

ドメイン (FokI) を融合させた新規の人工ヌクレアーゼTALENヌクレアーゼ (TALEN) ¹⁰⁾ を使って、線虫、ゼブラフィッシュ、ラット¹¹⁾などで標的遺伝子の破壊が報告されている。TALENは、ZFNと異なり標的DNA配列を正確にデザインすることが可能で、短期間に作製できるという利点が挙げられる。しかしながら、配列特異性については現在複数の研究グループが解析を進めており、作製方法や設計方法についていまだ不明な点も多い。今後の開発が期待される技術である。

ZFNは、これまでマウス、ラット以外にも、哺乳類細胞、ショウジョウバエ、線虫、ウニ、タバコ、

トウモロコシ、ゼブラフィッシュ、ウサギ、ブタなどの様々なモデル生物で利用されている。ラットでは、ZFN/TALEN技術を利用して、循環器疾患、糖尿病、がん、脳神経疾患などのモデルが多数作製されている。さらには、個体レベルでの遺伝子改変だけではなく、ZFN/TALEN技術を利用してES細胞やiPS細胞での遺伝子改変も可能であることから、遺伝子治療や再生医療にも応用されている。ZFN/TALENのような人工ヌクレアーゼにより、今後の基礎および臨床研究が大きく飛躍すると信じている。

用語解説

1. ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」: 2002年度から文部科学省は、実験動植物や細胞、遺伝子材料などのバイオリソースを体系的に「収集・保存・提供」する体制を整備するナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) を開始した。京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設は、ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」の中核機関として、これまでに600系統を超えるラット系統を保有しており、日本および世界中の研究者がラットリソースを利用できる環境を作っている。
2. ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN): DNA配列を特異的に認識するジンクフィンガータンパクと、制限酵素 FokI 由来の配列非依存的 DNA 切断活性ドメインを人工的に融合した人工ヌクレアーゼタンパク。人工ヌクレアーゼを利用することで、細胞や動物の遺伝子を自由に破壊 (ノックアウト)、あるいは改変 (ノックイン) することが可能になった。
3. 重症複合免疫不全 (SCID): T細胞の数または機能

- の異常により、細胞性免疫不全を主体とする疾患。T細胞機能不全があれば、B細胞による適切な抗体産生も行われなくなるため、液性免疫不全も合併する。ヒトでは、生後数週間以内から反復感染、下痢、成長障害などを示す。造血幹細胞移植が行われなければ、乳児期に死亡する重篤な疾患である。
4. ヒト化動物: 拒絶反応の弱い重症免疫不全動物にヒト細胞や組織を移植することで、動物体内でヒト臓器・組織の再構築を行い、持続的にヒトの生理と機能を有する動物をヒト化動物と呼んでいる。ヒト化動物は、これまで不可能であった動物個体内におけるヒト生理・病理学的解析研究や非臨床研究、創薬研究などに利用することができる。
5. TALEヌクレアーゼ (TALEN): DNA配列を特異的に認識する植物細菌 *Xanthomonas* 由来の transcription activator-like effectors (TALE) タンパクと DNA 切断活性ドメイン FokI を融合させた人工ヌクレアーゼである。ZFNと同様に遺伝子改変技術として利用される。

参考文献

- 1) Serikawa T : Nature 429, 15, 2004.
- 2) Tong C, et al : Nature 467, 211-213, 2010.
- 3) Porteus MH, et al : Nat Biotechnol 23, 967-973, 2005.
- 4) Urnov FD, et al : Nat Rev Genet 11, 636-646, 2010.
- 5) Mashimo T, et al : PLoS One 5, e8870, 2010.
- 6) Geurts AM, et al : Science 325, 433, 2009.
- 7) Cui X, et al : Nat Biotechnol 29, 64-67, 2011.
- 8) Ito M, et al : Curr Top Microbiol Immunol 324, 53-76, 2008.
- 9) Wood AJ, et al : Science 333, 307, 2011.
- 10) Tesson L, et al : Nat Biotechnol 29, 695-696, 2011.

参考ホームページ

- ・ ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」
<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/NBR/>
- ・ 米国非営利団体 Addgene
<http://www.addgene.org/>

真下知士

1994年 京都大学農学部畜産学卒業
2000年 同大学院人間環境学研究科博士課程修了 (人間環境学博士)
パスツール研究所免疫学講座哺乳動物遺伝学教室 (Jean-Louis Guenet 博士)
2003年 京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設特定准教授
ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」事業に参画

ラットにおける遺伝子改変技術の新展開

Genome Engineering Technologies in Rats

真下知士, 金子武人

Tomoji Mashimo, Takehito Kaneko

ポストゲノム時代において遺伝子を自由に破壊・挿入・改変することができる「ゲノム編集」技術が注目されている。実験ラットにおいてはZFNあるいはTALENを利用することで、遺伝子改変ラット(ヒト疾患モデル)を自由に作製できるようになった。これらのゲノム編集技術は短期間(約4~6カ月)かつ低コストであらゆる系統において遺伝子改変ができる優れた技術で、マウス、ラットだけではなくウサギ、ブタ、サルなどの中大動物にも利用されている。筆者らはエキソヌクレアーゼ(Exo1)とTALENをラット受精卵に共導入することにより、より効率的な遺伝子改変ラットの作製技術を開発した。



ラット, 遺伝子改変動物, ZFN, TALEN, Exo1

はじめに

マウス・ラットは遺伝と環境を統御した実験系に用いることができる実験動物として世界中で広く利用されている。ラットは実験動物として取り扱いが容易で、外科的な処置や多様な目的に応じた生体試料の採取が可能な手頃な大きさである。それゆえ、古くから生理学、繁殖学、栄養学、薬理学、行動学、移植学などにおける基礎研究や、医薬品候補物質などの評価試験や安全性試験に多用されてきた。また、ヒトと同じ哺乳動物であり、ヒト疾患モデル動物としての利用価値も高い。例えば、本態性高血圧症モデルのSHR (Spontaneously Hypertensive Rat)、糖尿病モデルのKDP (Komeda Diabetes-prone)、OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty)、GK (Goto-Kakizaki)、肝炎・肝がんモデルLEC (Long Evans Cinnamon) ラットなどは日本で開発され、ヒト病態発症の解明や治療薬・予防法の開発に貢献している。

一方、マウスは胚性幹細胞(ES細胞)による遺伝子改変技術を用いることで遺伝子を破壊したノックアウト(KO)マウスを作製することができるため、疾患原因遺伝子をKOしたヒト疾患モデルとして利用することができる。さらに、遺伝子を改変(編集)したノックインマウスや、時期・組織特異的に遺伝子を破壊したコンディショナルKOマウスなどを作製して、遺伝子の機能を個体レベルで解明する研究などにも利用されている。現在、すべての遺伝子を網羅的に破壊する全遺

伝子KOマウスプロジェクトも進行している。

最近になって、表1に示すようにラットにおける遺伝子改変技術が大きく進歩した^{1)~3)}。例えば、2010年にラットES細胞によるKOラットの作製が報告された。さらに、人工ヌクレアーゼZFN (zinc finger nuclease) /TALEN [TALE (transcription activator-like effectors) nuclease] による効率的な遺伝子改変技術が次々と開発され、実験動物としてのラットの位置づけが大きく変わろうとしている。本稿では、これらラットにおける遺伝子改変技術の進歩について総説する。

I ラットにおける遺伝子改変技術の開発

2003年、ENUミュータジェネシス法により世界で初めて*Brca2* 遺伝子(ヒト家族性乳がん遺伝子)を破壊したKOラットが報告された⁴⁾。ENUミュータジェネシス法は、化学変異原物質エチルニトロソウレア(*N*-ethyl-*N*-nitrosourea: ENU)により人為的に点突然変異を起こしたミュータントラットを多数作製し、ヒト疾患の原因遺伝子に相同するラット遺伝子を標的としてDNAスクリーニングを行うことで、ヒト疾患遺伝子の突然変異を有するミュータントラットを作出する方法である。筆者らも、経済産業省のNEDO産業技術研究助成支援を受けて、ラット約10,000匹のENUミュータジェネシスアーカイブ(KURMA10000)を作製し、新規に開発したDNAスクリーニング法MuT-POWERを組み合わせることで、効率的に標的遺伝子変異

■表1 ラットにおける遺伝子改変技術の目覚ましい進歩

遺伝子改変技術	特徴	文献
ENUミュータジェネシス	主に点突然変異(SNP)	4), 5)
ラットES細胞	遺伝子改変が自由, 効率に難あり	6)
ZFN	効果的に遺伝子破壊, ZFN作製が困難.	9), 11)
TALEN	ZFN同様に遺伝子破壊, TALEN作製が簡単.	14), 16)
その他(CRISPR/Casなど)	より効果的な遺伝子改変技術?	—

ラットを作製する技術を開発した⁵⁾. この遺伝子改変技術を利用することで, これまでに*Apc*遺伝子(がん), *Scn1a*遺伝子(熱性けいれん), *Lep*遺伝子(肥満), *Ldlr*遺伝子(高脂血症), *Lgil*遺伝子(てんかん)などの標的遺伝子変異ラットを作出している(http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/enu/home_jp.aspx). ENUミュータジェネシス法により作製された遺伝子改変ラットは, ヒト疾患の遺伝子変異に見られるアミノ酸置換(ミスセンス変異)を有したモデルが多い.

2008年, ES細胞の培養条件を変えることで, ジャームライントランスミッションが確認されたラットES細胞が報告された. さらに2010年, ラットES細胞を利用してがん遺伝子*p53*を破壊したKOラットが作製された⁶⁾. KOマウスが初めて作製されてから約20年の時を経たことになる. ラットES細胞を利用することで, マウス同様のノックインやコンディショナルKOラットを作製することができるが, ラットES細胞はマウスES細胞に比べて分化しやすいなどの特徴があり, 培養条件や相同組換え技術などの改善が必要である.

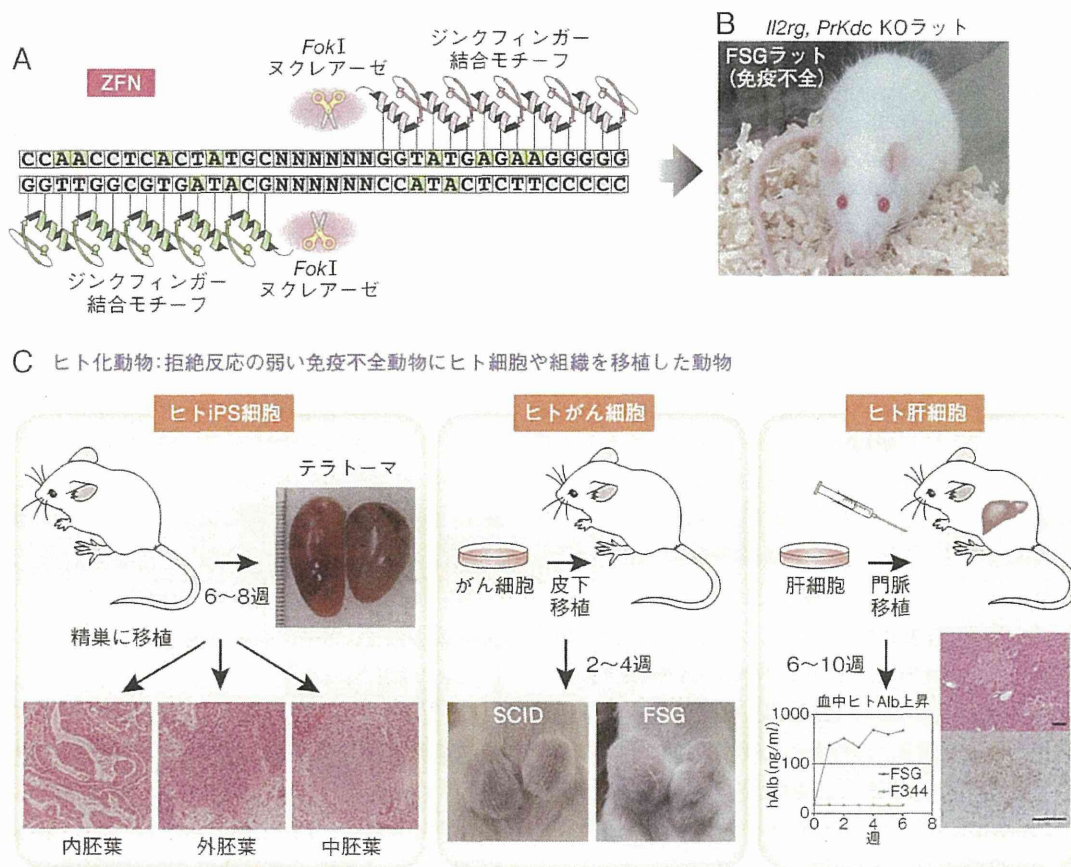
II ZFNによる遺伝子改変

最近, ES細胞による遺伝子改変技術とはまったく異なる技術が注目を浴びている^{7)~9)}. ZFNはDNA配列を特異的に認識するジンクフィンガータンパク質と, DNAを切断する*Fok I*ヌクレアーゼを人工的に融合したタンパク質のことである(図1A). 1つの“ジンクフィンガー”ユニットは3bpのDNAに結合するため, 3~6個の異なるジンクフィンガーユニットを組み合わせることで9~18bpのDNA塩基配列を特異的に認識することができる. 標的とするDNA配列内に5~6bpを挟んでジンクフィンガーを2つデザインすることでジンクフィンガーに結合している*Fok I*ヌクレアーゼが挟まれた5~6bpのDNA領域に二本鎖切断(double-strand break; DSB)を導入することができる.

切断された二本鎖DNAは, 通常, 非同末端結合(non-homologous end-joining; NHEJ)により修復されるが, この修復過程でしばしばDNA欠失(または挿入)変異が起こる³⁾. また, 標的DNA配列に対して相同DNA配列が存在すると, 相同組換え(homologous recombination; HR)が起きてDNA配列が改変される. この過程は理論的にはあらゆるDNA配列(あらゆる遺伝子)に適用できることから, 人工的にデザインされたZFNを用いることで標的遺伝子を自由に破壊(ノックアウト), あるいは改変(ノックイン)することが可能となった¹⁰⁾.

筆者らは, このZFN技術を利用して, X連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)の原因遺伝子であるインターロイキン2受容体γ鎖(*Il2rg*)のKOラット(X-SCIDラット)を作製した¹¹⁾. さらに, ZFN技術により*Prkdc*遺伝子を欠損したSCIDラット, *Prkdc*遺伝子と*Il2rg*遺伝子両方を同時に欠損したFSG(F344-*scid Il2rg*)ラットを作製することに成功した(図1B)¹²⁾. SCIDラットは胸腺の著しい萎縮, T細胞, B細胞の完全な欠失が認められた. 興味深いことに, SCIDマウスでは血中IgGなどの免疫グロブリンが検出される“Leaky(漏出)”という現象が報告されているが, SCIDラットではこのLeaky現象がなかった. また, SCIDラットはSCIDマウスとは異なり, 体重の減少, 線維芽細胞(REF)の増殖能力低下, 老化現象を示した. これらマウスとラットにおける特性の違いは, 生物種間における遺伝子機能の差によるものと考えられる.

免疫不全動物にヒト細胞や組織を移植することで, 動物体内にヒト細胞や組織を構築した動物のことをヒト化動物という. ヒト化動物は, これまで不可能であった動物個体内におけるヒト生理学的研究ができることから, 非臨床研究・創薬研究などに有用である. 筆者らは, ヒトiPS細胞をSCIDおよびFSGラットの精巣に移植したところ, テラトーマ(奇形腫)と呼ばれる内胚葉, 中胚葉, 外胚葉由来の多種類の分化した細胞を形成させることに成功した(図1C)¹²⁾. また, ヒト卵巣がん細胞株を移植することで, 免疫不全ラットの体内



■図1 ZFNによる遺伝子改変動物の作製

A: ZFNは1つのジンクフィンガーユニットが3bpのDNA配列を認識し、FokIヌクレアーゼがDNAを切断する。

B: ZFN技術により作製された*Prkdc, Il2rg*遺伝子ダブルKOラット(FSGラット)。

C: ヒトiPS細胞, ヒト卵巣がん細胞, ヒト肝細胞を移植したヒト化ラット。スケールバーは100 μm。

Mashimo T, et al: Cell Rep (2012) 2: 685-694より改変。

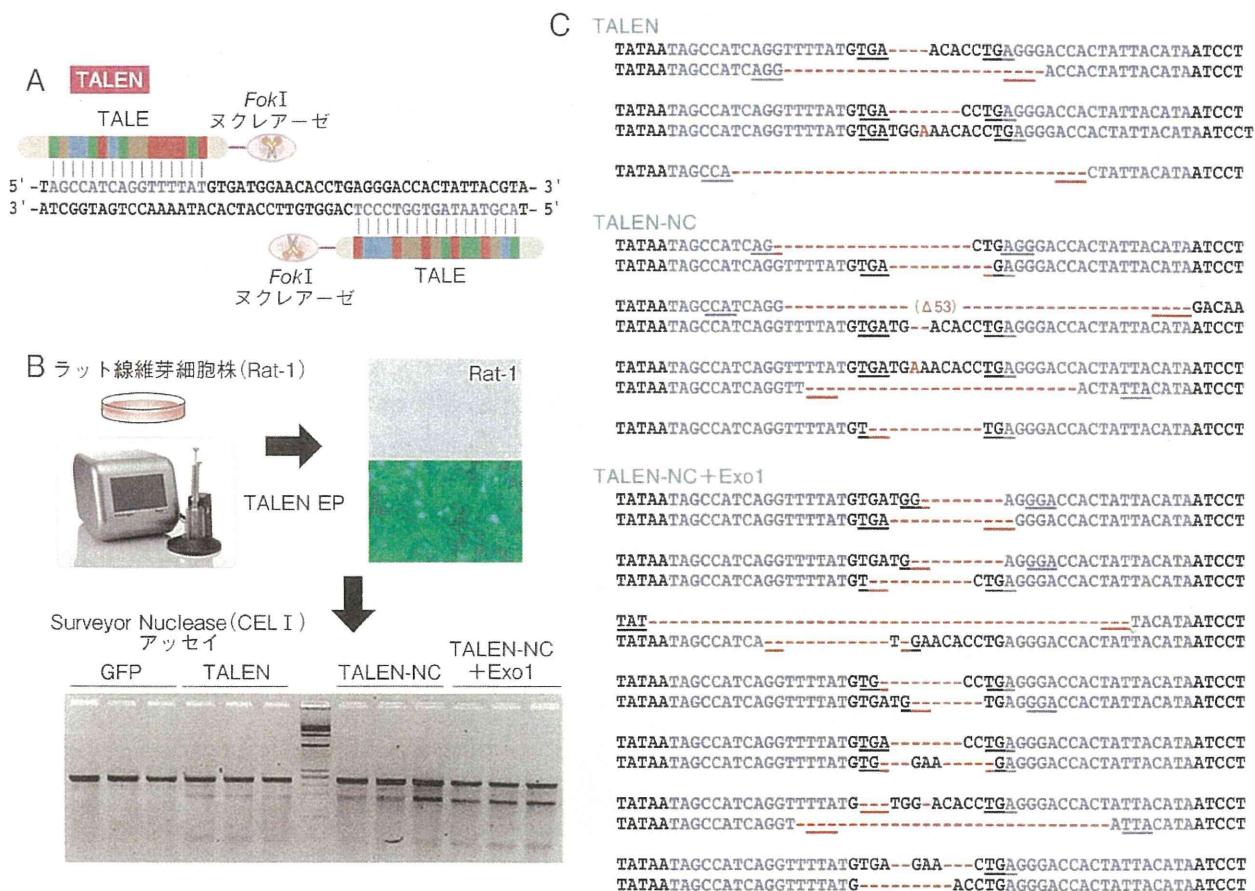
でヒト腫瘍細胞を増殖させることができた。さらに、ヒト肝細胞を移植した肝臓のヒト化ラット作製にも成功している¹²⁾。ラットはマウスに比べて体のサイズが約10倍あることから、血液や胆汁、細胞や組織をたくさん採取することができる。血液細胞などのヒト化ラットに成功すれば、ヒト化マウスに比べて様々なメリットがあると考えられる。SCIDラットはがん研究、幹細胞移植研究、創薬研究などにも広く利用されるモデル動物になるだろう。

III TALEN

ZFN技術は従来のES細胞を用いた遺伝子改変技術に比べ

て、短期間で効率的にノックアウト動物を作製することができる。しかしながら、ZFNプラスミドを自分たちの研究室で作製することが難しく、また標的遺伝子の切断箇所を自由に設計できないなどの欠点がある。これら欠点を克服する技術として、TALENという遺伝子改変技術が注目されている^{13), 14)}。植物の病原細菌である*Xanthomonas* (キサントモナス) から発見されたDNA結合タンパク質TALEとDNA切断ドメインFokIを融合させた人工ヌクレアーゼで、自分たちの研究室で短期間にTALENプラスミドを作製することができる。また、TALEタンパク質は標的遺伝子の1塩基ずつを認識することから、標的DNA配列を自由に設計できるなど、ZFNよりも利便性が高い。

筆者らは、広島大学山本 卓教授らとの共同研究により、



■ 図2 TALENによるラット線維芽細胞 (Rat-1) での遺伝子変異導入

A: ラットチロシナーゼ (*Tyr*) 遺伝子を認識する TALEN.

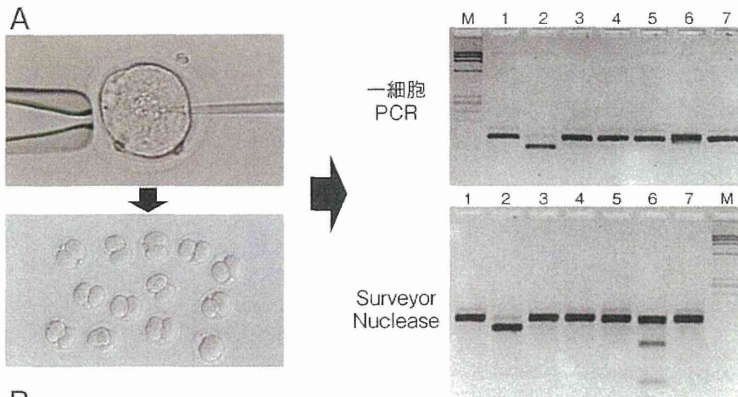
B: 作製した TALEN プラスミドをラット線維芽細胞 (Rat-1) に電圧ポレーション (EP) 法により導入する。二本鎖 DNA ミスマッチを切断する CEL I エンドヌクレアーゼを利用した Surveyor Nuclease アッセイにより TALEN による遺伝子変異導入を確認した。

C: Rat-1 細胞内の *Tyr* 遺伝子に導入された数~数十 bp の遺伝子変異。エキソヌクレアーゼ (Exo1) により遺伝子変異率が上昇している。

ラットチロシナーゼ (*Tyr*) 遺伝子を標的とする TALEN プラスミドを作製した (図2A)¹⁵⁾。*Tyr* はメラニン色素の合成に関わる遺伝子で、動物では遺伝子に変異あるいは欠損すると体毛や皮膚が白くなる色素欠乏症、いわゆるアルビノになる。作製した TALEN プラスミドを電圧ポレーション法によりラット線維芽細胞 (Rat-1) に導入することで細胞内の *Tyr* 遺伝子に数~数十 bp の遺伝子変異を確認した (図2B, C)。さらに、エキソヌクレアーゼ (Exo1) 発現ベクターを TALEN プラスミドと一緒に共導入することで、その遺伝子変異率が上昇した。ラット受精卵でも TALEN と Exo1 の mRNA をマイクロインジェクションにより共導入することで、*Tyr* 遺伝子変異が確認された (図3A)。ラット受精卵においては TALEN 単独の場合 (5.6%) と比べて、Exo1 は遺

伝子変異導入率が 28.6% に上昇した。この TALEN と Exo1 を利用した方法により、*Tyr* 遺伝子 KO ラット (アルビノラット) を作出することに成功した (図3B)¹⁶⁾。

iPS 細胞、植物、ゼブラフィッシュなどで、TALEN を利用したゲノム編集が多数報告されている。しかしながら、マウス・ラットでは遺伝子改変効率が低いためか、それほど多くない。筆者らは TALEN と一緒に Exo1 を共導入することで、遺伝子改変動物の作製効率を約 5 倍上昇させることに成功した¹⁶⁾。TALEN により導入された遺伝子の二本鎖切断部位において、エキソヌクレアーゼが 5' から 3' 方向に DNA を分解することで、DNA 損傷修復機構における変異導入効率を上げているのではないかと考えている。この方法は、受精卵に Exo1 と TALEN 両方の mRNA を一緒に混ぜて導入するだけ



gT-NC-Exo1-#1
TATAATAGCCATCAGGTT----- (Δ29bp) -----**ATTACGTAATCCT**
 gT-NC-Exo1-#7
TATAATAGCCATCAGGTTTTATGTGATGGAACACCTGAGGGACCACTATTACGTAATCCT
TATAATAGCCATCAGG----- (Δ24bp) -----**GACCACTATTACGTAATCCT**
 gT-NC-Exo1-#8
TATAATAGCCATCAGGTTTTATGTGATGGAACACCTGAGGGACCACTATTACGTAATCCT
TATAATAGCCATCAGGTTTTATGTGATG----- **CCTGAGGGACCACTATTACGTAATCCT**

■ 図3 TALENによる遺伝子改変動物の作製
 A: TALEN mRNAをラット受精卵にマイクロインジェクション。2細胞期胚においてSurveyor Nucleaseアッセイにより確認された遺伝子変異(2, 6レーン)。
 B: TALENとExo1の共導入により作製されたTyr遺伝子KOラット(アルビノラット)。

で非常に簡単に遺伝子改変を行うことができる。さらに、マウス、ラットだけでなくウサギ、ブタ、ウシ、サルなどの中大動物にも利用できるため、今後、実験動物や家畜におけるゲノム編集技術が大きく発展するだろう。

■ 表2 ZFN/TALENを用いた遺伝子改変動物作製のメリット

短期間	4~6カ月でノックアウト動物を作製することができる(ES細胞によるノックアウト動物作製は9~12カ月)。
低費用	操作(マイクロインジェクション、胚移植など)が簡単
選択性	あらゆる系統(遺伝的背景)のあらゆる遺伝子に変異導入
組換え	相同組換え(ノックイン)も可能
同時性	ダブル、トリプルノックアウト、染色体転座、領域欠損なども可能
生物種	マウス、ラットだけでなく、これまで不可能であったウサギ、ブタ、サルなどの中大動物で遺伝子改変が可能。

IV その他のゲノム編集技術

近年、細菌や古細菌が持つ獲得免疫システムCRISPR/Casを利用してヒト、マウス細胞、iPS細胞においてゲノム編集が可能であることが報告された^{17), 18)}。CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) とはリピート配列とスペーサー配列の繰り返しによって構成されるゲノム領域のことで、日本人研究者により大腸菌で最初に発見された¹⁹⁾。細菌や古細菌においては、crRNA (CRISPR RNA) という短いRNAが侵入してきたウイルスやプラスミド配列

を認識し、crRNAに結合したtracrRNA (trans-activating crRNA) がCas9 (CRISPR-associated 9) スクレアーゼを案内(ガイド)することで、Cas9スクレアーゼがウイルスやプラスミドDNAを分解する。このCRISPRとCas9の特性を利用したゲノム編集技術はRGEN (RNA-guided endonuclease) とも呼ばれている。

ZFN/TALENと同様、「RGEN」による哺乳動物細胞やiPS細胞におけるゲノム編集が報告されており、マウス・

ラットなどの哺乳動物胚での遺伝子改変にも利用されるだろう。ZFN/TALENは標的配列をジンクフィンガーあるいはTALEタンパク質で認識するが、RGENは合成RNAが標的配列をより正確に認識することができる。また、ガイドするRNAの作製も非常に簡単である。ZFN/TALENに加えてRGENによるゲノム編集技術が期待されている。

おわりに

人工ヌクレアーゼZFN/TALEN技術は、従来のES細胞技術に比べて、以下のようなメリットが挙げられる(表2)。通常、ES細胞を用いてノックアウト動物を作製する場合は、ベクターの作製から個体作製まで約9~12カ月を要する。しかし、ZFN/TALENの場合はベクター作製、マイクロインジェクション、個体作製までに約4~6カ月で可能である。ES細胞による遺伝子改変は、ES細胞が確立された系統(マウスの場合、129系統やC57BL/6系統など)にしか利用できないが、ZFN技術はあらゆる系統で用いることができる。また、ダブル(トリプル)ノックアウト動物を同時に作製することも可能である。ES細胞技術に比べて、遺伝子改変(ノックイン)動物の作製も容易に行える。これまではES細胞がないために遺伝子改変動物を作製できなかった中大動物(ウサギ、ブタ、ウシ、サルなど)にも利用することが可能である。人工ヌクレアーゼZFN/TALENあるいはRGENを含め

た効率的な遺伝子改変動物の作製技術は、これからも驚くほどのスピードで進歩していこう。これらゲノム編集技術により、多数の遺伝子改変動物が作製されることで、先進的医学研究・創薬研究・再生医療研究などの発展が期待される。

PROFILE 真下知士

- 京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
- E-mail : tmashimo@anim.med.kyoto-u.ac.jp
- 趣味: 旅行, 映画, 水泳, ゴルフ

1994年京都大学農学部畜産学卒業, 2000年京都大学大学院人間環境学研究科博士課程修了(人間環境学博士)後, フランスパスツール研究所免疫学講座哺乳動物遺伝学教室Jean-Louis Guenet博士のもとに留学, 2003年帰国後, 現所属にてナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」事業に参画。

PROFILE 金子武人

- 京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
- E-mail : tkaneko@anim.med.kyoto-u.ac.jp
- 趣味: 剣道, アウトドアアクティビティ

2000年近畿大学大学院生物理工学研究科修了, 同年熊本大学動物資源開発研究センター助手, 2001年から2003年までハワイ大学柳町隆造研究室に留学, 帰国後熊本大学生命資源研究・支援センター助教を経て, 2010年より京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設講師としてナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」事業に参画。

文献

- 1) Aitman TJ, et al: Nat Genet (2008) 40: 516-522
- 2) Mashimo T, et al: Curr Pharm Biotechnol (2009) 10: 214-220
- 3) 真下知士ら: 細胞工学 (2012) 31: 296-301
- 4) Zan Y, et al: Nat Biotechnol (2003) 21: 645-651
- 5) Mashimo T, et al: Nat Genet (2008) 40: 514-515
- 6) Tong C, et al: Nature (2010) 467: 211-213
- 7) Porteus MH, et al: Nat Biotechnol (2005) 23: 967-973
- 8) Urnov FD, et al: Nat Rev Genet (2010) 11: 636-646
- 9) Geurts AM, et al: Science (2009) 325: 433
- 10) Cui X, et al: Nat Biotechnol (2011) 29: 64-67
- 11) Mashimo T, et al: PLoS One (2010) 5: e8870
- 12) Mashimo T, et al: Cell Rep (2012) 2: 685-694
- 13) Wood AJ, et al: Science (2011) 333: 307
- 14) Tesson L, et al: Nat Biotechnol (2011) 29: 695-696
- 15) Sakuma T, et al: Genes Cells (2013) 18: 315-326
- 16) Mashimo T, et al: Sci Rep (2013) 3: 1253
- 17) Cong L, et al: Science (2013) 339: 819-823
- 18) Mali P, et al: Science (2013) 339: 823-826
- 19) Ishino Y, et al: J Bacteriol (1987) 169: 5429-5433

新たなゲノム編集技術 「CRISPR/Cas」

ホストゲノム時代において、遺伝子を自由に破壊、挿入、変異導入することができる「ゲノム編集技術」が注目されている(表)。ZFN (ジンクフィンガーヌクレアーゼ) やTALEN (TALエフェクターヌクレアーゼ) とよばれるゲノム編集技術を使って、iPS細胞やさまざまな動物細胞、植物やマウス、ラット、ブタなどの動物の遺伝子を自由に編集することができるため、遺伝子機能の解析研究だけでなく、農作物の品種改良、ヒト疾患モデル動物の作製、創薬、遺伝子治療、再生医療にまで利用されている。今回新たに、Broad Institute of MIT and HarvardのZhangら [Cong, L. et al.: Science, 3 in press (2013)], Harvard Medical SchoolのChurchら [Mali, P. et al.: Science, 3 in press (2013)] の2つの研究グループが、細菌や古細菌のもつ獲得免疫システム「CRISPR/Cas」を利用して、ヒト、マウス細胞、iPS細胞においてゲノム編集が可能であることを報告した。

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic

repeats) とは、リピート配列とスペーサー配列のくり返しによって構成されるゲノム領域のことで、日本人研究者により大腸菌で最初に発見された (Ishino, Y.: J. Bacteriol., 169: 5429-5433, 1987)。細菌や古細菌においては、crRNA (CRISPR RNA) という短いRNAが、侵入してきたウイルスやプラスミド配列を認識し、crRNAに結合したtracrRNA (trans-activating crRNA) がCas9 (CRISPR-associated) タンパク質を案内 (ガイド) することで、Cas9ヌクレアーゼがウイルスやプラスミドDNAを分解する。このCRISPRとCas9の特性を利用したゲノム編集技術は、RNA-guided endonuclease (RGEN) ともよばれている。

Zhangらは、このCRISPR/Casシステムを使って、ヒト293FT細胞において、約30塩基程のスペーサー配列を含むcrRNA、89塩基のtracrRNA、Cas9の3つを発現させることで、標的とするヒトEMX1遺伝子配列内に欠失(あるいは挿入)変異を導入することに成功した。CRISPR/Casは、スペーサー配列の下流に必ず3塩基

のPAM配列(XGG)が必要だが、興味深いのは、PAM配列のすぐ上流のスペーサー配列12塩基内に、1塩基のミスマッチがあるだけで、標的配列が切断されなくなった。このことは、CRISPR/Casシステムが正確に標的配列を認識することができることを意味する。さらに、相同組換え修復(HR)による遺伝子変異導入(ノックイン)、マウスN2A細胞でのゲノム編集、複数のcrRNAを同時に利用できること、などを報告している。

一方、Churchらは、crRNAとtracrRNAを結合したgRNA (guide RNA) とCas9の2つを利用して、ゲノム編集に成功した。内在性のヒトAAVS1遺伝子を標的として、293T細胞、K562細胞、ヒトiPS細胞において、それぞれ10~25%、13~38%、2~4%の遺伝子変異を導入した。こちらも、同時に複数の標的配列に変異を導入すること、相同修復組換えによるGFPベクターのノックインなどに成功している。

今回、CRISPR/Casによって、ZFN/TALENと同様に、哺乳動物細胞やiPS細胞におけるゲノム編集が報告された。今後、さまざまな遺伝子改変動物や植物の作製にも利用されるだろう。ZFN/TALENは標的配列をジンクフィ

表 ゲノム編集技術とそれぞれの特徴

ゲノム編集技術	特徴	費用
ZFN (zinc finger nuclease)	効果的に遺伝子改変できる。標的配列の自由度が低い。ベクター作製が困難	高(約100~150万円)
TALEN (transcription activator-like effector nuclease)	ZFN同様に遺伝子改変できる。標的配列を自由に選択。ベクター作製が簡単	中(約40~80万円)
CRISPR/Cas or RGEN (RNA-guided endonuclease)	効果的な遺伝子改変技術? 標的配列を自由に正確に認識。ベクター作製が非常に簡単	低(未販売?)

ンガーあるいはTALEタンパク質で認識するが、CRISPR/Casは合成RNAにより標的配列を認識するため、より正確で簡便な作製が

可能であるといわれている。ZFN/TALENに加えて、CRISPR/Casによるゲノム編集技術のさらなる発展に期待している。

(京都大学大学院医学研究科
真下知士)

トピックス

ネガティブフィードバックのトレードオフを回避するウイルスの発現制御回路

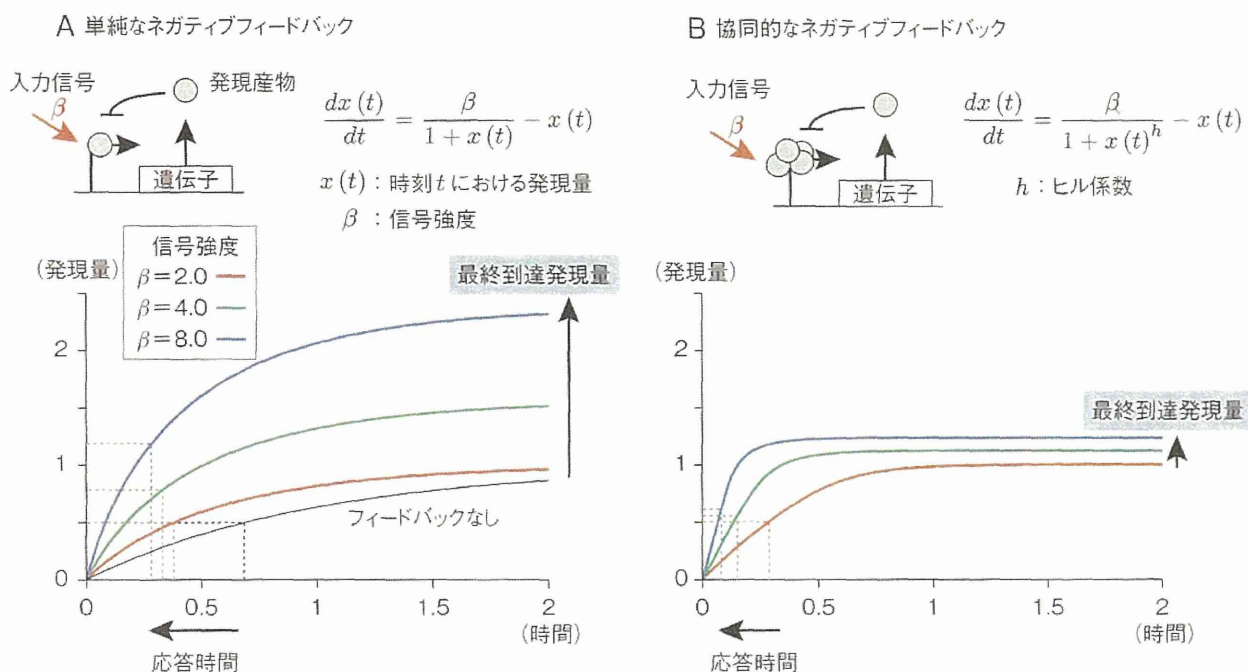
どこの世界にも環境の変化に機敏に反応できる人と、流れに乗り遅れる人がいる。研究では、流行に乗ることが必ずしも正しいとは思えないが、事が生き死にかかわるとなれば、座して動じずというわけにはなかなかいかない。

ウイルスが宿主に感染し増殖す

るときにも迅速な環境応答が要求される。ウイルスは細胞に感染すると、自身のコピーをつくるために、細胞内の環境を急いで改変する必要がある。ヘルペスをひき起こすサイトメガロウイルス (CMV) の場合、そのような改変プログラムの作動は、ゲノム上の「MIEプロモーター」が一手に担っている。

宿主に感染すると、できるだけ早くこのプロモーターを動かし、下流にある一連の遺伝子群を発現する必要がある。

遺伝子発現制御の設計において、ネガティブフィードバックは環境応答のスピードを上げるのに有効である。最終的な発現産物の量が同じ場合、ネガティブフィードバックは、それが無い場合に比べてより早く発現量を増やせる (図3A)。さらに、ネガティブ



● 図3 入力信号強度の変化に対するネガティブフィードバック発現回路の応答
A) 単純なネガティブフィードバックの場合、黒実線はフィードバックがないときの応答、同じ最終到達量となるネガティブフィードバックの場合 (赤実線)、応答時間が短くなる。入力信号強度を上げると、応答時間は短くなるが、最終到達発現量も増える (緑、赤実線)。B) 協同的なネガティブフィードバックの場合、信号強度が上がると、応答時間は短くなるが、最終到達発現量はあまり変化しない。この例ではヒル係数は8とした

