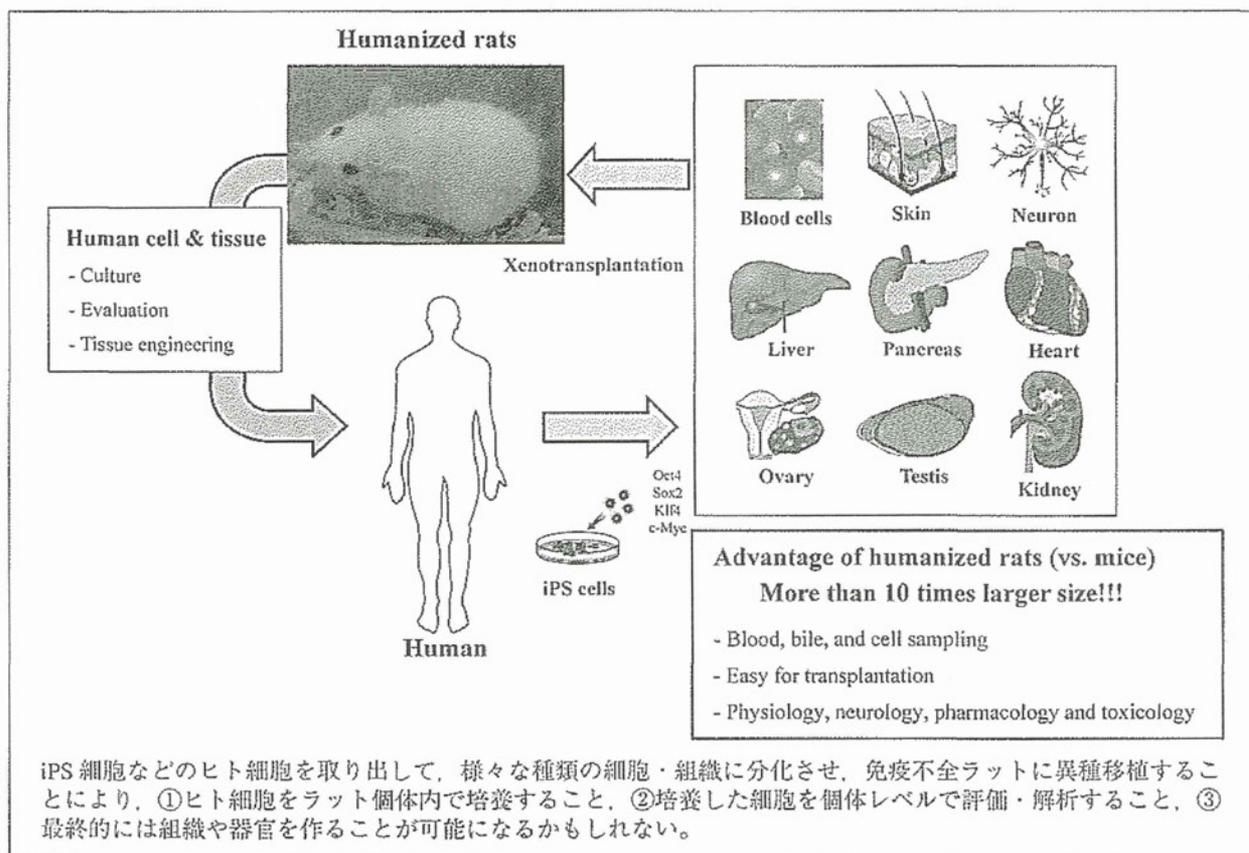


図5 ヒト化ラットの有用性



められるが、SCIDラットは測定したすべての個体あるいは6ヵ月以上がたった個体でも Leaky 現象が認められなかった (図4 B)。さらに SCID マウスと異なる点として、SCIDラットは対照 F344ラットと比べて、体重の減少、線維芽細胞の増殖能力の低下などが発見された。これらマウスとラット間の特性的違いは、*Prkdc* 遺伝子の生物種間における機能の差によるものと考えられる。

Ⅲ. ヒト化ラット

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^{Humanized animal}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。筆者らは、ヒト卵巣がん細胞株の重症複合免疫不全ラットの皮下に移植した結果、SCIDおよびFSGラットのす

べての個体で腫瘍細胞が増殖した。また、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS細胞) を重症免疫不全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4 C)。現在、ヒト肝細胞を移植した肝臓ヒト化ラット、あるいはヒト血液幹細胞を移植した血液ヒト化ラットなどの作製を検討している (図5)。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取ることができる。また、生理学、薬理学、神経行動学、移植研究などに多用されている。ヒト化ラットの作製に成功すれば、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。

おわりに

近年、ZFNと類似の技術として、DNA配列を認識する植物細菌 *Xanthomonas* 由来の transcription activator-like effectors (TALE) とヌクレアーゼ活性

2. ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) による重症免疫不全 (SCID) ラットの作製と創薬応用研究への試み

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¹⁰⁾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。実験用ラットにおいては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。



key words

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*Brc2* 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。

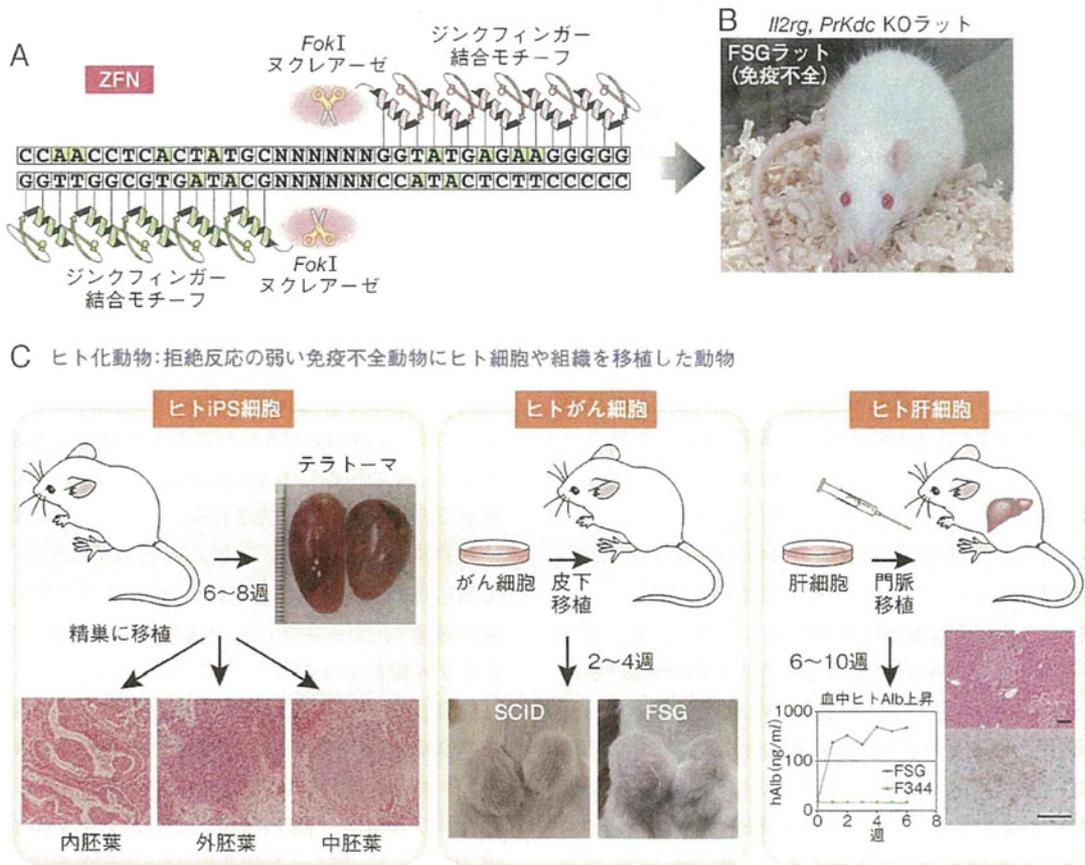
II ZFNによる遺伝子改変

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, 非相同末端結合(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、Fok I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。

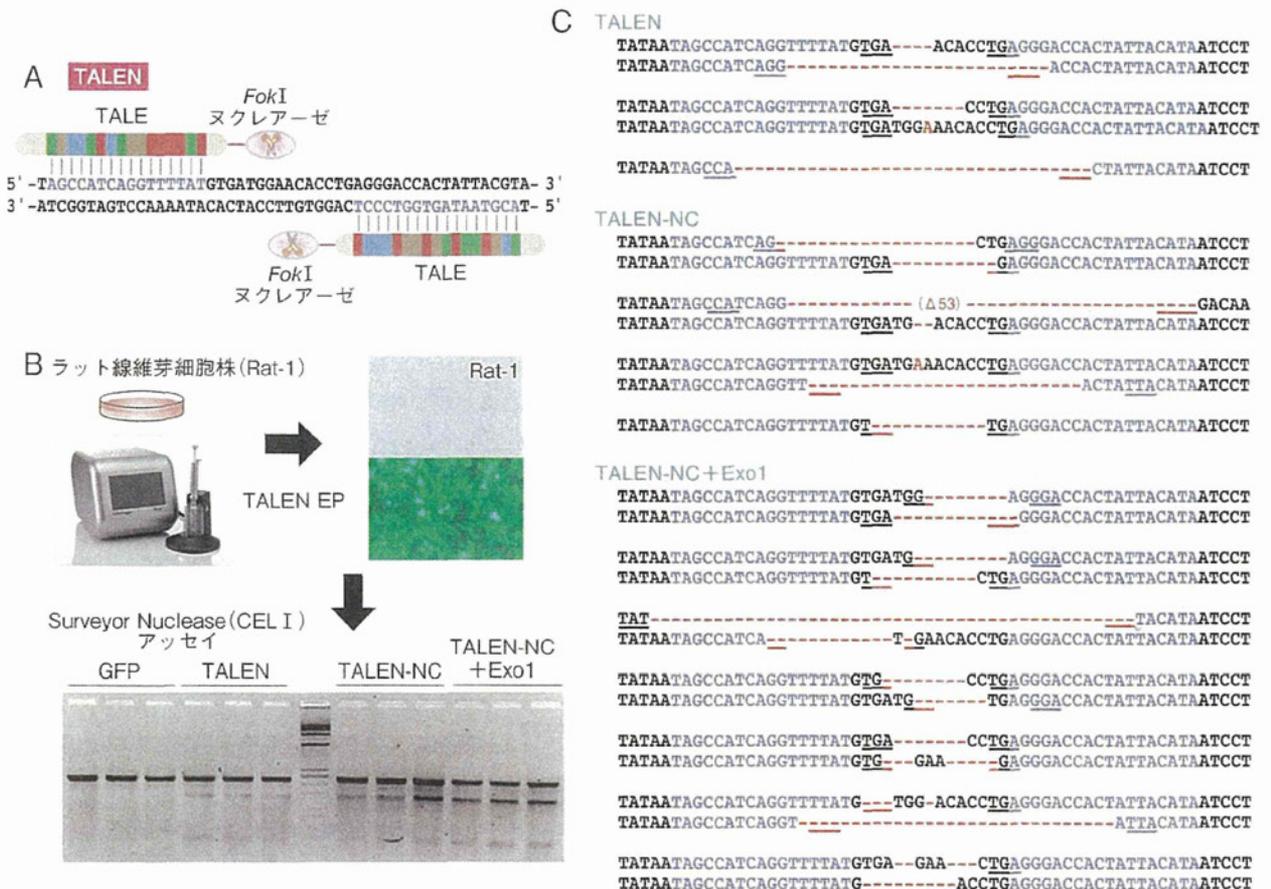
でヒト腫瘍細胞を増殖させることができた。さらに、ヒト肝細胞を移植した肝臓のヒト化ラット作製にも成功している¹²⁾。ラットはマウスに比べて体のサイズが約10倍あることから、血液や胆汁、細胞や組織をたくさん採取することができる。血液細胞などのヒト化ラットに成功すれば、ヒト化マウスに比べて様々なメリットがあると考えられる。SCIDラットはがん研究、幹細胞移植研究、創薬研究などにも広く利用されるモデル動物になるだろう。

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Fok I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.

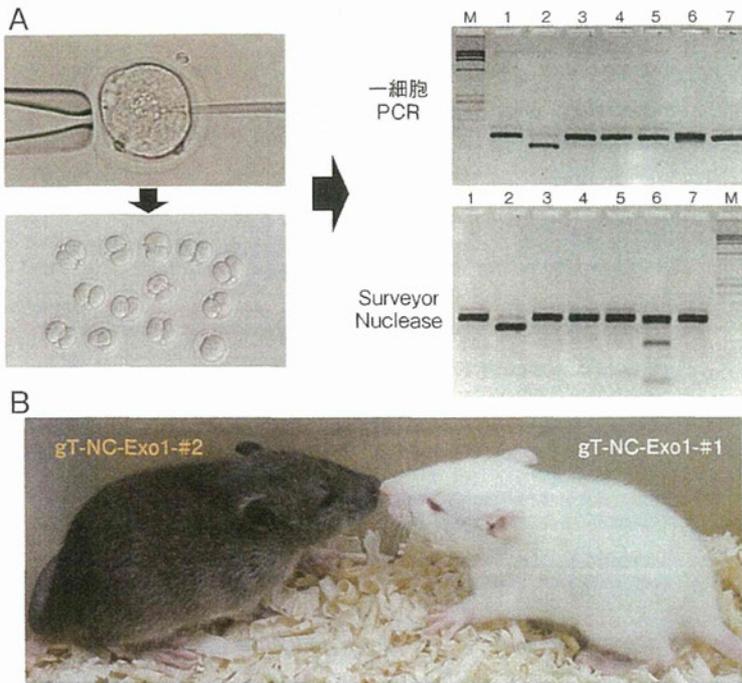
B: 作製した TALEN プラスミドをラット線維芽細胞 (Rat-1) にエレクトロポレーション (EP) 法により導入する. 二本鎖 DNA ミスマッチを切断する CEL I エンドヌクレアーゼを利用した Surveyor Nuclease アッセイにより TALEN による遺伝子変異導入を確認した.

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 プラスミドをエレクトロ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が約 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)。

で非常に簡便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。

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

■ 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。

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。

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。

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

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所博士課程修了(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」

ポ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。こちらにも、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

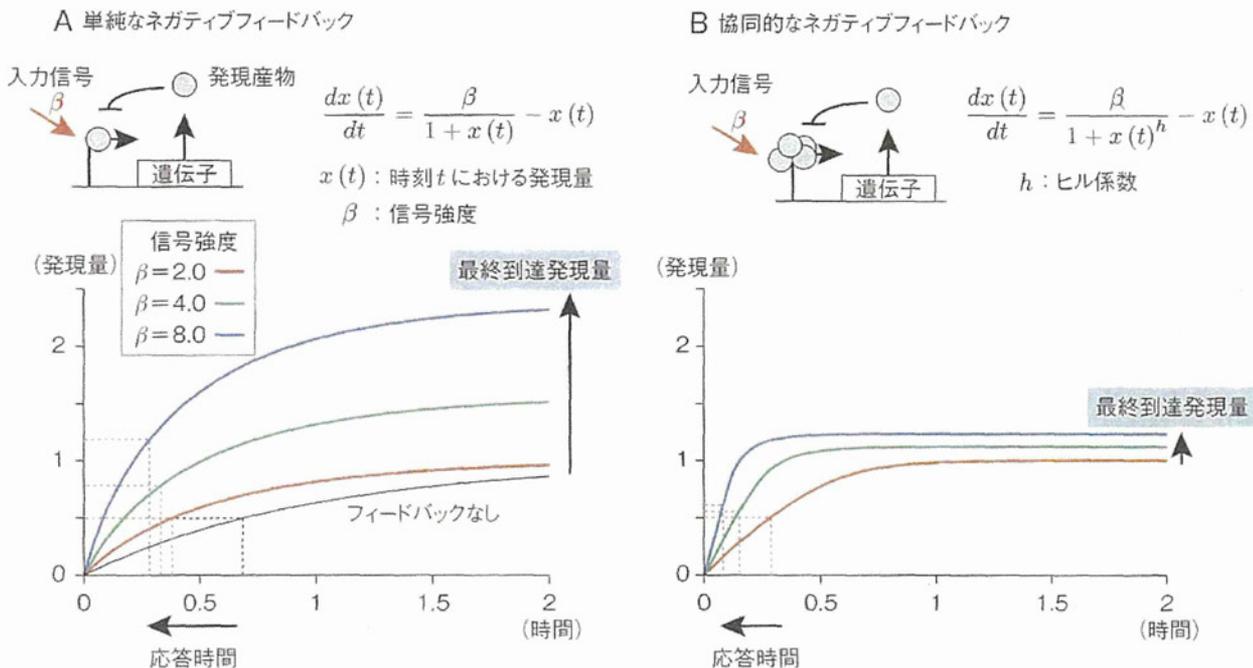
どこの世界にも環境の変化に機敏に反応できる人と、流れに乗り遅れる人がいる。研究では、流行に乗ることが必ずしも正しいとは思えないが、事が生き死にかかわるとなれば、座して動じずというわけにはなかなかいかない。

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

ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)

Genome Editing by Zinc-finger Nucleases

真下知士, 芹川忠夫

Tomoji Mashimo, Tadao Serikawa

近年、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) と呼ばれる人工ヌクレアーゼにより、シロイヌナズナ、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、ラットなどこれまで遺伝子改変技術が利用できなかった動植物において、標的とする遺伝子を改変することが可能となった。マウス/ラットでは、簡便、短期間 (約4~6カ月)、低コストで、あらゆる系統にゲノム編集を行うことができる優れた技術として注目されている。本稿では、① ZFN技術を利用して開発した重症免疫不全 SCIDラットについて、② SCIDラットにヒト細胞・組織などを移植したヒト化ラットについて紹介する。ZFN技術はマウス、ラットだけでなく、ウサギ、ブタ、サルなどの中・大動物におけるゲノム編集、ES/iPS細胞における遺伝子治療、再生医療への応用などにも利用価値が広がっている。



ラット、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、重症免疫不全 SCID、ヒト化動物

はじめに

遺伝子改変動物は、遺伝子の機能を個体レベルで解析するための重要なツールとなる。現在のような遺伝子改変技術が開発される前は、自然発症で見つかった遺伝子変異 (ミュータント) 動物や、放射線、化学変異原などを投与して人為的にミュータント動物を作製し、その動物の特性・病態を解析することで、遺伝子の機能を研究していた (図1)。1980年ごろから遺伝子DNAを直接受精卵に導入することで、遺伝子を過剰に発現させたトランスジェニック動物を作製することが可能となり (第1世代)、1990年ごろからは、ノーベル医学・

(0) 自然発症ミュータント動物

第1世代: 1980年ごろ~

- (1) ランダムミュータジェネシス - ENU, 放射線, トランスポゾン
- (2) 遺伝子導入 (トランスジェニック)

配偶子 (胚・精子) に変異を導入
突然変異, 遺伝子導入

第2世代: 1990年ごろ~

- (3) 胚性幹細胞 (ES細胞), iPS細胞, GS細胞 - 遺伝子破壊 (ノックアウト) - ノックイン, コンディショナル
- (4) 体細胞核移植 (クローン技術), 細胞融合

細胞 (幹細胞, 細胞株) で遺伝子改変した後, 生殖細胞系列に戻す
遺伝子改変が可能

第3世代: 2010年ごろ~

- (5) ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFNs)
- (6) TALEヌクレアーゼ (TALENs)

配偶子で直接遺伝子改変が可能

■ 図1 遺伝子改変動物を作製する技術の目覚ましい進歩

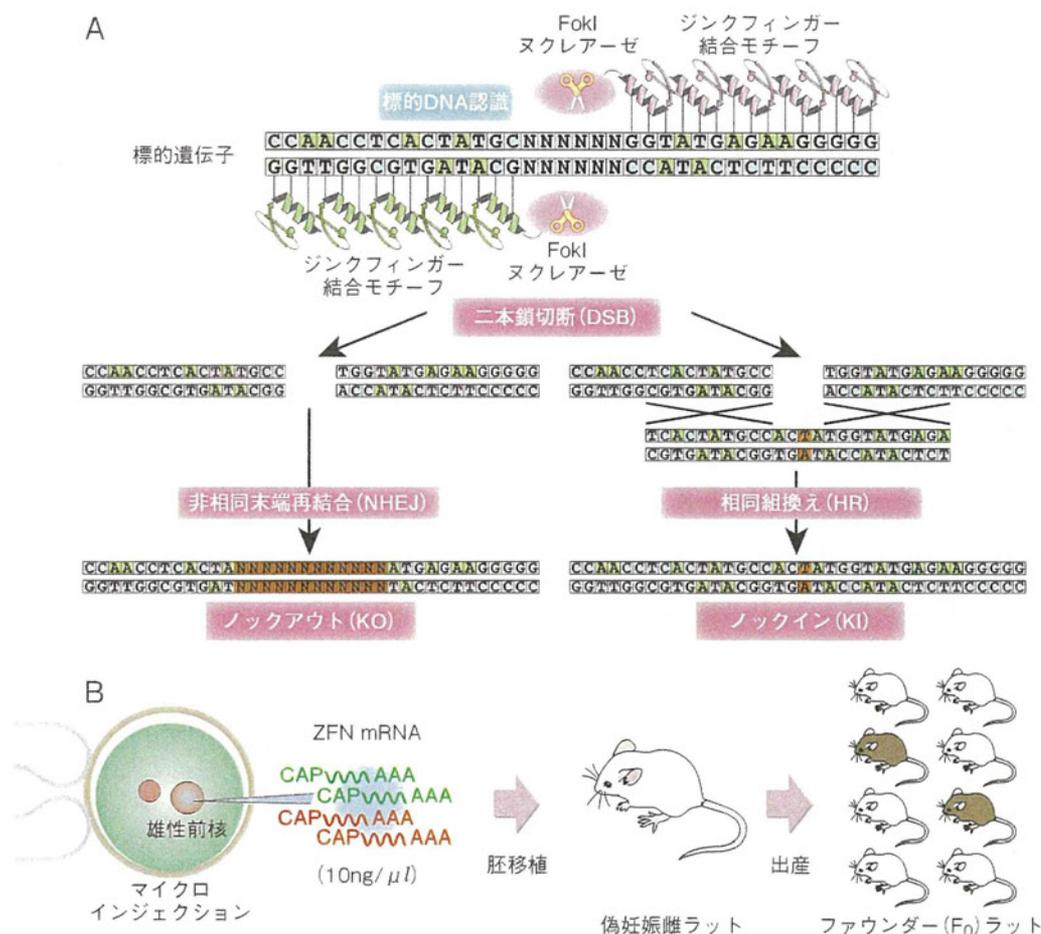
生理学賞を受賞した Mario Capecchi らによって開発された胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES細胞) を用いたノックアウト動物作製法により、次々とノックアウトマウスが作られるようになった (第2世代)。現在では遺伝子を破壊したノックアウトマウスだけではなく、遺伝子を改変したノックインマウスや、時期・組織特異的に遺伝子を破壊したコンディショナルノックアウトマウスが世界中で利用されている。

第1世代のトランスジェニック動物作製技術は、マウス以外の様々な動物に応用されているが、第2世代のES細胞を用いる遺伝子改変技術はマウス以外に利用できなかった。ラットは、自然発症のヒト疾患モデル動物が多数開発されており、薬効薬理試験、安全性試験などにも利用されているが、これまでES細胞がなかったためにノックアウトラットを作製することができなかった。2010年の夏、ノックアウトマウスが開発されてから21年の時を経て、初めてES細胞由来 p53 ノックアウトラットが報告された¹⁾。しかしながら、ラットES細胞の生殖細胞系列への伝達効率率はマウスES細胞に比べると低く、培養条件や相同組換え技術などの改善が必要であると考えられている。

I ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) 法

1. ジンクフィンガーヌクレアーゼとは

ジンクフィンガーヌクレアーゼとは、DNA配列を特異的



■ 図2 ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) による遺伝子改変動物の作製方法

A: ジンクフィンガーヌクレアーゼによる標的遺伝子の認識および二本鎖DNAの切断。切断された二本鎖DNAは、非相同末端再結合 (NHEJ) あるいは相同組換え (HR) により修復される。NHEJの場合には、数bpの遺伝子欠失が起こり (ノックアウト)、HRの場合には遺伝子改変 (ノックイン) が起こる。

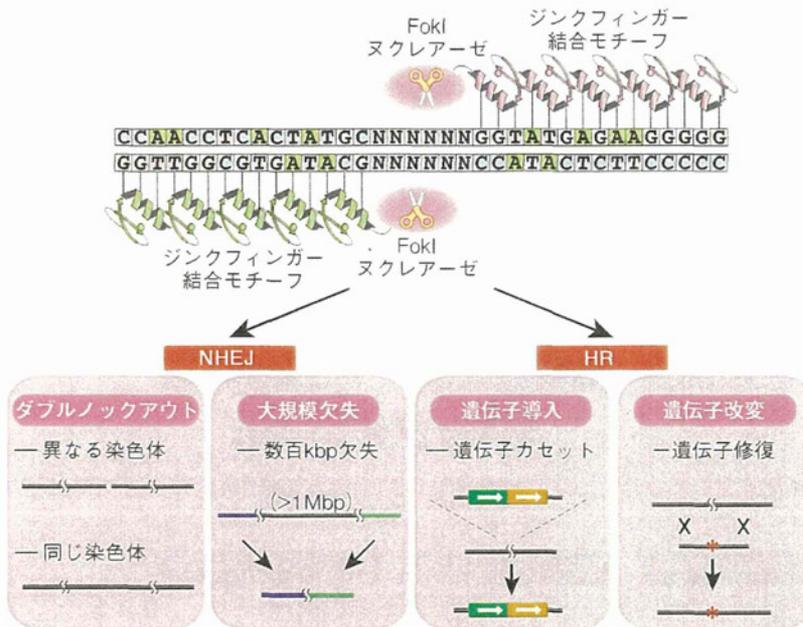
B: ZFNsをマイクロインジェクション法により受精卵に注入することで、遺伝子改変ラットを作製することができる。

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FokI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2A)。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FokIヌクレアーゼが、挟まれた5~6bpのDNA領域に二本鎖切断を導入することができる (図2A)。切断された二本鎖DNAは、通常、非相同末端再結合 (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。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 (図2A)。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ジンクフィンガーヌクレアーゼ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²⁾。

2. ジンクフィンガーヌクレアーゼによる遺伝子改変ラットの作製

近年、このジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) 技術により、ヒト培養細胞、植物、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュなどで相次いで遺伝子改変が報告された³⁾。筆者らは



■図3 ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いたゲノム編集

ZFN技術を利用することにより、①2つの遺伝子を同時に欠損したダブルノックアウト動物、②大規模にゲノム領域を欠損したノックアウト動物、③遺伝子カセットを利用した効率的トランスジェニック動物の作製、④遺伝子改変ノックイン動物の作製を効果的に実施することができる。

このZFN技術を利用して、X連鎖重症複合免疫不全症(X-linked severe combined immunodeficiency: 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*)のノックアウトラット(X-SCIDラット)を作製することに成功した⁴⁾。ZFNsを用いたノックアウトラットの作製方法を図2Bに示す。ZFNs自体は、米国Sigma-Aldrich社などから入手できる。動物の作製方法は、ZFNs mRNAを利用する以外、従来のトランスジェニック動物を作製する方法と同じである。これまでの報告では、ZFNs mRNAを注入して産まれてきたラットの約20~30%の個体に遺伝子変異が導入されている^{4), 5)}。さらに、標的とするDNA配列に対して相同DNAプローブを利用することで、標的とするDNA配列の1塩基を改変することや、GFP遺伝子カセットを特異的に挿入したノックインラットの作製が報告された⁶⁾。

3. ジンクフィンガーヌクレアーゼの利点

ZFN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(図3)。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12~18カ月を要する。しかし、ZFN技術の場合には、

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6カ月で可能である。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⁶⁾。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)でしかできないが、ZFN技術はあらゆる系統について行うことができる。さらに、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。

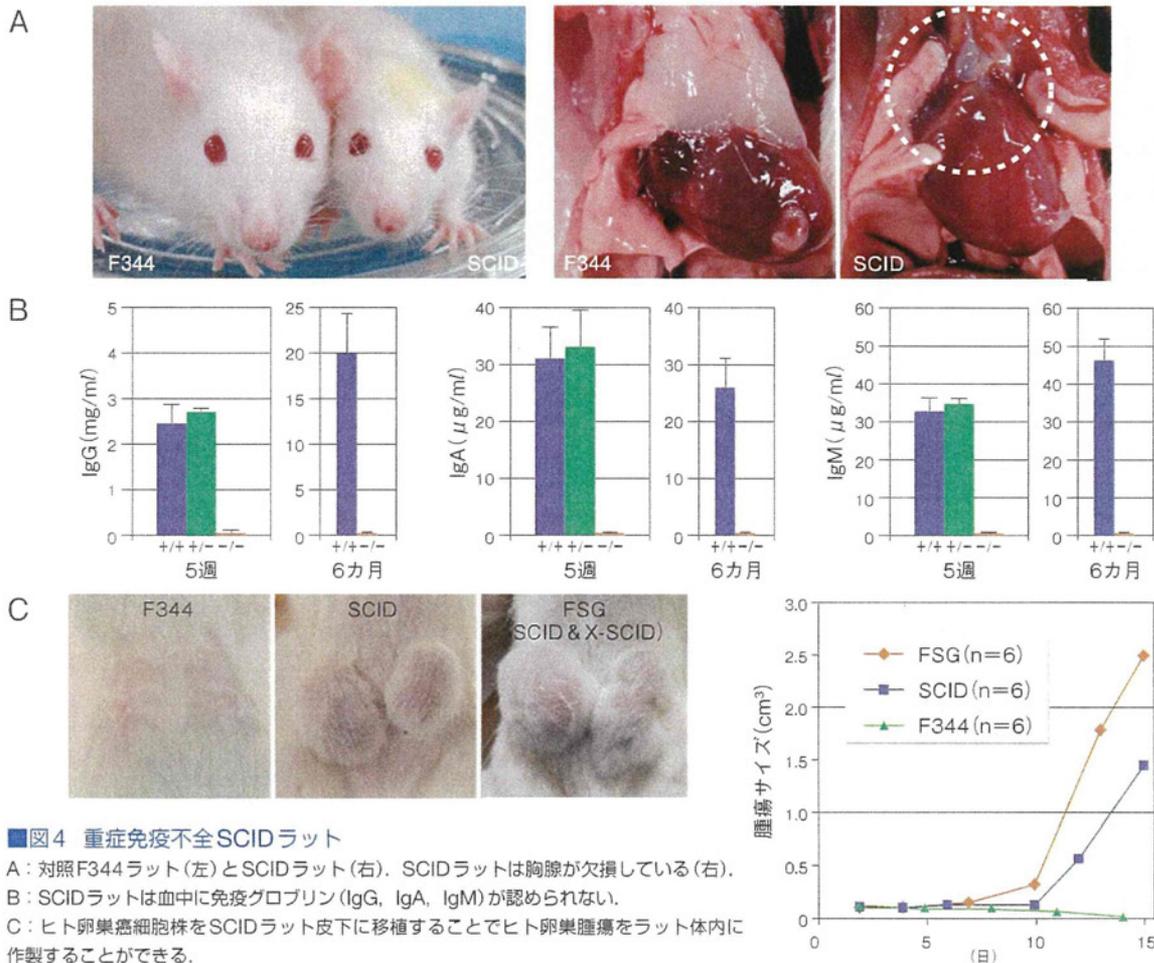
II 重症免疫不全SCIDラット

1. X-SCIDラット

ZFN技術により作製されたX-SCIDラットは、野生型と同様に発育したが、剖検してみると胸腺が著しく萎縮していた⁴⁾。血漿IgGは半減し、血漿IgAはほとんど検出できなかった。フローサイトメトリー解析の結果、X-SCIDラットの末梢血ではT細胞が顕著に減少しており、成熟B細胞およびナチュラルキラー(NK)細胞がほとんど存在しなかった。ヒト卵巣癌細胞株の皮下移植による担癌試験を実施した結果、対照F344ラットではヒト卵巣腫瘍細胞の増殖を抑制したのに対し、X-SCIDラットはすべての個体で腫瘍細胞が増殖した。SCIDマウスは、ヒト細胞や組織の移植研究、移植したヒト細胞に対する薬理試験あるいは毒性試験などに利用されている。X-SCIDラットは、癌研究、幹細胞移植研究、創薬研究などに幅広く利用されるモデル動物になるであろう。

2. SCIDラット

マウスでは*Il2rg*遺伝子をノックアウトしたX-SCIDマウスより、*Prkdc*遺伝子を欠損したSCIDマウスのほうが広く利用されている。さらにはI型糖尿病モデルNOD(non-obese diabetic)マウスに*Prkdc*遺伝子を欠損させたNOD-*scid*や、NOD背景系統に*Prkdc*遺伝子と*Il2rg*遺伝子両方を欠損させることで、T細胞、B細胞、NK細胞すべてを欠失したより重症の免疫不全動物NOG(NOD/SCID/*Il2r* γ ^{null})



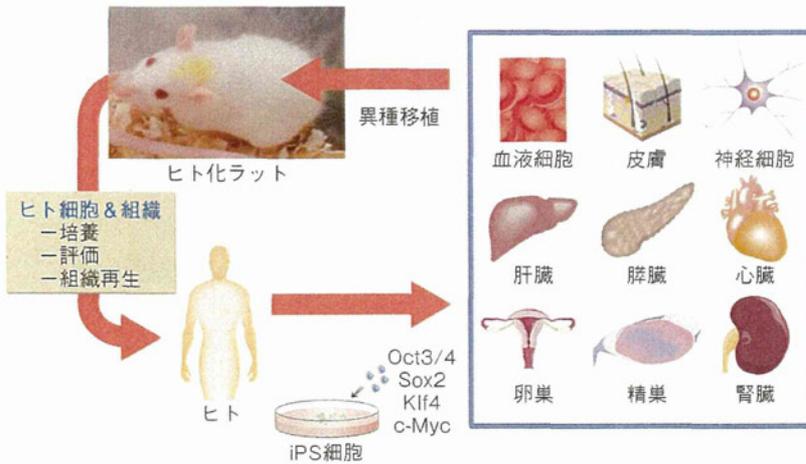
■ 図4 重症免疫不全SCIDラット

A: 対照F344ラット(左)とSCIDラット(右)。SCIDラットは胸腺が欠損している(右)。
 B: SCIDラットは血中に免疫グロブリン(IgG, IgA, IgM)が認められない。
 C: ヒト卵巣癌細胞株をSCIDラット皮下に移植することでヒト卵巣腫瘍をラット体内に作製することができる。

マウスが開発されている⁷⁾。筆者らはZFN技術を使って *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*) ラットを世界で初めて作製することに成功した(図4)(筆者ら、投稿中)。SCIDラットは、マウスと同様に胸腺の委縮、T細胞、B細胞の欠失が認められた。SCIDマウスでは、一部の個体あるいは加齢とともに血中IgGなどの免疫グロブリンが検出される“Leaky”と呼ばれる現象が認められるが、SCIDラットは測定したすべての個体あるいは6カ月以上が経った個体でもLeaky現象が認められなかった(図4B)。さらに、SCIDマウスと異なる点として、SCIDラットは対照F344ラットと比べて、体重の減少、繊維芽細胞の増殖能力の低下などが発見された。これらマウスとラット間の特性の違いは、*Prkdc* 遺伝子の生物種間における機能の差によるものと考えられている。

3. ヒト化ラット

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。筆者らは、ヒト卵巣癌細胞株の重症免疫不全ラットの皮下に移植した結果、SCIDおよびFSGラットのすべての個体で腫瘍細胞が増殖した(図3C)。また、ヒトiPS細胞を重症免疫不全ラットの精巢に移植したところ、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。現在、ヒト肝細胞を移植した肝臓ヒト化ラット、あるいはヒト血液幹細胞を移植した血液ヒト化ラットなどの作製を検討している(図5)。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取



■図5 ヒト化ラットの有用性

iPS細胞などのヒト細胞を取り出して、様々な種類の細胞・組織に分化させ、免疫不全ラットに異種移植することにより、①ヒト細胞をラット個体内で培養すること、②培養した細胞を個体レベルで評価・解析する、③最終的には組織や器官を作ることが可能になるかもしれない。

ることができる。また、生理学、薬理学、神経行動学、移植研究などに多用されている。ヒト化ラットの作製に成功すれば、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。

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るだろう。ZFN/TALENのような人工スクレーパーにより、今後の基礎および臨床研究の発展に大きな期待を寄せている。

おわりに：今後の展望

近年、ZFNと類似の技術として、DNA配列を認識する植物細菌 *Xanthomonas* 由来のTALE (transcription activator-like effectors) とスクレーパーゼ活性ドメイン (FokI) を融合させた新規の人工スクレーパーゼTALEN (transcription activator-like effector nucleases) を使って、線虫⁸⁾、ゼブラフィッシュ⁹⁾、ラット¹⁰⁾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ている。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。

ラットにおいては、ZFN/TALEN技術を利用して、循環器疾患、糖尿病、癌、脳神経疾患などのモデルが多数作製されてきている。また、個体レベルでの遺伝子改変だけでなく、ZFN/TALEN技術を利用してES細胞やiPS細胞での遺

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

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所博士課程修了(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 芹川忠夫

- 京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
- E-mail: serikawa@anim.med.kyoto-u.ac.jp
- 趣味: 釣り, 自転車

1972年大阪府立大学農学部獣医学科卒業、1980年大阪府立大学農学博士(論博)、1973年京都大学助手(医学部(現医学研究科)附属動物実験施設)、1988年同助教授、1993年より同教授、1994年より同施設長併任、2002年よりナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」の課題管理者、1995年より関西実験動物研究会会長、2006~2009年度(社)日本実験動物学会理事長。

文献

- 1) Tong C, et al: Nature (2010) 467: 211-213
- 2) Porteus MH, et al: Nat Biotechnol (2005) 23: 967-973
- 3) Urnov FD, et al: Nat Rev Genet (2010) 11: 636-646
- 4) Mashimo T, et al: PLoS One (2010) 5: e8870
- 5) Geurts AM, et al: Science (2009) 325: 433
- 6) Cui X, et al: Nat Biotechnol (2011) 29: 64-67
- 7) Ito M, et al: Curr Top Microbiol Immunol (2008) 324: 53-76
- 8) Wood AJ, et al: Science (2011) 333: 307
- 9) Sander JD, et al: Nat Biotechnol (2011) 29: 697-698
- 10) Tesson L, et al: Nat Biotechnol (2011) 29: 695-696

ジンクフィンガーヌクレアーゼによる 遺伝子改変ラットの作製

Generation of genetically modified rats by zinc-finger nucleases

真下 知士・芹川 忠夫

Key Words: rat, gene-targeting technology, zinc-finger nucleases (ZFNs), severe combined immunodeficiency (SCID)

■ Abstract ■

近年、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) と呼ばれる人工ヌクレアーゼにより、シロイヌナズナ、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、ラットなどこれまで遺伝子改変技術がなかった動植物において、標的とする遺伝子を改変することが可能となった。ZFNは、マウス/ラットにおいて、簡便、短期間 (約6カ月)、低コストで、あらゆる系統に遺伝子改変を行うことができる優れた技術として注目されている。今後、ウサギ、ブタ、サルなどの遺伝子改変動物や、ES/iPS細胞における遺伝子治療、再生医療への応用も期待されている。

■ ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) とは

ジンクフィンガーヌクレアーゼとは、DNA配列を特異的に認識するジンクフィンガー蛋白と、DNAを切断するFokIヌクレアーゼを人工的に融合した蛋白のことである (図A)。一つの「ジンクフィンガー」ユニットは3-bp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、9~18-bp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配列に5~6-bpを挟んでジンクフィンガーを二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FokIヌクレアーゼが、挟まれた5~6-bpのDNA領域に二本鎖切断を導入する (図B)。切断された二本鎖DNAは、通常、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) 変異がおこる。

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 (図B)。

Tomoji Mashimo and Tadao Serikawa
京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
Institute of Laboratory Animals, Kyoto University
Graduate School of Medicine

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ジンクフィンガーヌクレアーゼ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¹⁾。

■ ZFN技術による遺伝子改変動物の作製法

近年、このジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFNs) 技術により、培養細胞、植物、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュなどで相次いで遺伝子改変が報告された²⁾。ラットは、マウスと並ぶ代表的な実験用哺乳動物だが、ES細胞による遺伝子改変技術がなかったため、例えば、ヒト疾患の原因遺伝子のラット相同遺伝子 (オーソログ) を破壊した遺伝子改変 (疾患モデル) ラットを作製することが困難であった。我々はこの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) のノックアウトラット (X-SCIDラット) を作製することに成功した³⁾。ZFNsを用いたノックアウトラットの作製方法を図Cに示す。ZFNs自体は、米国Sigma-Aldrich社などから入手できる。

動物の作製方法は、ZFNs mRNAを利用する以外は、従来のトランスジェニック動物を作製する方法と同じである。これまでの報告では、ZFNs mRNAを注入して産まれてきたラットの約20~30%の個体に遺伝子変異が導入されている^{3,4)}。さらに、標的とするDNA配列に対して相同DNAプローブを利用することで、標的とする1塩基のDNA配列を改変することや、GFP遺伝子カセットをDNA配列特異的に挿入したノックインラットの作製が報告された⁵⁾。

■ZFN作製された重症免疫不全 X-SCIDラット

我々が作製したX-SCIDラットは、野生型と同様に発育したが、剖検してみると胸腺が著しく萎縮していた³⁾。血漿IgGレベルは半減し、血漿IgAレベルはほとんど検出できなかった。フローサイトメトリー解析の結果、X-SCIDラットの末梢血ではT細胞が顕著に減少しており、成熟B細胞およびNK細胞がほとんど存在しなかった。ヒト卵巣癌細胞株の皮下移植による担がん試験を実施した結果、対照のF344ラットではヒト卵巣腫瘍細胞の増殖を抑制したのに対し、X-SCIDラットは全ての個体で腫瘍細胞が増殖した。SCIDマウスは、ヒト細胞や組織の移植研究、移植したヒト細胞に対する薬理試験あるいは毒性試験などに多用されている。ラットは、体の大きさがマウスの約10倍あり、生理学、薬理学、移植研究などに多用されることから、本研究により作製されたX-SCIDラットは、がん研究、幹細胞移植研究、創薬研究などに幅広く利用されるモデル動物になるであろう。

■今後の展望

最近、ラットES細胞を利用してp53遺伝子を破壊したノックアウトラットが報告された。ZFN技術はES細胞技術に比べて、以下のようなメリットがあげられる。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12~18カ月を要する。しかし、ZFN技術の場合には、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6カ月で可能である。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⁴⁾。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

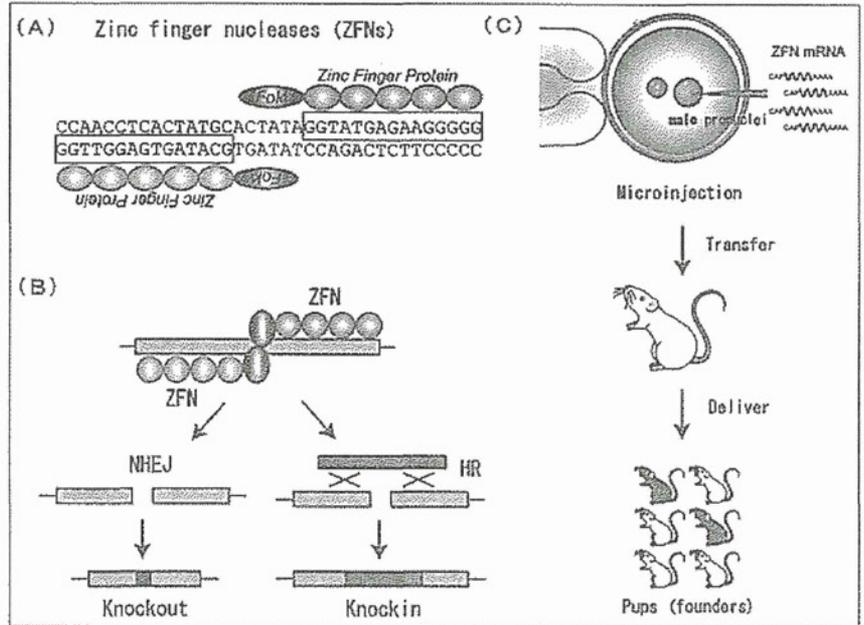


図 ジンクフィンゲーズクレアーゼ (ZFN) による遺伝子改変動物の作製法 (A) ジンクフィンゲーズによる標的遺伝子の認識 (B) ZFNによる二本鎖DNAの切断。非相同末端再結合 (NHEJ) により遺伝子破壊(ノックアウト)が起こる場合と、相同組換え (HR) により遺伝子改変(ノックイン)を起こす場合がある。(C) ZFNをマイクロインジェクション法により受精卵に注入することで、遺伝子改変動物を作製することができる。

C57BL/6系統など) でしかできないが、ZFN技術は、あらゆる系統について行うことができる。

さらに、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、牛、サルなど)にも利用することが可能である。今後、ラットにおいては、ZFN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るであろう。また、個体レベルでの遺伝子改変だけでなく、ZFN技術は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るであろう。ジンクフィンゲーズを用いた今後の基礎および臨床研究の発展に大きな期待を寄せている。

文献

- 1) Porteus MH, Carroll D. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nature Biotechnol.*, 23(8), 967-973 (2005)
- 2) Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.*, 11(9), 636-46 (2010)
- 3) Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, et al. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One.*, 5(1), e8870 (2010)
- 4) Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science.*, 325(5939), 433 (2009)
- 5) Cui X, Ji D, Fisher DA, et al. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnol.*, 29(1), 64-7 (2011)

