

バイオミディア

遺伝子改変マウスとゲノム編集

水野 聖哉

我々ヒトを含む多くの動植物において、遺伝情報（ゲノム）は染色体を構成するDNAの塩基配列でコードされている。ヒトやマウスのゲノムサイズは約30億塩基対であり、2万を超える遺伝子がコードされている。

マウスが保持する2万を超える遺伝子のうち、狙った一つの遺伝子だけを欠損させた遺伝子欠損マウス（Knock-Outマウス：KOマウス）は、特定の遺伝子の機能を、生体内で正確に評価することを可能にするツールであるため、非常に多くの医学・生命科学研究に利用されている。

KOマウスを作製するためには、マウスが保持する約30億塩基対のゲノムDNAのなかの特定の一部分だけを生きた細胞中で変異させる必要があるが、その作製方法は、1980年代に、Evans, Capecchi, Smithiesらにより確立された。彼らは、ES細胞において相同組換えで特定のDNA配列だけを変異させることで、KOマウスが作製できることを示し、以来およそ20年間、この方法によりKOマウスは作製され続けてきた。なお彼らは、この功績により2007年のノーベル医学生理学賞を受賞した。しかし、この方法でKOマウスを作製するためには、長い期間・多額の費用・高い技術力が必要とされるため、新たなKOマウス作製法の開発が求められてきた。

最近、約30億塩基対のゲノムDNAの特定の一部分だけを正確・簡便・迅速に書き換え得る新たな技術『ゲノム編集』が開発され、大きな注目を集めている。『ゲノム編集』とは、目的とするゲノムDNA配列を特異的に切断することができる人工タンパク質（ZFNやTALEN）、もしくはRNA-タンパク質複合体（CRISPR/Cas9システム）を細胞や受精卵に導入することで、狙ったゲノムDNA部位だけに変異を導入する方法である。なお本誌では紙面の都合上、CRISPR/Cas9システムについてのみ紹介する。

CRISPR/Cas9システムは細菌・古細菌の獲得免疫システムであり、2013年にこのシステムがゲノム編集に応用された¹⁾。ゲノム編集で利用される際のCRISPR/Cas9システムは、標的とするDNA配列に結合する役割を持つガイドRNAとガイドRNAが結合した標的DNA

を2重鎖切断する機能を主に持つCas9タンパク質から構成される（図1）。任意のゲノムDNA配列を認識するように構築したガイドRNAとCas9タンパク質をマウスの受精卵にマイクロインジェクション法などにより導入することでKOマウスを作製することができる²⁾。CRISPR/Cas9システムによる変異誘導効率はおよそ10～100%であり、1980年代に確立された従来法の0.001%程度に比べると非常に高い。

CRISPR/Cas9システムにより2重鎖切断されたゲノムDNAは「非相同末端再結合」か「相同組換え修復」のどちらかの経路で修復される。非相同末端再結合（Non-Homologous End Joining: NHEJ）では切断末端に数塩基対の予測不能な欠損・挿入変異が生じることがある（図2左）。これにより目的のゲノムDNA配列が変異する。相同組換え修復（Homology Directed Repair: HDR）では、図2右に示す通り、ドナーDNAとの相同組換えを介した修復により切断箇所外来遺伝子をKnock-Inすることができる³⁾。ドナーDNAは、切断部位両側のゲノム配列と相同なDNAに任意の外来遺伝子が挟まれた構造で、CRISPR/Cas9システムと同時に受精卵や細胞に導入される。

ゲノム編集では、上記の方法を応用することで、従来法で難しかった1塩基置換などのより小さな変異⁴⁾から1,000,000塩基対を超える大きな欠損変異⁵⁾や染色体の転座などを誘発させることも可能である。また、今までES細胞からの個体発生が難しかったラットやサルなどのより高次な動物での遺伝子改変も可能となるなど、本技術のさまざまな分野での応用が期待されている。

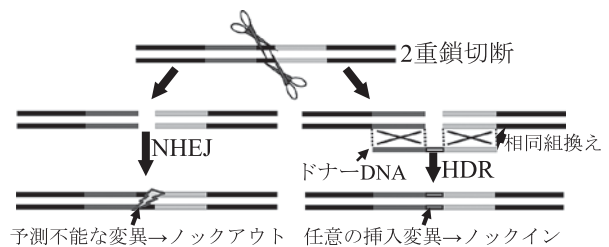


図2. 切断後の修復経路

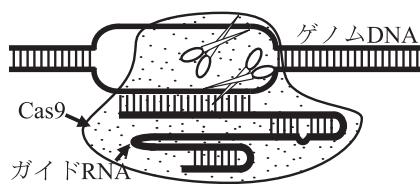


図1. CRISPR/Cas9システム

- 1) Mali, P. *et al.*: *Science*, **339**, 823 (2013).
- 2) Wang, H. *et al.*: *Cell*, **153**, 910 (2013).
- 3) Yang, H. *et al.*: *Cell*, **154**, 1370 (2013).
- 4) Mizuno, S. *et al.*: *Mamm. Genome*, **25**, 327 (2014).
- 5) Mizuno, S. *et al.*: *Sci. Rep.*, **5**, 13632 (2015).