

遺伝子改変ラットの効率的な作製法とその有用性

大阪大学大学院医学系研究科附属共同研 ゲノム編集センター
吉見 一人

実験用ラットの利点と欠点

ラットはマウスと同様に代表的な実験用哺乳動物であり、100年以上前からヒトの疾患解明に向けた基礎研究、治療法・予防法の開発を目指した薬効・安全性評価などに広く利用されてきた。特に、神経学・行動学の分野でも優れたモデルとされ、最近では、マウスでは見られないような互いを助け合う共感性行動をラットは示すことが報告されている¹。また、マウスに比べて体が大きく外科的処置を比較的簡単に行えるため、脳への電極挿入や光遺伝学的手法を用いた局所的な神経細胞の操作²などにも重宝されている。最近では、日本のNBRPラット (<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/NBR/>) や 米国RGD (<http://rgd.mcw.edu/>) を筆頭に、ラットのデータベースも充実している。様々な系統や疾患モデルラットの遺伝学的情報、生理学的情報が整理・公開され、リソースとしても利用できるようになっている。

一方で、遺伝子機能解析モデルとしては、マウスに大きな後れをとっている。マウスでは1970年ご

ろから体外受精・胚操作などの生殖工学技術が確立され、1980年代後半にはES細胞を用いた遺伝子ノックアウトマウスの作製ができるようになった。マウスの全ゲノム配列もいち早く解読されてデータベースが整備され、まさにマウスは遺伝子の生理機能解析における代表的なモデルとして確立されている。一方ラットは、生殖工学技術は発展していたものの、安定したラットES細胞の樹立ができずノックアウトラットの作製が長い間できなかった。2008年によく次世代に伝わるES細胞が樹立され³、2010年にp53遺伝子ノックアウトラットが報告されたが⁴、マウスに比べて実に20年近くの間を要した。しかし、ほぼ同じタイミングでゲノム編集技術が登場したことで技術的なハードルが下がり、ラットのみならず多くのモデル生物で遺伝子操作が実施されつつある。

ラットにおける遺伝子改変の変遷

現在のように遺伝子改変ラットの作製が簡単にできるようになる以前、遺伝子変異ラットの作

出には、トランスジェニック法やミュータジェネシス法が主に用いられていた。トランスジェニック法は、外来遺伝子DNAを受精卵に導入する技術で、外来遺伝子がゲノム上にランダムに挿入され、過剰発現させることができる。一方、ミュータジェネシス法は、Sleeping BeautyなどのトランスポゾンやENUなどの化学変異原を導入することで、ゲノム上にランダムに変異を誘発できる。導入した変異配列のスクリーニングを簡易化・低コスト化することで、狙った遺伝子の変異ラットを選抜することができることが示されてきた⁵。しかし、1万匹規模の大きなリソースやシーケンス解析が必要となるため、やはり個々の研究室レベルで遺伝子変異ラットを作成することは難しい。汎用性の高い遺伝子改変技術の確立は、ラット研究が広がりを持つために必要な課題であった。

こうした状況の中、ゲノム編集技術が登場したことで、ラットのみならずモデル動物を扱う多くの研究に革命がもたらされた。第一世代のゲノム編集ツールである

ZFNやTALENは、特定のDNA配列を認識するDNA結合ドメインと、DNAを切断するFok Iヌクレアーゼとを融合した人工ヌクレアーゼとして開発された⁶。1組の人工ヌクレアーゼを設計して受精卵に注入するだけで、標的配列にDNA二本鎖切断が誘導され、欠失や挿入変異を導入できる。また、相同配列を持つドナーDNAを同時に導入することで、標的部位をドナーDNA配列に改変するノックインもできる。この方法を用いることで、ES細胞を用いずに標的遺伝子を改変できるようになった。実際にラットにおいても2009年、ZFNによるノックアウトが⁷、2010年にはTALENによるノックアウトラットが初めて報告され⁸、現在でも多くの遺伝子改変ラットが作製、報告されている。

CRISPR/Cas9を用いた遺伝子改変ラットの作製

様々な生物種に対してZFNやTALENが応用されつつある中、新たなゲノム編集ツールCRISPR/

Cas9が登場したことで、マウスや細胞株でも爆発的に利用されるようになった。CRISPR/Cas9は、gRNAがゲノム上のPAM配列の上流20塩基を認識して結合することで、Cas9ヌクレアーゼが二本鎖切断を導入する。その結果、ZFNやTALENと同様にノックアウト、ノックインを行うことができる。加えてZFNやTALENに比べて複雑なベクター構築が不要で調製が格段に簡単になり、多くの研究者の間に広まっている。CRISPR/Cas9が登場した当初は、gRNAの配列によっては全く変異が生じない場合があった。そのため、複数のgRNAを設計して細胞レベルで二本鎖切断導入効率を確認し、もっとも効率の良いgRNAを選抜する必要があった。しかしCas9への核移行シグナルの付加、アミノ酸配列の最適化などがなされ、改良型Cas9が作成され、条件検討にかかる時間は減っている。現在では多くの企業からこうした切断効率の良いCas9発現プラスミドやCas9タンパク質、またgRNAが販売さ

れ、まさにReady-to-useの形で購入・利用することができる(表1)。

CRISPR/Cas9コンポーネントの受精卵への導入法は、従来のトランスジェニック動物作製と同様に、顕微鏡下でガラス針から注入するマイクロインジェクション法が主流である。この方法は確実に受精卵内へ導入することができる一方で、熟練した技術と高価な設備が必要なため、使用できる研究室は限られている。最近、エレクトロポレーション法を用いた導入法が開発され、こうした問題は解消されつつある。受精卵に電気パルスを与えることで微細な穴をあけることで、一度に約100個程度の受精卵にDNAやRNAを導入できる(表1)。実際にラット受精卵においても効率的に遺伝子改変ラットが作製されている⁹。

一本鎖オリゴDNAを用いたノックイン

現在ではもっぱら標的部位を特定配列に改変するノックインがいかに効率よくできるか、という点が焦点になっている。ノックインができれば、外来遺伝子の安定的導入に加え、内在性遺伝子の詳細な機能解析、特に発現部位や発現時期の操作、ライブイメージング等が可能になり、研究におけるモデル動物の有用性が非常に高まる。ノックイン動物の作製は、Cas9 mRNA および gRNA に加えて、相同配列を持つドナーDNAを受精卵に同時に導入する必要がある。

表1 CRISPR/Cas9の受精卵への導入方法とその特徴

条件	利点	欠点
Cas9の導入形態	プラスミド	大量調製が簡単 繰り返し利用可能
	mRNA	一過性発現 毒性が低い
	タンパク質	一過性発現 購入できる
受精卵への導入法	マイクロインジェクション	確実に注入できる 一定量を導入できる
	エレクトロポレーション	取り扱い・手技が簡単 作業が早い
ノックイン用ドナーDNA	一本鎖オリゴ	調製が簡単 高効率
	プラスミド	長いサイズの変更 (1kb<)

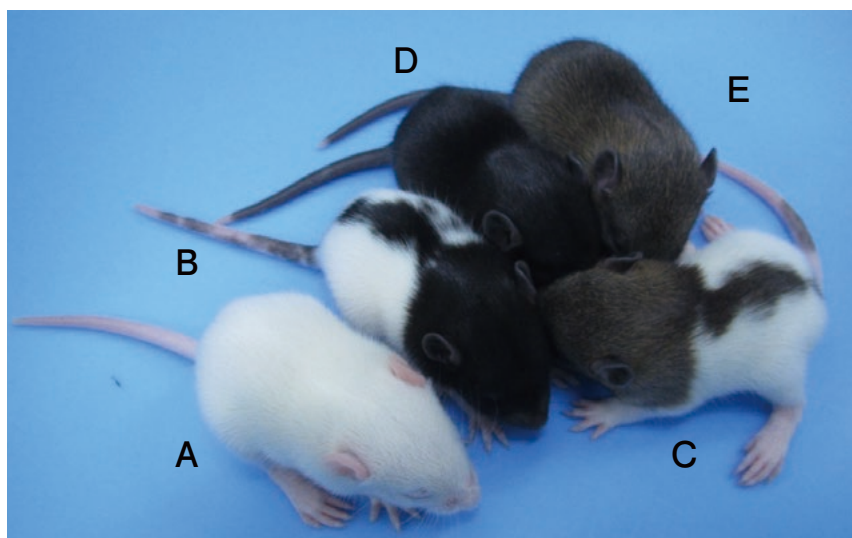


図1 CRISPR/Cas9と一本鎖オリゴDNAを用いて作製したノックインラット
A) アルビノラット、B) 1塩基置換により黒色に修復されたラット、C) 19塩基挿入によりアグーチ色に修復されたラット、D) レトロトランスポゾン除去により頭巾斑が修復したラット、E) ノンアグーチ、頭巾斑がともに修復したラット。

このドナー DNAには通常、プラスミドDNAと一本鎖オリゴヌクレオチド(ssODN)が用いられている。

我々も毛色関連遺伝子を対象に、ssODNを用いて様々なパターンのノックインラットの作製を行い、ノックイン技術の効率化・有用性を示してきた。例えば、アルビノのF344ラットが有している *Tyr* 遺伝子の一塩基変異に対し、野生型SNPを含むssODNを共導入することで、一塩基置換により黒色の毛色を示すノックインラットを作製した。また、ノンアグーチ色の原因である *Asip* 遺伝子の19塩基欠損変異、頭巾斑の原因である *Kit* 遺伝子のレトロトランスポゾン挿入変異についても、野生型配列のssODNを設計・導入した。その結果、19塩基挿入およびレトロトランスポゾンが除去されて表現型が修復されたノックインラットの作製も成功

した(図1)¹⁰。

ssODNは、設計から入手までが簡単で、ノックイン効率も約1-3割と高いことから、一塩基置換などの短い配列の挿入・置換に適している。しかし、現在のオリゴDNAの合成長は最大200塩基までであり、長鎖の一本鎖DNAを入手することが難しい。そこで、Nickaseを用いた手法により、長鎖一本鎖DNA (long single strand DNA: lssDNA) を合成し、ノックインラットの作製に応用した。その結果、*Thy1* 遺伝子下流に約1kbの2A-GFP配列を導入することに成功した¹¹。この他同じ手法により、Flox配列の導入、リピーター配列置換など、様々なパターンの遺伝子改変にも成功している(未発表)。今後、合成できる一本鎖DNA長は伸びることが予想され、数kb程度の遺伝子改変、特に内在遺伝子のタグ化、コンディショナルKOの作

製に広く用いられることが期待される。

プラスミドDNAを用いたノックイン

動物モデルを用いる際、生物種差が問題になることがしばしばある。例えば、ヒトの相同遺伝子を破壊したとしても、ヒトと同様の表現型がでない時がある。これは、動物とヒトとの間で、発現部位や発現量、スプライシングバリエーションなどが異なることが原因と考えられる。すなわち、動物の相同遺伝子の破壊と同時にヒト由来遺伝子を導入ができれば、ヒト体内での発現や機能を模倣した有用なモデル動物になりうる。特に、BACなどを用いてヒト特異的プロモーター下でイントロン領域を含む完全長のヒト由来遺伝子を導入できるようになれば、生物種差の問題点を改善することができる。

長い配列を標的部位に導入したい場合は、ssODNではなくプラスミドやBACなどの二本鎖DNAを使用する必要がある。これまで、プラスミドをドナーとして相同組み換え修復を利用して遺伝子を改変したノックインマウス、ノックインラットの作製は報告されている¹²⁻¹⁴。一方で我々は、異なる修復過程を利用した新しいプラスミドノックインラット作製法、2ヒット2オリゴ法(2H2OP法)を開発した¹¹。この2H2OP法では、2種類のgRNA、2種類のssODN、プラスミドDNAをまとめて受精卵に導入する。その際、CRISPR/Cas9が

「はさみ」としてゲノム上とプラスミド上の標的配列を切断し、二本のssODNが「のり」としてゲノムとプラスミドを上流と下流をそれぞれ結合修復することで、プラスミドDNAを特定のゲノム上に正確にノックインすることが可能となる(図2)。実際に2H2OP法を用いて、CAG-GFPプラスミドのノックイン、BACプラスミドを用いたノックインにも成功している。加えて、標的部位を増やすことでゲノム領域の大規模欠失とプラスミド導入を同時に行うこともできるなど、応用性が高い。ゲノムとプラスミドの結合部位に変異が入りやすいといった改善部分はあるが、こうした正確性や効率性を改良することで、汎用性の高いノックイン作製法になると考えている。

ヒト疾患モデルとしての遺伝子変異ラットの有用性

現在のところ、やはりマウスが遺伝子機能解析モデルのファーストチョイスであることに変わりはない。しかし前述したとおり、マウスでは表現型が出ないことや、ヒトと大きく異なる表現型を示すことが少なからずある。そのため、複数の生物種を用いて遺伝子機能を解析することは、その遺伝子の普遍的機能や種特異的機能を明らかにするうえで重要である。最近の遺伝子改変研究から、ラットがマウスよりも人に近い表現型を示す例が報告され、ヒト疾患モデルとしての遺伝子改変ラットの有用性

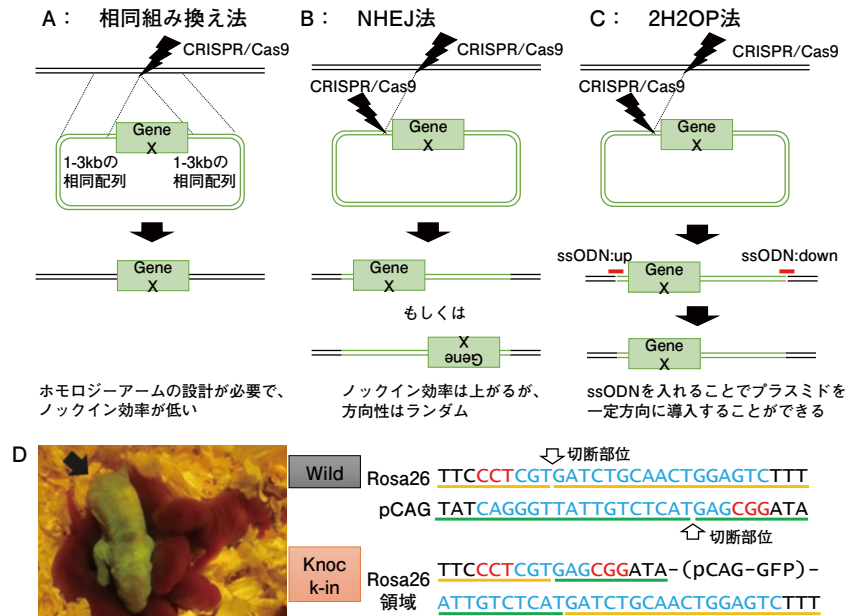


図2 新たに開発したノックイン法2H2OP法の概略と従来法との比較
A-C) 従来法の相同組み換えや非同源性末端結合修復(NHEJ)を利用した方法に比べ、2H2OP法はプラスミド改変の必要がなく、方向性も規定できる。D) 2H2OP法で作製したCAG-GFPノックインラット(矢印)およびそのシーケンス結果。Rosa26領域にpCAG-GFPが挿入されている。

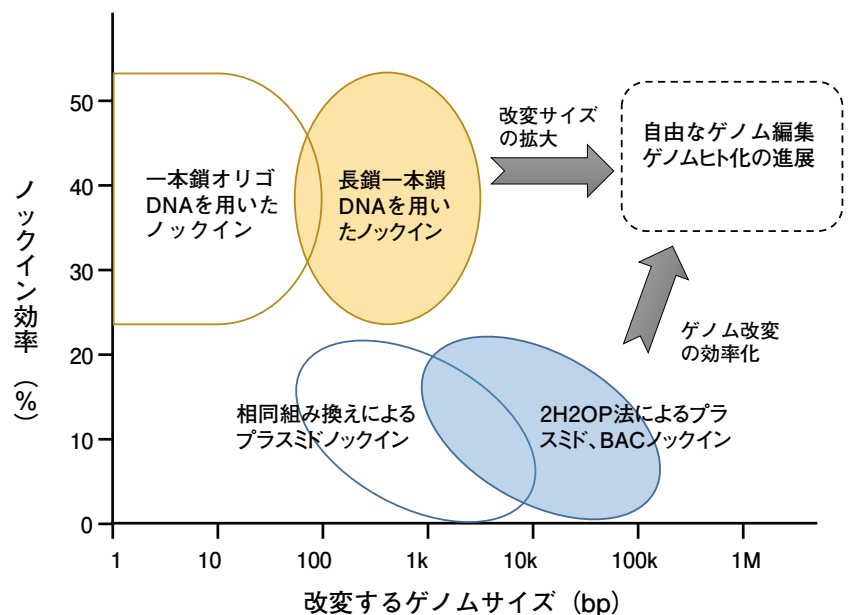


図3 開発した新規ノックイン法(issDNA法、2H2OP法)の位置づけ概念図
長鎖一本鎖DNAを用いることで効率を保ったまま長い配列のノックインが可能に、また2H2OP法を用いることで最大200kbと大きなサイズのノックインが可能になった。今後、より大きいサイズを改変する、またその効率を上げる技術や手法が開発されることで、自由自在なゲノム編集やゲノムヒト化に近づくと考えられる。

が示されつつある。

例えば、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子である*Apc*遺伝子のKOマウスは、腸管内に多数の腫瘍を

形成することから、ヒト大腸がんモデルとして利用されてきた。しかし、腫瘍の主な形成場所は大腸ではなく小腸であり、経時観察も

難しかった。一方で*Apc* 遺伝子 KO ラットはヒトと同様に大腸にも腫瘍を自然発症することが明らかになった¹⁵。そのため内視鏡を用いることで特定の腫瘍について経時観察や外科的処置を行うことが可能で、有用なヒト大腸がんモデルとして利用されている¹⁶。

また、*Prkdc* 遺伝子 KO マウスは T、B 細胞を欠失することで免疫不全を示すことが知られている。一方で、ホモ欠失でも正常に生存し、ヒトで見られる胎性致死や細胞増殖能の低下は見られない。しかし *Prkdc* 遺伝子のホモ KO ラットは、免疫不全に加えて大幅な体重減少や細胞増殖能の低下がみられ、ヒトの表現型に似ていることが明らかになった¹⁷。

脂肪萎縮に関連する *Bscl2* 遺伝子は、マウスでは脂肪組織と精巣で強く発現している一方で、ラットではヒトと同様に脳でも強く発現していることが明らかになった。実際に KO ラットを作製して解析した結果、空間作業記憶の低下などの神経系異常がみられるなど、マウスでは見られない表現型が報告されている¹⁸。

このように利用するモデル動物によって、発現部位、発現量に大きな差があり、得られる表現型は大きく異なる。マウス以外の動物における遺伝子改変のハードルが下がったことで、実際に遺伝子改変モデルづくりを行う前に、生物種差の影響を考え、どのモデル動物が本当に適切かを検討することが

重要になるだろう。

終わりに

ここでは、ラットにおける遺伝子改変の現状と遺伝子改変ラットの有用性について紹介した。特にノックイン技術の進展は多くの研究者の課題であり、今回は我々の開発した lssDNA 法、2H2OP 法を紹介したが、様々な手法により改変できるゲノムサイズの拡大や、ノックインの効率化が行われている(図3)。また、受精卵だけでなく、生体内でゲノム編集を行う手法なども開発されており、ゲノム編集を用いた遺伝子改変動物の作製技術は確実かつ急速に進歩している。今後は特に、ヒト疾患で同定された SNP 変異を導入する、動物のゲノム領域をヒト由来ゲノム配列に大規模に置き換える、ゲノムヒト化動物の開発が進展していくと予想される。私自身もこうしたゲノムヒト化技術を用いてヒトの進化過程を明らかにしたいと考えている。今後、ラットに限らず多くの新しいヒト疾患モデル動物、ゲノムヒト化動物が作出され、遺伝子の新たな生体機能の発見や、医学創薬研究、再生医療研究の発展に貢献することが期待される。

参考文献

- 1) Ben-Ami Bartal I *et al.*, Empathy and pro-social behavior in rats. *Science*. 334. 1427-1430 (2011).
- 2) Diester I *et al.*, An optogenetic toolbox designed for primates. *Nat Neurosci*. 14. 387-397 (2011).
- 3) Li P *et al.*, Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell*. 135. 1299-1310 (2008).

- 4) Tong C *et al.*, Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*. 467. 211-213 (2010).
- 5) Mashimo T *et al.*, An ENU-induced mutant archive for gene targeting in rats. *Nat Genet*. 40. 514-515 (2008).
- 6) 真下 知士, 山本 卓(編), All About ゲノム編集—実験医学増刊号、羊土社、Vol.34 No.20 (2016).
- 7) Geurts AM *et al.*, Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*. 325. 433 (2009).
- 8) Tesson L *et al.*, Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol*. 29. 695-696 (2011).
- 9) Kaneko T *et al.*, Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Sci Rep*. 4. 6382 (2014).
- 10) Yoshimi K *et al.*, Allele-specific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR-Cas platform. *Nat Commun*. 5. 4240 (2014).
- 11) Yoshimi K *et al.*, ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat Commun*. 7. 10431 (2016).
- 12) Wang H *et al.*, One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 153. 910-918 (2013).
- 13) Wu Y *et al.*, Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*. 13. 659-662 (2013).
- 14) Yang H *et al.*, One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 154. 1370-1379 (2013).
- 15) Amos-Landgraf JM *et al.*, A target-selected *Apc*-mutant rat kindred enhances the modeling of familial human colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104. 4036-4041 (2007).
- 16) Irving AA *et al.*, The utility of *Apc*-mutant rats in modeling human colon cancer. *Dis Model Mech*. 7. 1215-1225 (2014).
- 17) Mashimo T. *et al.*, Generation and characterization of severe combined immunodeficiency rats. *Cell Rep*. 2. 685-694 (2012).
- 18) Ebihara C *et al.*, Seipin is necessary for normal brain development and spermatogenesis in addition to adipogenesis. *Hum Mol Genet*. 24. 4238-4249 (2015).

(日動協ホームページ、LABIO 21 カラーの資料の欄を参照)