



## 特殊な動物でのゲノム編集

宮崎大学 テニユアトラック推進機構

本多 新

### はじめに

生命にとって大切な構成要素のひとつである遺伝子は、生命活動を規定する最も重要な因子としてこれまで様々な手法で解析されてきた。簡単に言えば、遺伝子をなくしてしまったり（ノックアウト）、遺伝子を置換してしまったり（ノックイン）、遺伝子の働きを弱めたり（ノックダウン）して成し遂げられてきた。哺乳動物においては、マウス胚性幹（Embryonic Stem：ES）細胞を利用した、相同遺伝子組換えとキメラマウス作製を経由することで成し遂げられ、ヒトを含む多くの哺乳動物種における遺伝子機能の推測や、ヒト疾患モデルマウスの作製に貢献してきた。しかしながら、マウスのようにキメラ動物の作製が可能なES細胞が生じる動物はラットのみであり（それでも特殊な培養条件と卓越した培養技術が必須ではあるが）、それ以外の動植物における遺伝子破壊は「極めて困難」とされていた。このような背景の中で、近年 Zinc Finger Nuclease（ZFN）、Transcription Activator-Like

Effector Nuclease（TALEN）、および Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat（CRISPR）and CRISPR-associated（Cas）システムといった方法が開発され、マウス以外の動植物種でも遺伝子の改変（ゲノム編集）が可能になった。

本稿では最も扱いやすいとされているCRISPR/Casシステムに焦点を絞って解説する。これは言わば、『標的ゲノム配列に結合する“目印”とその部分を切断する“はさみ”』で成り立っており、目印とはさみをコードする核酸を受精卵に注入するだけで、目的の遺伝子が改変された次世代を得ることを可能にする技術である。最近では遺伝子破壊以外にも、標的配列の入れ替え、遺伝子発現の促進・抑制、配列の精製、発現状態の可視化などにも用いられるようになっている。本稿では、はじめてゲノム編集に触れる方々が、“ほとんどゲノム編集の成果が報告されていないような”動物で、遺伝子の破壊を行うために、どのような注意点があるのかを理解し、どのような準備をし、そしてどのような手順で研究を進めるのが良いの

かについて解説する。

### 遺伝子を編集したい動物種について（実際にゲノム編集実験を行う前に）

現在、哺乳動物だけでなく、微生物、植物、昆虫、は虫類などでもCRISPR/Casシステムによる遺伝子破壊報告がある<sup>(1)</sup>。読者が遺伝子を編集したい動物で、すでにゲノム編集の報告例が複数あれば、そのハードルはさほど高くない。できる限り忠実にその報告を再現するだけであらう。本稿ではそのような報告もない動物、あるいはほとんど再現されていないような動物種でCRISPR/Cas9によるゲノム編集を行う場合について解説する。その際、まず二つの項目について確認しなければならない。上述したように、目印とはさみをコードする核酸を受精卵に導入することが必要不可欠であることから、「その動物から卵子（特に受精卵）を採取できるか」そして、「その動物の受精卵を移植して産仔を得ることができるか」を確認する必要がある。この二つが可能であれば、理論的には目的の動物で遺伝子を破壊することが十分に可能であると言える。もしもこのいずれかでも「困難」である場合、ゲノム編集のハードルは高くなる。

#### 受精卵の採取と予備実験

受精卵を得る場合、最も容易なのが体外受精であるが、高効率で体外受精が行える動物は少ないため現実的ではない。そこで、自然交配や人工授精、あるいは顕微受精により受精卵を得る必要がある。もしも可能であ

れば、過排卵処理も施したい。一般的な過排卵誘起ホルモンの投与だけでなく、抗インヒビン抗体法の開発などにより、様々な動物種での過排卵誘起が現実味を帯びている<sup>(2,4)</sup>。次に、受精卵や核酸の注入胚を培養する環境を構築する必要がある。受精卵を採取後に体外培養環境に移し、2細胞期胚まで発生が進むか否かを確認しなければならない。もしも2細胞期胚まで進まない、あるいは2細胞期胚以降への発生が進まない（いわゆる2-cell blockが起こる）ような場合は、受精卵へのゲノム編集核酸注入後、できるだけ早くホスト動物の卵管に移植する必要がある。体外もしくは体内で注入胚を発生させることができる場合、着床前胚を回収してゲノム編集効率を確かめることが、高効率なゲノム編集個体を得る上で有効である。つまり予備実験として、胚盤胞などからのゲノム調製や、胚のゲノムDNAを鋳型としたPolymerase Chain Reaction (PCR) などの実験系を立ち上げていくことが近道となる。実際に、実験動物中央研究所の佐々木えりか先生の研究チームは、霊長類のマーモセットでのゲノム編集を成功させているが、その際にまず、着床前胚を用いてゲノム編集効率を高める試行錯誤を詳細に行ったうえで、ゲノム編集胚の移植・個体作出に進んでいる<sup>(5)</sup>。もちろん霊長類は実験動物倫理上、および維持経費上、安易に移植実験を行うことができない動物であるのは確かだが、どのような動物種にとっても非常に参考になる理想的な進め方であろう。

#### 胚移植

受精卵の採取と同様に、ゲノム編集個体を得る上で避けて通ることのできないのが胚移植である。ゲノム編集核酸を注入した胚は、偽妊娠状態にしたメス（レシピエント）の卵管や子宮に移植しなければならない。そのため、レシピエントとする動物の性周期を理解する必要がある。マウスやラットのように性周期が一定の間隔で回っている動物であれば、膣のスメアを確認して性周期を確認しながら最適なタイミングを計り、精管結紮を施したオスと同居させる方法が用いられる。場合によっては（霊長類のように）血中のホルモン濃度から性周期を確認する方法が有効である。また、ウサギのように交尾刺激によって排卵が誘起される動物の場合は、人為的に膣を刺激することで容易にレシピエントを準備することができる<sup>(6)</sup>。このように、ゲノム編集個体を得るためには、受精卵の採取、胚の培養、胚移植の全てをクリアすることが求められるが、研究者人口の少ない動物種の場合、このうちのいずれかあるいは複数が困難である場合が想定される。そのような場合には、卵管の外から電氣的に受精卵に核酸を導入するGONAD法を試してみることが推奨する<sup>(7)</sup>。卵管の外から顕微鏡下で受精卵の位置を確認し、ゲノム編集核酸を卵管内（受精卵の近傍）に注入した後に、卵管の外側から電気刺激を施して卵管内に注入した核酸を受精卵に導入すれば、受精卵への顕微操作、胚の培養、および胚移植をバイパスすることが可能とな

# ①破壊したい遺伝子の破壊したい部分付近でG(N18~25)GGを探す

```

10      20      30      40      50      60
ggagaggtgaaaccgtccctaggtgagccgtctttccaccaggccccggctcgggggtgc
70      80      90      100     110     120
ccaccttccccatggctggacacctggttcagacttcgctttctcaccaccaggtg
      M A G H L A S D F A F S P P P G G
  
```

上の遺伝子であれば、第一メチオニンの後ろにあるtgg(PAM配列)の5'上流20塩基(下線太字)がターゲット配列となる。  
(▼はCas9による切断予定部位)

②5'-G(N18~25)GG-3'について、5'-GはA or C or Tでもかまわないが、その場合はGに置換した方が転写効率が良い。

図1: 標的配列の具体的な選び方。まず5'-GG-3'を探し、5'上流の方向に20b前後のGを探す。もしも良いところにGがなくても、転写開始点としてGに置換すれば良い。  
(日動協ホームページ、LABIO 21 カラーの資料の欄を参照)

る。予備実験には緑色蛍光タンパク質のmRNAなどを用いて、緑色に光る胚を最も多く得る条件を確定させるのが良いだろう。

## 破壊する遺伝子配列の探索

「受精卵を採取できること」および「その受精卵を移植すれば産仔が得られること」が確認できた場合、いよいよ破壊する遺伝子配列について調べることになる。最近では多くの動物種でゲノム情報が開示されているが、研究者人口の少ない動物種の場合はその情報が不完全であることも多い。そのような場合、近縁種の哺乳動物において、その標的遺伝子の配列を比較し、よく保存されている領域に対してアニールするようなプライマーを作製し、PCRにて目的の動物で遺伝子配列を増幅した後に、正確な配列解析を行う必要がある。それでも標的配列が得られない場合は、インバースPCR(Online Bio Protocol: <http://protocol-optimizer.com/?p=745>)などにより、標的遺伝子近傍をクローニングする戦略も考えられる。また、遺伝子破壊を

目的とする場合、「破壊することでその遺伝子が機能しなくなる部分」をターゲットに選ぶ必要がある。たとえば、1stメチオニン付近や活性残基部分などを中心部分に含む0.5 kbp ~ 1.0 kbp程度の長さを増幅することが望ましい。ただし、1stメチオニンを標的に選ぶ場合、オルタナティブスプライシングにより、別のエクソンが出現しないことや、別のメチオニンが1stメチオニンとして出現しないことを確認する必要がある。標的配列付近をPCRで増幅した断片は、標的配列への切断活性評価に使用する。

## 標的配列選択について

具体的な標的配列候補として、まずは、破壊したい遺伝子の標的配列付近においてPAM配列を見いだす(5'-XGG-3'もしくは5'-CCX-3'でも可)必要がある(図1)。PAM配列から5'上流側に20塩基以上の配列を標的配列として5'-G(N20~25程度)XGG-3'の下線部に対するプライマー(1本鎖オリゴDNA)を相補鎖とセットで外注する。一つの標的遺伝子に対して4つ以上は標的配

列を見いだすことが理想的である。その後、外注した相補的プライマー同士をアニール反応に供した後に、gRNAとCas9タンパク質の発現を同時に誘起できるプラスミドpX330(非営利団体addgeneから購入可能)にサブクローニングする。最近、addgeneではプラスミドの配布だけでなくターゲット配列のデザインやgRNAの受注も取り扱っている(<https://www.addgene.org/>)。一般的なゲノム編集において最も注意しなければならないのは、ゲノム編集核酸によるoff-target効果であろう。これは標的配列によく似た配列がゲノム上にある場合、その配列にも切断と改変が生じてしまい、予期しない表現型が出てしまう可能性を意味する。動物種にもよるが、できるだけ標的配列を決定する際にはoff-target配列の有無を確認する必要がある。現在では優れた配列決定プログラムも利用できるため、これらのサービスを積極的に活用することを強く推奨する(CRISPR direct: <http://crispr.dbcls.jp/>, GGGenome: <http://gggenome.dbcls.jp/ja/mml0/2/>)。

## プラスミドpCAG-EGxFPへの導入とSSAアッセイによる切断活性評価

「標的配列選択について」で記載した標的配列を中心付近に含む0.5 kbp ~ 1.0 kbp程度の遺伝子断片をプラスミドpCAG-EGxFP(addgeneより入手可能)のマルチクローニングサイトに導入する。pCAG-EGxFPはEGFP遺伝子について約500bpほどの重複配列を持ったN末端



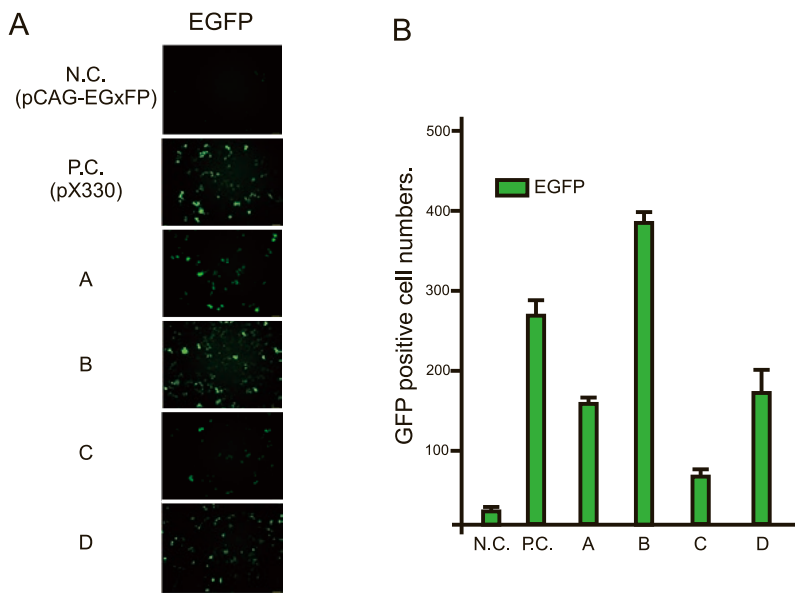


図2：pCAG-EGxFPによるSSAアッセイ。EGFPの蛍光観察（A）とグラフによる定量（B）。4つの標的配列（A～D）、あらかじめ切断活性の判明しているコントロール（P.C.）および標的配列pX330を導入しない試験区（N.C.）で、EGFPの蛍光を測定した。標的配列Bの活性が最も高く、切断活性は充分であろう。一方、標的配列Cは明らかに活性が低いことがわかる。（日動協ホームページ、LABIO 21 カラーの資料の欄を参照）

側とC末端側の配列で、標的配列（0.5～1.0 kbp）を挟むような構造になっている。ターゲット配列を導入したpCAG-EGxFPとガイドRNA配列を導入したpX330をHEK293細胞に共導入する。HEK293細胞内でgRNAとCAS9が発現し、pCAG-EGxFPに導入された標的配列に結合し二本鎖切断が起こる。するとN末側のEGFPとC末側のEGFP配列の重複部分が遺伝子相同組換えやシングルストランドアニーリング（SSA）を起こし、完全なEGFP配列として組み変わる。つまり、緑色蛍光を発する細胞数を比較することにより、各標的配列に対する切断活性を相対的に評価し、最も効率の高い標的配列を決定することができる（図2）<sup>(8)</sup>。

#### ゲノム編集核酸の受精卵への導入

SSAアッセイにより標的配列を確定した後の選択肢としては、1. プラスミドpX330を（受

精卵前核に）注入する、2. 標的配列を含むガイドRNAとCas9 mRNAをin vitro転写により調製して（受精卵細胞質に）導入する、3. ガイドRNAとtracrRNA、およびCas9 mRNA（もしくはCAS9タンパク質）を外注・購入して（受精卵細胞質に）導入する等の選択肢がある<sup>(9)</sup>。ゲノム編集効率は動物種によってその核酸濃度などの試行錯誤が必要になるが、初期胚からのゲノム調製やPCRなどのシステムを構築しておくことにより、以降の実験の効率が格段に上がる。また、前核期卵子への注入法の場合、モザイク的に様々な細胞で異なるゲノム編集が起こってしまう例が見られる。これは、前核期で注入したゲノム編集核酸が、ゲノム編集が起らなかったアレルに対して、2細胞期以降の胚で様々な標的遺伝子の欠失を誘起してしまうことに起因する。胚操作が困難である場合

は、上述したGONAD法<sup>(7)</sup>やTAKE法<sup>(10)</sup>なども選択肢となりうる。

#### 胚における切断活性評価と発生率の検討

ゲノム編集核酸を導入した胚は、移植前の予備実験として胚盤胞期まで体外もしくは体内で発生させて、その発生率とゲノム編集効率を確認しておくことが望ましい。具体的には2-cell, 4-cell, blastocystへの発生率を記録し、発生した胚に関してはその胚の透明帯を除去した後にゲノムPCRに供して、標的配列に欠失が起こっているか否かを確認する。この解析で、あらかじめ発生率とゲノム編集効率を確認してあれば、後の移植実験に自信を持って進むことが出来る。可能であれば、妊娠中期の胚などでも発生率とゲノム編集効率を求めておくことが望ましい。

#### 産仔でのゲノム編集確認

生まれてきた個体から組織を一部採取してゲノム編集が起こっているか否かを確認する。ただし、体表や尾部の一部からゲノムを採取して「ホモ欠損」という結果が出たとしても、その個体の産仔（本来であれば全ての産仔はヘテロ欠損になるはず）が、全て野生型という場合がある。ホモ欠損の細胞と野生型の細胞がモザイク状態になっていることを意味しており、私もそのような経験がある。

#### おわりに

本稿では、一般的にはメジャーとは言えないような動物で遺

伝子破壊を行いたいと考えている読者が、CRISPR/Casシステムによってそれを成し遂げるために、どのようなことに留意すれば良いのか、そしてその手順などについて解説した。しかしながら、いかに様々な動物種での遺伝子破壊が可能になったとは言え、実際に行う場合、さらに予期しない困難が立ちあがることが研究の常である。私たちはこれまで、マウス、ウサギ、野生ネズミでのゲノム編集を成し遂げてきたが、動物種が変われば、その難度は格段に上がることを経験している。そして、昨今のゲノム編集技術の発展は、その労力に見合うハイインパクトジャーナルへの論文掲載を難しくしている。つまり、その動物で「なんらかの遺伝子を破壊

しただけ」では、良い雑誌に掲載されることはなくなってしまった。いかにその動物種を用いて特殊な現象を解明したのか、あるいは有効なモデルを作製したかのを効果的に示すことが、苦労に見合う成果に結びつけるための肝と言えよう。

#### 引用文献

- (1) 編集/城石 俊彦、真下 知士:進化するゲノム編集技術, エヌティーエス、2015
- (2) Mochida K. et al., Recent Technical Breakthroughs for ARTs in Mice. *J. Mamm. Ova. Res.* (in press) (2017).
- (3) Shi FX. et al., Development of Embryos in Superovulated Guinea Pigs following Active Immunization against the Inhibin  $\alpha$ -Subunit. *Endcr. J.* 47, 451-459, (2000)
- (4) Kishi H., et al., Induction of Superovulation by Immunoneutralization of Endogenous Inhibin through the Increase in the Secretion of Follicle-Stimulating hormone in the Cyclic Golden Hamster. *J. Endcr.* 151, 65-75, (1996)
- (5) Sato, K. et al., Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing. *Cell Stem Cell* 19, 127-138 (2016).
- (6) Kawano, Y et al., Gene targeting in rabbits: single-step generation of knockout rabbits by microinjection of CRISPR/Cas9 plasmid. *Methods in Molecular Biology, Genome Editing in Animals*, in press (2017)
- (7) Gurumurthy CB et al., GONAD: A Novel CRISPR/Cas9 Genome Editing Method that Does Not Require Ex Vivo Handling of Embryos. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 88, Unit 15.8. (2016)
- (8) Mashiko, D. et al., Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci. Rep.*, 3, article number, 3355, (2013).
- (9) Aida T. et al., Cloning-free CRISPR/Cas System Facilitates Functional Cassette Knock-in in Mice. *Genome Biol.* 16: 87. (2015)
- (10) Kaneko T. et al., Simple Knockout by Electroporation of Engineered Endonucleases into Intact Rat Embryos. *Sci Rep.* 4, 6382, (2014).

## 私たちは「実験動物技術者集団」です。

*We are Technologist of Laboratory Animals.*

みなさまの開発・研究のためのパートナーとして、  
医療や科学の明るい未来のお手伝いを致します。

- 実験動物総合受託事業
- 技術者派遣事業
- 職業紹介事業



本社 〒160-0022 東京都新宿区新宿5丁目18番14号 新宿北西ビル7階 TEL 03-6457-3751 FAX 03-6457-3752  
西日本事業部 〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田1丁目11番 4-1100号 大阪駅前第四ビル11階10号室 TEL 06-4799-9820 FAX 06-4799-9011  
九州事業部 〒810-0001 福岡県福岡市中央区天神5丁目5番8号 福桜ビル5階 TEL 092-753-6697 FAX 092-753-6698

【一般労働者派遣事業（般）13-080297】  
【有料職業紹介事業 13-コ-080309】



株式会社 アニマルケア  
www.animal-care.co.jp

●お気軽にお問い合わせください

0120-011419