

このドナー DNA には通常、一本鎖 DNA もしくは二本鎖 DNA が用いられており、それぞれ目的に応じて使い分ける必要がある。

ノックインは総じて一本鎖 DNA の方が二本鎖 DNA に比べて作製効率が高い。特に比較的短い一本鎖オリゴ DNA (ssODN) は、設計した配列を注文するだけで簡単に入手することができ、一塩基置換や短い配列の挿入・置換には極めて有用である。我々も ssODN を用いて F344 ラットを対象に毛色関連遺伝子の *Tyr* 遺伝子、*Asip* 遺伝子、*Kit* 遺伝子を含む、様々な遺伝子についてノックインラットの作製を報告してきた<sup>(5)</sup>。さらに大きなサイズのノックインにも利用できることを示すため、Nickase を用いた 1kb 以上の長鎖一本鎖 DNA の精製法を開発してラット受精卵へ利用した。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、300 bp 程度の相同配列を付加することで長鎖一本鎖 DNA でも効率的にノックインラットを作成できることを明らかにした<sup>(6)</sup>。この手法を用いることで、Flox 配列の導入、Cre 遺伝子の導入、リピート配列の置換など、様々なパターンでの遺伝子改変ラットの作製に成功している。

長鎖一本鎖 DNA の利点はエレクトロポレーションでも利用できる点にある。一例としてラットの *Vapb* 遺伝子に対し、イントロンに 2 つの loxP 配列、エクソンに SNP 置換を導入した例を示す (図 2)。gRNA をエクソン前後のイントロン上に設計し、その部分に loxP を導入する長鎖一本鎖 DNA を設計した。ドナー DNA を精製後、2 つの gRNA、Cas9 タンパク質とともに、エレクトロポレーション法で導入した結果、16 % の効率でノック

イン個体の作出に成功した。マウスでも同様の手法として Easi-CRISPR が報告されており、長鎖一本鎖 DNA はノックイン個体の作出に有用な方法として期待されている<sup>(8)</sup>。

一方で、長鎖一本鎖 DNA のエレクトロポレーションでの導入法はサイズが 2kb、3kb と大きくなるにつれてノックイン効率は下がる傾向にある。実際に我々が実施してきた中でも 3kb 以上のノックインは長鎖一本鎖 DNA でもノックイン個体が取れない例がしばしば起こる。最近、この問題を解決する一つの方法として、ドナー DNA として特定のアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いることで数 kb のノックインラットを効率的に作製できることが示された<sup>(9)</sup>。しかし AAV の保持できるサイズも約 5kb 以下であり、数 kb 以上の配列を標的部位に導入したい場合は、や

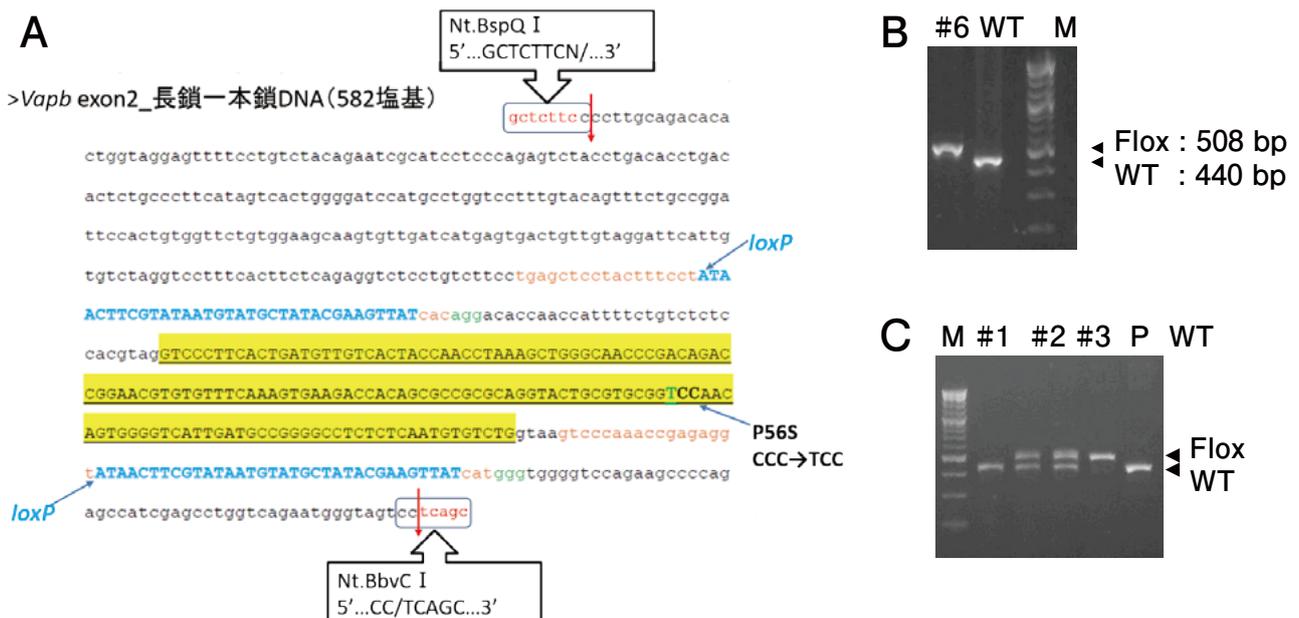


図2 長鎖一本鎖DNAを用いたFloxノックインラットの作製

(A) 2つのloxPサイト (青) とSNP置換 (緑) を導入したドナーDNAのデザイン。両末端には、調製時に利用するニックアーゼ配列を示している。オレンジはgRNAの標的配列。(B) ジェノタイプの結果。#6はノックインの予想位置にバンドが出ている。(C) #6と野生型と交配して生まれたF1個体のジェノタイプ結果。#2,#3はFloxアリルを持っていることがわかる。