法は、外来性の薬剤耐性遺伝子の両側にゲノムと相同性をもつ領域

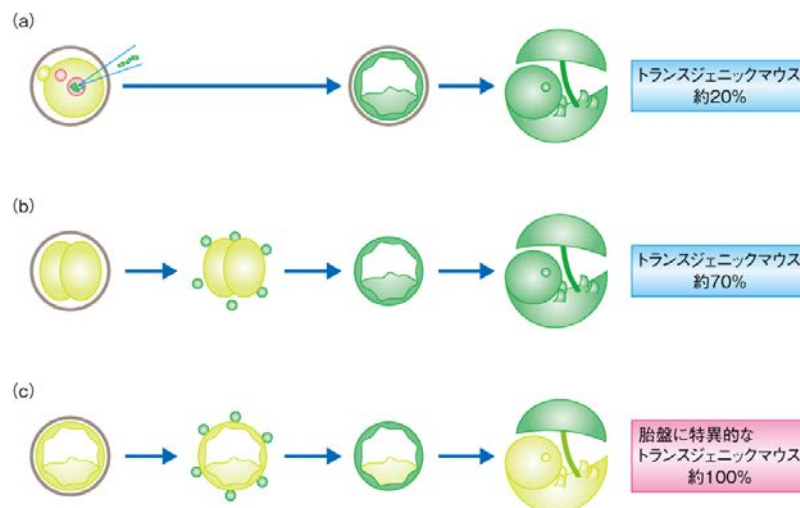


図 1 トランスジェニックマウスの作製法

(a) 受精卵の前核にガラス管を用いて直鎖状の DNA を注入すると、約 2 割の胎仔および胎盤に遺伝子が導入される。ゲノムの 1~2 箇所に複数のコピーが組み込まれる。

(b) 透明帯を除去した受精卵にレンチウイルスベクターを感染させると、約 7 割の胎仔および胎盤に遺伝子が導入される。ゲノムの複数の箇所に 1 コピーずつが組み込まれる。

(c) 透明帯を除去した胚盤胞期の胚にレンチウイルスベクターを感染させると、胎仔に遺伝子を導入することなく、ほぼすべての胎盤に遺伝子を導入できる。

を付加し、相同組換えにより内在性の遺伝子を薬剤耐性遺伝子と置き換える方法であり、目的とする遺伝子の機能を個体レベルで解析する逆遺伝学の典型例とされる。1980年台の終わりから1990年代にかけて、ノックアウトマウスに関する多くの論文がトップジャーナルに掲載され、個体レベルでの遺伝子の機能解析にはノックアウトマウスが常道とされるようになった。2007年には、ノックアウトマウスの開発者である Martin Evans, Oliver Smithies, Mario Capecchi にノーベル医学生理学賞が授与されている。

3. 遺伝子トラップ法

遺伝子トラップ法においては、当初は薬剤耐性遺伝子とポリ A 付加シグナルをつないだカセットを用いて内在性のプロモーターをとらえるプロモータートラップ法が主流であったが、ES 細胞で発現している遺伝子しか破壊できないという欠点があった (図 2a)。そこで考案されたのが、普遍的に発現するプロモーターの後ろにレポーター遺伝子を挿入したカセットを用いてポリ A をとらえるポリ A トラップ法で、原理的にはすべての遺伝子をトラップして破壊できる。しかし、ポリ A トラップ法では薬剤耐性遺伝子のもつ終止コドンの後ろに内在性のエキソンが連なるため、ナンセンス変異依存性 mRNA 分解機構 (non-sense mediated mRNA decay : NMD) により mRNA の不安定化をひき起こすという問題があった。現在では、薬剤耐性遺伝子の後ろにリボソームエンタリ一部位と 3 フレームの ATG を付加することなどで問題は解決されている²⁾。遺伝子トラップカセットの導入には、直線化プラスミドのエレクトロポレーション法も利用されるが、細胞の生存率や導入効率からレトロウイルスベクターを使った方法が好まれる。最近では、Sleeping Beauty や PiggyBac などのトランスポゾン系を使ってゲノムに組み込むアプローチも開発されており、その場合は、表現型を観察したのちにトラップベクターを抜き取って機能の回復を確認できるという利点がある (図 2a)。

4. 遺伝子ターゲティング法

遺伝子トラップ法は同じベクターをくり返し ES 細胞に導入することによりランダムに遺伝子を破壊するのにに対し、遺伝子ターゲティング法では標的とする遺伝子ごとにデザインされたベクターを作製して ES 細胞へ導入し、薬剤耐性遺伝子および薬剤感受性遺伝子 (あるいは、自殺遺伝子) を組み合わせた正の選択および負の選択により相同組換えを起こした ES 細胞を濃縮する (図 2b)。つぎに、遺伝子を導入した ES 細胞を薬剤により選択しクローン化する (図 2c)。クローン化した ES 細胞からゲノム DNA を抽出して PCR 法やサザンブロット法により相同組換えを確認する。ES 細胞を初期胚と凝集し、偽妊娠マウスに移植してキメラマウスを作製する (図 2d)。当初、汎用さ

れた 129 系統の ES 細胞は C57BL/6 系統の胚盤胞期の胚に注入してキメラマウスを作製していたが、C57BL/6 系統の ES 細胞は、ICR 系統の 8 細胞期の胚と凝集させるほうが生殖系列に寄与しやすいようである。得られたキメラマウスを野生型マウスと交配させて、標的遺伝子に変異をもつ F1 マウスを得たのち、ヘテロ F1 マウスの雌雄を交配してホモ変異をもつ F2 マウスを得る (図 2e)。ベクターの構築から、ES 細胞における相同組換え、キメラマウスの作製と交配による生殖系列への寄与、さらに、交配によるホモ欠損マウスを得るためには、年単位の実験になることも多い。

マウスでは ES 細胞の培養技術、遺伝子改変技術、キメラ動物の作製技術が確立しているが、ほかの動物種ではそうともかぎらない。たとえばラットでは、マウスから遅れること 15 年、2003 年になってようやく ES 細胞を使った遺伝子ノックアウトが報告された。ES 細胞以外の細胞を用いた遺伝子ターゲティング法も開発されている。iPS 細胞を用いれば ES 細胞と同様の実験ができることはいうまでもないが、GS 細胞 (germ line stem cell, 雄性生殖幹細胞) において標的遺伝子を破壊し、それを精巣に移植して精子を形成させ次世代を得ることもできる³⁾。なお、家畜動物などでは、遺伝子ターゲティングした胎仔繊維芽細胞からクローン技術により個体を復元する方法も一般的である。

遺伝子ノックアウト実験の醍醐味は、表現型をみるまで標的遺伝子の重要性がわからないことであろう。筆者らもこれまで数多くのノックアウトマウスを作製してきたが、*in vitro* における実験の結果から誰もが必須と信じて疑わなかった遺伝子が不要であったり、まったく予期せぬ結果から生命現象に必須の遺伝子が見つかったりしたケースも少なくない。ノックアウトマウスの結果しだいでは定説を一発逆転できることから、予想どおりの表現型より、むしろ予想外の結果が得られたほうが大きな発見につながる。

5. 国際ノックアウトマウスプロジェクト

遺伝子ターゲティングの際の重要なポイントは、生殖系列に寄与できる未分化な状態を維持した ES 細胞の培養と、効率的な相同組換えである。ES 細胞の培養については、由来するマウスの系統や樹立された ES 細胞株などによって異なり、培地や血清のロットにも左右される。そのため、遺伝子操作と継代の過程において性質が変化してキメラマウスが得られなかったり、キメラマウスが誕生しても遺伝子改変した ES 細胞に由来する仔が得られず、実験が振り出しにもどるケースも少なくなかった。効率的な相同組換えについては、組換えの効率を上げる目的で相同領域を長くするため (両側合計で 7~10 kbp)、全長が 20 kbp 近いプラスミドの切り貼りとなり、ベクターの構築と配列の確認に手間と時間を要するという問題点があった。また、

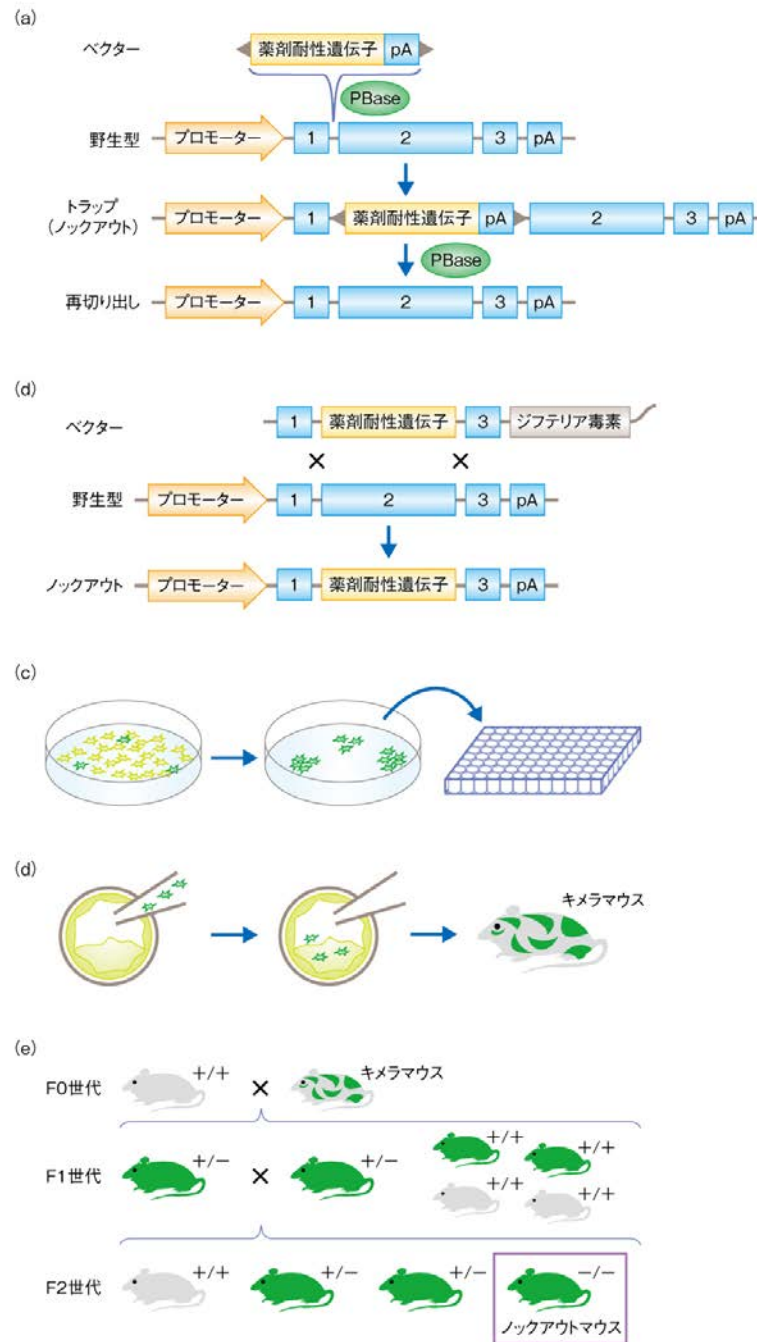


図2 ノックアウトマウスの作製法

(a) 遺伝子トラップ法. 薬剤耐性遺伝子とポリ A 付加シグナル (pA) をつないだカセットが内在性の遺伝子座にランダムに組み込まれると, 内在性のプロモーターにより薬剤耐性遺伝子が発現する. Piggybac などのトランスポゾン系と組み合わせれば, 傷跡を残さずにベクターを抜き取り, 表現型の回復を確認することができる. PBase : PiggyBac トランスポザゼ.

(b) 遺伝子ターゲティング法. ベクターと内在性のゲノムとのあいだで相同組換えが起こると, 薬剤耐性遺伝子カセットが標的となる遺伝子座に組み込まれる (正の選択). ベクターがランダムに組み込まれると, ジフテリア毒素が発現するため細胞は死ぬ (負の選択).

(c) 遺伝子トラップベクターや遺伝子ターゲティングベクターを導入した ES 細胞を薬剤により選択しクローン化する. PCR 法やサザンブロット法により, 標的遺伝子が破壊された ES 細胞クローンを同定し増殖させる.

(d) 染色体の数が正常であることを確認した ES 細胞を初期胚と凝集し, 偽妊娠マウスに移植してキメラマウスを作製する.

(e) 得られたキメラマウス (F0 世代) を野生型のマウスと交配し, F1 世代において変異遺伝子の伝達を確認する. さらにヘテロ欠損 F1 マウスどうしを交配して, F2 世代においてホモノックアウトマウスを得る.

相同組換えの頻度は標的遺伝子座やベクターのもつ相同領域の配列などによっても大きく異なるため、トラブルシューティングは経験や勘にたよる部分も多く、運が悪いのか腕が悪いのかわからないなど初心者にはむずかしい実験であった。

さらに残念なことに、コストや労力をかけて作製したがゆえに、得られたノックアウトマウスを研究材料として共有しない研究室もあり、有名な遺伝子のノックアウトマウスは多くの研究室で重複して作製された。また、表現型のみられないノックアウトマウスの情報は表にでないため、同じノックアウトマウスが異なる研究室でくり返し作製されるといったむだも生じていた。

これらの背景から、少ない拠点においてすべての遺伝子を網羅的にノックアウトして人類共通の財産にしようという国際ノックアウトマウスプロジェクトが始動した⁴⁾。米国やヨーロッパを中心に活動が広がり、2006年ごろ、IKMC (International Knockout Mouse Consortium) が国際プロジェクトとして活動を本格化した。当初は遺伝子トラップ法が主流であったが、相同組換え率の高いベクターの開発や、ベクター構築の効率化あるいは機械化により、遺伝子ターゲティング法も採用されている。IKMCで採用された遺伝子ターゲティングベクターの多くが組織特異的あるいは時期特異的に遺伝子を破壊できるコンディショナルノックアウトタイプであり、内在性のプロモーターによりレポーターとして *LacZ* 遺伝子を発現するといったくふうもなされている。

なお、2011年から国際ノックアウトマウスプロジェクトは IMPC (International Mouse Phenotyping Consortium, URL: <http://www.mousephenotype.org/>) に引き継がれ、これまでに、IKMC とあわせて 2 万近い遺伝子について組換え ES 細胞株が樹立されている。今後は、キメラマウスを介したノックアウトマウスの作製と 1 次的な表現型の解析が主体となり、解析の結果は世界中に公開される。当初 5 年で 4000 系統の解析を終えるという目標が設定されているが、細胞レベルとは異なり個体レベルの実験には莫大な費用と時間がかかる。2014年6月時点では約 300 系統の表現型の公開にとどまっており、今後の進展が期待される。

6. ゲノム編集技術と人工制限酵素

欧米各国が莫大な予算を投じて国際ノックアウトマウスプロジェクトを推進するかわら、新たな遺伝子改変技術が産声をあげていた。人工制限酵素の開発と応用による標的遺伝子の改変技術、つまり、ゲノム編集技術である。原理的には、ゲノムの 2 本鎖 DNA を切断し、その修復機構のエラーを利用して遺伝子を効率的に改変する (図 3a)。非相同末端結合 (nonhomologous end-joining: NHEJ) 経路による修復では、切断をうけた DNA 末端を直接つなぎ合わせる際に、数塩基の欠失あるいは挿入などのエラー

が起こりやすい。また、相同組換え (homologous recombination: HR) 経路による修復ではエラーは少ないが、相同性をもつ 1 本鎖 DNA あるいは 2 本鎖 DNA を人為的に導入しておくとかやまってゲノムに取り込まれることがある。ゲノム編集技術では、このような 2 本鎖 DNA 切断とその修復のエラーをうまく利用して遺伝子改変を行う⁵⁾。

ゲノム編集といえば ZFN (zinc finger nuclease) が最初と思う人が多いかもしれないが、それ以前から、2 本鎖 DNA 切断を利用した遺伝子改変は試みられていた。1996年には、18 塩基を特異的に認識する I-SceI メガヌクレアーゼを用いた 2 本鎖 DNA 切断により相同組換えの効率の改善することが報告されている。しかし、メガヌクレアーゼは標的配列をデザインすることができないため、認識配列をさきにゲノムに組み込む必要があるなど、実用的にはほとんど意味のないものであった。同じく 1996年に開発されたのが ZFN である。ジンクフィンガーモチーフとよばれる DNA 結合ドメインと FokI ヌクレアーゼで構成された人工キメラタンパク質であり、標的遺伝子を認識し切断する (図 3b)。しかし、ZFN では DNA 結合ドメインがデザインどおりに DNA を認識しないことが多く、ベクターの構築がむずかしいとの欠点があった。また、市販品が非常に高額であったため、一般の研究者には高嶺の花であることも多かった。

つぎに登場したのが、ZFN の DNA 結合ドメインを植物病原細菌である *Xanthomonas* 属細菌のもつ TALE エフェクターに代えた TALEN である (図 3c)。核酸の A, C, G, T それぞれ 1 塩基に特異的に対応するユニットを標的配列にあわせて組み合わせるだけで構築できることから、一般の研究者にも利用できるレベルになった。さらに数塩基を認識するモジュールを組み合わせる改善もなされている。また、34 アミノ酸残基からなるユニットの 4 番目と 32 番目のアミノ酸残基のパリエーションに注意してモジュールを構築することにより、活性の高い TALEN を効率よく作製できる Platinum TALEN も開発されている⁶⁾ (URL: <http://www.addgene.org/TALEN/PlatinumGate/>)。

ZFN や TALEN といった人工制限酵素は、受精卵に注入するだけで内在性の遺伝子を破壊できることから、ホヤ、カエル、ゼブラフィッシュなど、多くのモデル生物において利用されている。詳細については末尾にあげた参考図書を参照されたい。

7. CRISPR/Cas 法によるゲノム編集技術

ZFN や TALEN の登場により“人工制限酵素”や“ゲノム編集”という言葉が研究者の耳目をあつめ、また、画期的な遺伝子改変技術としての評価から、2011年には *Nature Method* 誌の Method of the Year、2012年には *Science* 誌の Breakthrough of the year にとりあげられた。そのような状況のなか、次世代のゲノム編集技術として開

発されたのが CRISPR/Cas 法である。そもそも、CRISPR/Cas 系は古細菌などがもつ獲得免疫機構であり、ファージなどを介して侵入する外来性の DNA を断片化して自らのゲノムに組み込み、2 度目の感染のときに、この外来性の DNA の断片から発現する 2 つの小分子 RNA を用いて標的 DNA を認識し、Cas9 ヌクレアーゼをリクルートしてこれを切断する。2013 年 2 月には、2 つの小分子 RNA をひとつのキメラ RNA とし (guide RNA : gRNA, あるいは, single guide RNA : sgRNA とよばれる), Cas9 との 2 つの因子だけでゲノム DNA の切断活性を発揮できることが示された^{7,8)} (図 3d)。

ZFN や TALEN は DNA 結合ドメインと切断ドメインを融合タンパク質として機能させるため標的遺伝子ごとに複雑なベクターの構築が必要なのに対し、CRISPR/Cas

法では標的配列に対応する gRNA の 5' 末端の 20 塩基を変更するだけで標的遺伝子を変えることができる。この手軽さと低コスト、高い切断効率と再現性から、CRISPR/Cas 法は瞬く間に生命科学研究者に広まった。筆者らはプラスミド pX330 (URL : <http://www.addgene.org/42230/>) を用いているが、pX330 には gRNA 発現カセットおよびコドンヒト化した Cas9 発現カセットが搭載されており、合成オリゴ DNA を導入するだけでノックアウトベクターを構築できる (図 4a)。

CRISPR/Cas 法が哺乳類培養細胞において機能することが示されてから半年も経たない 2013 年 5 月、Cas9 をコードする mRNA と gRNA を受精卵の細胞質に注入することによりノックアウトマウスが得られるという論文が報告された⁹⁾ (図 4b)。当時、筆者らも、RNA 合成のス

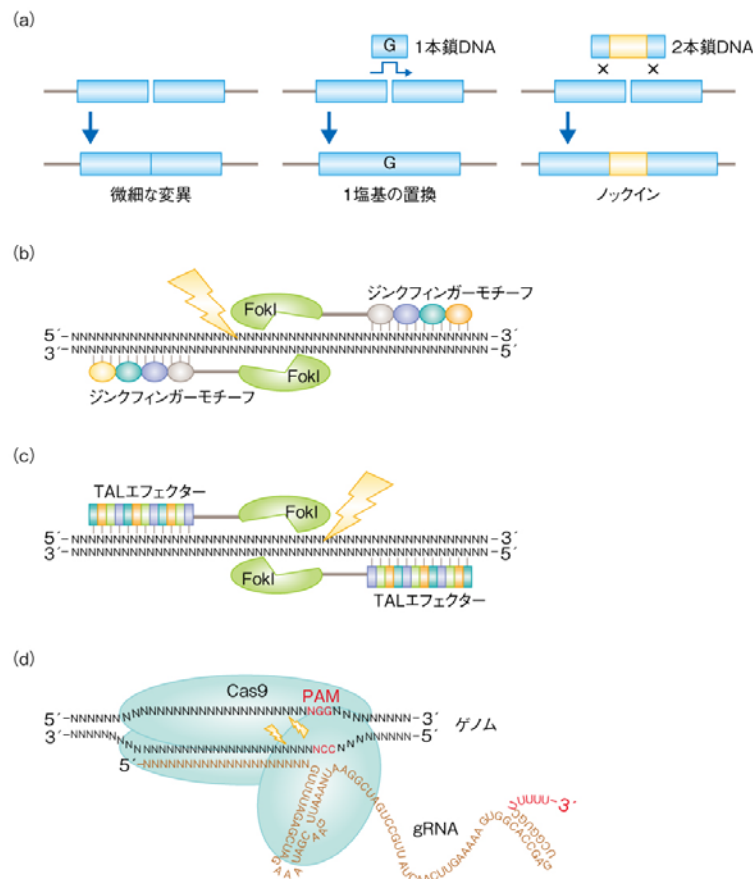


図 3 ゲノム編集技術の原理と人工制限酵素

(a) 切断面がそのまま結合する非同末端結合経路による修復では再結合の際に欠損や挿入が起こりやすい。相同組換え経路による修復の際に参照できるような 1 本鎖 DNA や 2 本鎖 DNA があると、1 塩基の置換やノックインなど、デザインした変異を導入することができる。

(b) ZFN は、3 塩基を認識するジンクフィンガーモチーフを数個と、FokI ヌクレアーゼを結合した融合タンパク質として作製する。2 つの ZFN がセンス鎖およびアンチセンス鎖を認識すると FokI 二量体が形成され、DNA 切断活性を発揮する。

(c) TALEN では、A、C、G、T それぞれ 1 塩基に特異的に対応するユニットからなる TAL エフェクターが標的となる DNA を認識する。

(d) CRISPR/Cas 系では、gRNA の 5' 末端の 20 塩基が標的 DNA を認識する。gRNA にリクルートされた Cas9 は、PAM 配列の上流の 3 番目と 4 番目の塩基のあいだを切断する。

テップをスキップして pX330 プラスミドを受精卵の前核にマイクロインジェクションする簡易法を独自に開発していたが、2 番手の論文ということで予想以上に審査が厳しく、論文発表までに半年を要した¹⁰⁾。CRISPR/Cas 法を用いたノックアウトマウス作製のメリットはその簡便性とスピードであり、実際に、合成オリゴ DNA の発注から pX330 ベクターの構築、培養細胞における切断活性の検討に約 1 週間、それに受精卵への注入から出産までの 3 週間をくわえた約 1 カ月でノックアウトマウスが作製できる。さらに、変異マウスの約半数において両方の対立遺伝子に変異が導入されている点は特筆すべきであり、ES 細胞を使うと交配だけでも半年を要することを考えると、ファウンダー世代でホモ欠損マウスが得られるのは夢のようである。筆者らの経験では、100 個の受精卵を処理すれば約 10 匹が生まれ、5 匹程度が変異マウス、うち 2 匹程度が両方の対立遺伝子に変異をもつ^{10,11)}。なお、受精卵ではなく、ES 細胞へのプラスミドのトランスフェクションでは、pX330 が一過性に導入された ES 細胞の約 8 割で

両方の対立遺伝子に変異が認められる。

CRISPR/Cas 法の注意点としては、標的とする配列に近似した配列（オフターゲット）を切断してしまうリスクがある。ZFN や TALEN では、センス鎖とアンチセンス鎖を認識する 2 つのユニットが同時に認識してはじめて FokI による切断が起こるのに対し、片側の DNA 鎖のみを認識する CRISPR/Cas 法の特異性は低いとされ、がん細胞などの培養細胞などではオフターゲットの切断が多く報告されている。しかし、受精卵や ES 細胞などでは DNA 修復能力が高いのか、それほど問題にならないようである。筆者らによる受精卵でのノックアウトマウスの作製では、オフターゲットの候補として 382 箇所を調べて 3 箇所の切断であった¹¹⁾。マウスであれば、交配によりオフターゲットに変異をもたないマウスを選別することも可能であるし、統計処理による対応もできる。あるいは、同じ遺伝子を標的とするが異なる gRNA を用いて追試すれば、オフターゲットの切断による影響は無視できるであろう。

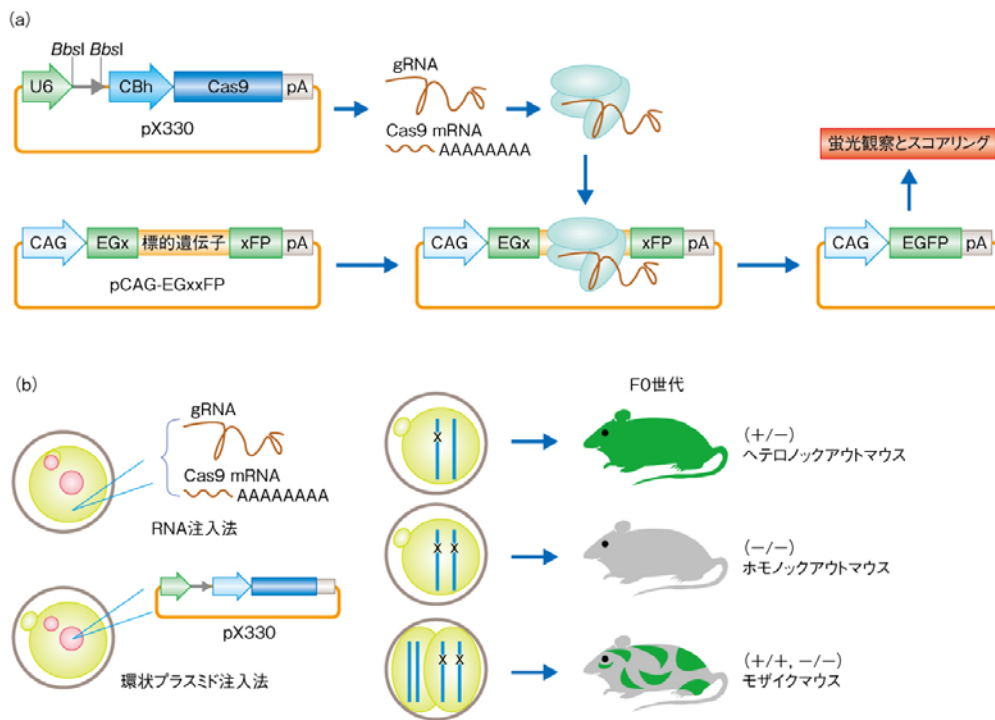


図 4 CRISPR/Cas 法によるノックアウトマウスの迅速な作製法

(a) pX330 プラスミドは、ヒト U6 プロモーターの制御下に gRNA を、普遍性トリ β アクチンハイブリッドプロモーター (CBh) の制御下にコドンヒト化した Cas9 を発現する。標的とする PAM 配列の上流 20 塩基を *BbsI* 制限酵素部位に挿入するだけでノックアウトベクターが完成する。pCAG-EGxxFP レポータープラスミドを pX330 プラスミドと同時に細胞へ導入すると、pX330 から発現した Cas9-gRNA 複合体によりレポータープラスミドに挿入された標的配列が切断される。標的配列の前後にある重複領域を利用した修復により EGFP 発現カセットが復元されると、細胞は蛍光を発する。

(b) 受精卵の細胞質に gRNA および Cas9 の mRNA を注入する RNA 注入法が一般的であるが、pX330 プラスミドを環状のまま注入する方法も簡便法としてすぐれている。ES 細胞を介するケースとは異なり、受精卵の両方の対立遺伝子に変異が導入された場合には F0 世代においてホモノックアウトマウスが得られる (両方の対立遺伝子の変異が同一とはかぎらない)。なお、卵割ののち DNA が切断された場合には、モザイクマウスとして生まれる。

8. ゲノム編集技術の未来

2本鎖 DNA 切断と DNA 修復のエラーを利用したゲノム編集技術のメリットは遺伝子破壊にかぎらない。切断部位をオーバーラップする1本鎖オリゴ DNA のなかほどに変異を導入しておけば、標的変異を内在性のゲノムに導入することができる。もちろん、単なる DNA 切断に比べて変異の導入効率は低いが、ES 細胞を使わずに受精卵から1世代で標的変異をもつマウスを作製できるのは魅力である。基本的には、両側に50塩基ほどの相同性をもつ100~130塩基のオリゴ DNA を使うことにより、1塩基の置換や FLAG タグの挿入ができる(図 3a)。遺伝子を破壊すると致死となるような場合でも点変異の導入なら生存することも十分に考えられ、ヒトの疾患とまったく同じ変異を導入することなどで疾患モデルマウスとしての可能性が広がっている。ここでは、発想を逆転して、点変異の遺伝子治療に使われた例を紹介する。フマリルアセト酢酸ヒドラーゼをコードする遺伝子に変異をもつためチロシンを分解できず肝障害を起こす高チロシン血症モデルマ

ウスに、この変異部位を切断する Cas9 および gRNA を発現するプラスミドとともに、野生型の配列をもつ1本鎖 DNA を静脈注射したところ、一部の肝細胞において遺伝子変異が正常にもどり、さらに、異常な細胞と徐々に置き換わることにより投薬治療の必要なくなったことが報告された¹²⁾。

数十塩基をこえるような長い配列を標的遺伝子座に導入したい場合には、1本鎖 DNA ではなく、相同性をもたせた2本鎖 DNA を同時に注入することになる(図 3a)。ただし、2本鎖 DNA 切断により相同組換え率が改善されるとはいえ、受精卵への2本鎖 DNA の注入により相同組換えマウスを作製することはむずかしい。およそ20%の初期胚においてレポーター遺伝子の発現が確認されたとの報告があるが¹³⁾、筆者らの経験や私信では、実際に生まれてくる相同組換えマウスは多くても産仔の1~5%と考えられる。相同組換えマウスを確実に得るには1000個近い受精卵を処理して100匹近くを産ませる必要があり、コストや動物愛護の観点から、さらなる効率の改善がもと

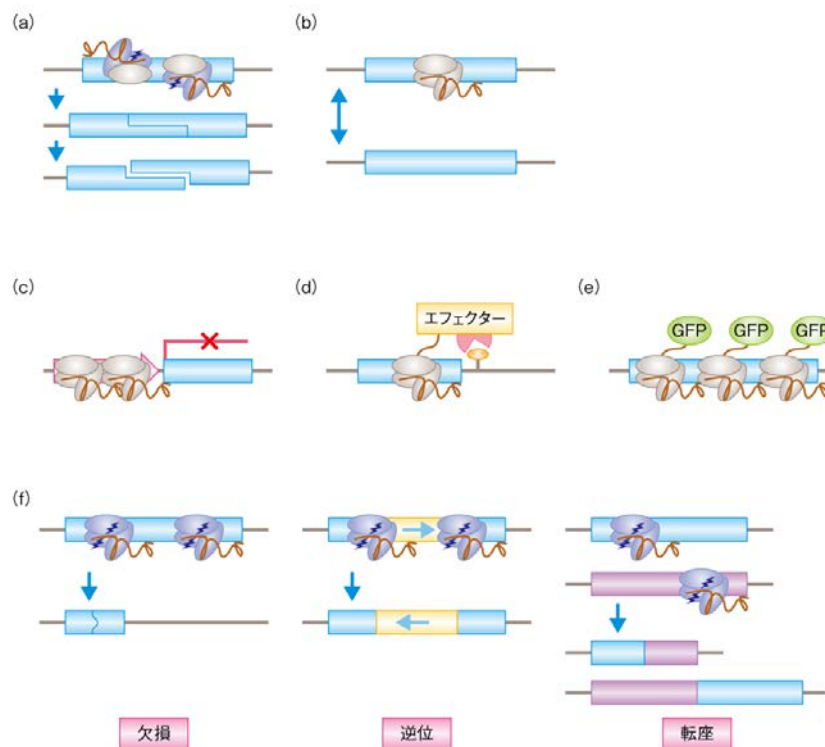


図5 ゲノム編集の応用

(a) Cas9 nickase. 2箇所の酵素活性部位のうち片方を破壊した Cas9 nickase を2つの gRNA と組み合わせると、ZFN や TALEN のように標的的特異性の高い切断が可能になる。

(b) dead Cas9. 2箇所の酵素活性部位を両方も破壊した dead Cas9 は、標的配列と結合するが切断することはできない。

(c) 転写制御. dead Cas9 を標的遺伝子のプロモーターに結合させることにより、転写を阻害する CRISPRi 法が報告されている。

(d) エピゲノムの修飾. dead Cas9 にエフェクターを融合させることにより、標的遺伝子座の DNA メチル化あるいはヒストンの修飾を変化させることができる。

(e) イメージング. dead Cas9 に EGFP を融合させることにより、標的遺伝子座を可視化することができる。

(f) 染色体レベルでの遺伝子改変. 2つの gRNA と Cas9 により、領域を欠損させたり、逆位あるいは転座を起こしたりなど、染色体レベルでの遺伝子改変を行える。

められるであろう。現時点では、ES 細胞における遺伝子ターゲットのときに 2 本鎖 DNA 切断を誘導して効率化を図るほうが実用的かもしれない。

ところで、野生型の Cas9 スクレアーゼは 2 箇所の酵素活性部位をもち、2 本鎖 DNA の両方の鎖を別々に切断する。そこで、片方の活性部位を破壊した Cas9 nickase (図 5a)、および、両方の活性部位を破壊した dead Cas9 が作製されている (図 5b)。たとえば、Cas9 nickase を 2 つの gRNA と組み合わせ、それぞれがセンス側およびアンチセンス側の両方を切断したときにはじめて遺伝子破壊を起こすことにより、オフターゲットの切断を軽減するというアプローチも報告されている¹⁴⁾。また、dead Cas9 を標的となる遺伝子座に結合させることにより転写制御の阻害をねらう CRISPRi 法や¹⁵⁾ (図 5c)、dead Cas9 に修飾酵素をつないでエピゲノム修飾を改変する試み¹⁶⁾ (図 5d)、あるいは、dead Cas9 に GFP をつないで標的遺伝子を可視化する試みも報告されている¹⁷⁾ (図 5e)。いずれも ZFN や TALE を使って報告されてきたアプローチではあるが、gRNA を変えるだけでよい CRISPR/Cas 系と組み合わせることで汎用性は飛躍的に改善される。まだ細胞レベルでの実験が多いため、今後は、個体レベルでの応用が期待される。また、2014 年になり、Cas9 スクレアーゼの立体構造も報告され¹⁸⁾、原理面からのアプローチも可能となったことから、活性や特異性の改善にくわえて新たな利用法の開発もはじまっている。

9. そのほかの技術

ここまでは、単一の遺伝子に対する遺伝子改変技術について紹介したが、もっとスケールの大きな遺伝子改変技術もある。これまで長い領域を欠損させる場合には、欠損させたい領域の両側にまたがる遺伝子ターゲットベクターを用いて相同組換えを起こすことが多かった。あるいは、染色体の 2 箇所に *loxP* 部位を挿入し、Cre リコンビナーゼによりこれを抜き取るのが一般的であった。それが CRISPR/Cas 法であれば、ゲノムの 2 箇所に gRNA をデザインし Cas9 スクレアーゼにより切断することでこれを簡単に実現できる (図 5f)。筆者らは 60 kbp の領域を欠損させているが、私信では Mbp のレベルで欠損させたケースもある。いずれの場合も、解析したクローンの 5~10% で欠損が生じるという実用可能な効率であった。また、同一の染色体の 2 箇所を切断すると一定の頻度で逆位を得ることもできるし、異なる染色体であれば転座を誘導することもできる (図 5f)。これらは、もはや染色体工学の域に入るであろう。

染色体工学といえば、人工染色体を生殖系列に伝達することのできるトランスクロモソミックマウスが開発されている¹⁹⁾。染色体においてクラスターを構成するような薬物代謝関連酵素や、ヒト抗体医薬の生産などに使える技術として注目されているが、いちどマウス化したのちの

遺伝子改変が困難であった。ゲノム編集技術との組合せによる進展が期待される。

ところで、2 倍体細胞では父方および母方の両方の対立遺伝子において遺伝子改変する必要があるが、1 倍体細胞であれば 1 遺伝子の破壊あるいは改変により表現型が観察できる。2011 年、マウスにおいて単為発生させた胚から 1 倍体の ES 細胞が樹立され、これを 2 倍体化すれば体細胞や生殖細胞に分化させることのできることを示された²⁰⁾。ヒトでは KBM7 細胞株や HAP1 細胞株のように 1 倍体に近い状態で維持できる細胞株が知られており、ゲノム編集技術による大規模な遺伝子破壊が試みられている。1 倍体の ES 細胞が安定的に維持できるようになれば活用が広がるであろう。

おわりに

哺乳類細胞において CRISPR/Cas 法が機能することが報告されてから 1 年ほどのあいだに、ゲノム編集技術は遺伝子改変マウスの常識をくつがえし、生命科学および医学の研究に大きなインパクトをあたえた。予算面から本格的な活動にはいたっていないものの、わが国でも、CRISPR/Cas 法を活用した次世代の遺伝子改変動物により先進的な医学研究を推進するプロジェクトが胎動している (URL: <http://fmena.biken.osaka-u.ac.jp/>)。すでに、ラットやウサギ、家畜動物、サルでもゲノム編集技術の成功が報告されており、疾患モデルの開発にくわえ治療法への応用など、今後は前臨床研究の推進による臨床研究あるいは創薬への橋渡しも期待される。

文献

- 1) Gondo, Y., Fukumura, R., Murata, T. et al.: ENU-based gene-driven mutagenesis in the mouse: a next-generation gene-targeting system. *Exp. Anim.*, 59, 537-548 (2010)
- 2) Shigeoka, T., Kawaichi, M. & Ishida, Y.: Suppression of nonsense-mediated mRNA decay permits unbiased gene trapping in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.*, 33, e20 (2005)
- 3) Kanatsu-Shinohara, M., Ikawa, M., Takehashi, M. et al.: Production of knockout mice by random or targeted mutagenesis in spermatogonial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 8018-8023 (2006)
- 4) Austin, C. P., Battay, J. F., Bradley, A. et al.: The knockout mouse project. *Nat. Genet.*, 36, 921-924 (2004)
- 5) Gaj, T., Gersbach, C. A. & Barbas, C. F. 3rd.: ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.*, 31, 397-405 (2013)

- 6) Sakuma, T., Ochiai, H., Kaneko, T. et al.: Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Sci. Rep.*, 3, 3379 (2013)
- 7) Cong, L., Ran, F. A., Cox, D. et al.: Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339, 819-823 (2013)
- 8) Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M. et al.: RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339, 823-826 (2013)
- 9) Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S. et al.: One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153, 910-918 (2013)
- 10) Mashiko, D., Fujihara, Y., Satouh, Y. et al.: Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci. Rep.*, 3, 3355 (2013)
- 11) Mashiko, D., Young, S. A., Muto, M. et al.: Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes. *Dev. Growth Differ.*, 56, 122-129 (2014)
- 12) Yin, H., Xue, W., Chen, S. et al.: Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat. Biotechnol.*, 32, 551-553 (2014)
- 13) Yang, H., Wang, H., Shivalila, C. S. et al.: One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 154, 1370-1379 (2013)
- 14) Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y. et al.: Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154, 1380-1389 (2013)
- 15) Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A. et al.: Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152, 1173-1183 (2013)
- 16) Perez-Pinera, P., Kocak, D. D., Vockley, C. M. et al.: RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat. Methods*, 10, 973-976 (2013)
- 17) Chen, B., Gilbert, L. A., Cimini, B. A. et al.: Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*, 155, 1479-1491 (2013)
- 18) Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D. et al.: Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156, 935-949 (2014)[新着論文レビュー]
- 19) Kazuki, Y., Hoshiya, H., Takiguchi, M. et al.: Refined human artificial chromosome vectors for gene therapy and animal transgenesis. *Gene Ther.*, 18, 384-393 (2011)
- 20) Leeb, M. & Wutz, A.: Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature*, 479, 131-134 (2011)

参考図書

- 山本 卓 (編): 今すぐ始めるゲノム編集 (実験医学別冊). 羊土社 (2014)
- Yamamoto, T. & Nakamura, H. (eds.): Special Issue: Genome Editing. *Dev. Growth Differ.*, 56, 1-129 (2014)

著者プロフィール

伊川 正人 (Masahito Ikawa)

略歴: 1997年 大阪大学大学院薬学研究科博士課程 修了, 2000年 米国 The Salk Institute 博士研究員, 2004年 大阪大学微生物病研究所 助教授を経て, 2011年より同 教授.

抱負: 新しい遺伝子改変技術を開発および応用しながら, 受精を中心とする哺乳類の生殖の機構を明らかにしたい.

研究室 URL: <http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/>