

技術解説

# CRISPR/Cas システムを用いた 遺伝子改変マウスの作製とその応用

野田大地\*, 伊川正人\*\*

Production of genetically modified mice with CRISPR/Cas system

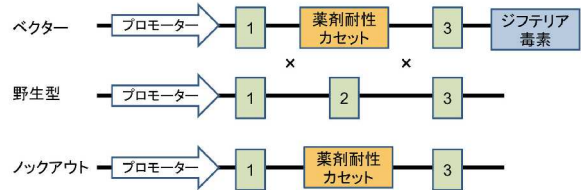
Key Words : genome editing, knockin, knockout, point mutation

## 1. はじめに

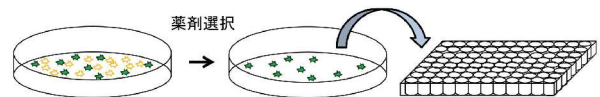
マウスは、ライフサイクルが比較的短く（雄では約6週間、雌では約4週間で性成熟し、妊娠期間は約20日間）、多産で飼育のしやすさから古くから実験動物として用いられてきた。さらに、体外受精や胚操作など生殖工学的手法も確立されており、現在マウスは哺乳類のモデル生物として最も利用されている動物である。

生命科学研究において、特定の遺伝子の *in vivo* での機能を明らかにできる遺伝子ノックアウト (KO) 技術の貢献は非常に大きい。一般的に、KO マウスは、遺伝子ターゲティング法で内在性遺伝子を破壊したES細胞 (embryonic stem cell) を胚盤胞に注入し、得られたキメラマウスを野生型マウスと交配させて作製する (図1A-D)。しかし、ベクターの構築、ES細胞の遺伝子操作と培養、キメラマウスの作製

### A. 遺伝子ターゲティング法



### B. ES細胞の培養



### C. キメラマウスの作製



### D. KOマウスの作製

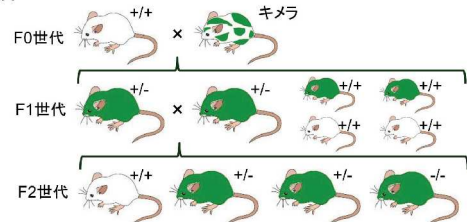


図1. ES細胞を用いた遺伝子改変マウスの作製

- A: 遺伝子ターゲティングベクターと内在性のゲノムの間で相同組換えが起こると薬剤耐性遺伝子カセットがゲノムに組み込まれ薬剤耐性となる (ポジティブ選択)。一方、ベクターがランダムに組み込まれると、ジフテリア毒素により細胞が死ぬ (ネガティブ選択)。一般的に相同組換え効率は非常に低いため、ポジティブ選択とネガティブ選択を組み合わせ、相同組換え体を選別する。
- B: 遺伝子ターゲティング法でベクターが導入されたES細胞を薬剤により選択してクローン化する。PCR法などで標的遺伝子が破壊されたES細胞クローンを同定し増殖させる。
- C: 染色体の数が正常だったES細胞を初期胚と凝集させて、偽妊娠マウスに移植し、キメラマウスを作製する。
- D: 得られたキメラマウス (F0 世代) を野生型と交配させて、ヘテロ変異を持つF1 世代を得る。さらにヘテロ変異を持つF1 マウス同士を交配させてホモ変異を持つF2 世代を得る。
- 図は文献40を改変。



\* Taichi NODA

1983年12月生  
神戸大学大学院 農学研究科 生殖生物学研究室 (2013年)  
現在、大阪大学 微生物病研究所 附属 遺伝情報実験センター 遺伝子機能解析分野 特任研究員 (常勤) 博士 (農学)  
発生工学・生殖生物学  
TEL : 06-6879-8375  
FAX : 06-6879-8376  
E-mail : noda@biken.osaka-u.ac.jp



\*\* Masahito IKAWA

1969年4月生  
大阪大学大学院 薬学研究科 (1997年)  
現在、大阪大学 微生物病研究所 感染動物実験施設 教授 博士 (薬学)  
実験動物学  
TEL : 06-6879-8375  
FAX : 06-6879-8376  
E-mail : ikawa@biken.osaka-u.ac.jp

と交配など、多くのステップがあるので、KO マウスの作製だけで年単位を要する実験になることも多かった。また、作製にかかる効率、コスト、技術や設備などの問題で遺伝子 KO マウス実験の恩恵を受けられる研究者は限られていた。しかし近年、ゲノム上の特定領域を切断して改変する“ゲノム編集ツール”が開発され、情勢が大きく変わりつつある。本稿では、ゲノム編集ツールの中で特に CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) / Cas9 (CRISPR associated 9) システムを中心に、私たちの経験や今後の展望を交えて紹介したい。

## 2. 人工ヌクレアーゼ開発の歴史

ゲノム編集では、人工ヌクレアーゼにより標的領域の二本鎖 DNA を切断し、ゲノム DNA の修復過程を利用して標的遺伝子を改変する。ゲノム DNA 修復機構には、大きく分けて NHEJ (non-homologous end joining) と HR (homologous recombination) がある (図 2A)。NHEJ は、切断を受けた DNA 末端が結合される際に、数塩基の挿入や欠損などのエラーが起こり易く遺伝子が破壊され易い。一方、HR は切断部の修復の際に鋳型配列を参照して修復を行うので、相同性を持つ一本鎖オリゴヌクレオチド (ssODN) などを人為的に導入することで、目的変異を導入できる (図 2A)。

1995 年、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に由来するメガヌクレアーゼ I-SceI を用いた実験から、二本鎖 DNA 切断により相同組換えの効率が改善することが報告された [1]。しかしメガヌクレアーゼ I-SceI が特異的に認識する 18 塩基を先に導入しておく必要があるため、実用化には程遠いものであった。同時期に開発された ZFN (zinc finger nuclease) は、3 塩基を認識する ZF モチーフとその末端に FokI ヌクレアーゼを結合させた人工キメラタンパク質が、標的領域でヘテロダイマーを形成してゲノム DNA を切断する (図 2B) [2]。しかし、ZF モチーフを連結すると、塩基認識の特異性が低下することが多く、思い通りのベクター構築が難しかった。さらに、市販品が非常に高価であることから、ZFN は一部の研究者のみで使用されていた。そんな中、2010 年に ZFN の DNA 結合ドメインを植物病原細菌である *Xanthomonas* 属細菌のもつ TAL エフェクターに変

えた TALEN (transcription activator-like effector nuclease) が開発された (図 2C) [3]。TAL エフェクターが DNA に結合する際は、各モジュールが核酸の A, T, G, C をそれぞれ 1 塩基ずつ認識する。ZFN と違っていくつかのモジュールをつなぎ合わせても塩基認識の特異性が維持されるので、任意の配列を認識する TAL エフェクターの構築が一般の研究者でも可能なレベルになった。当初、哺乳類のゲノム編集では TALEN での遺伝子改変効率が低いという問

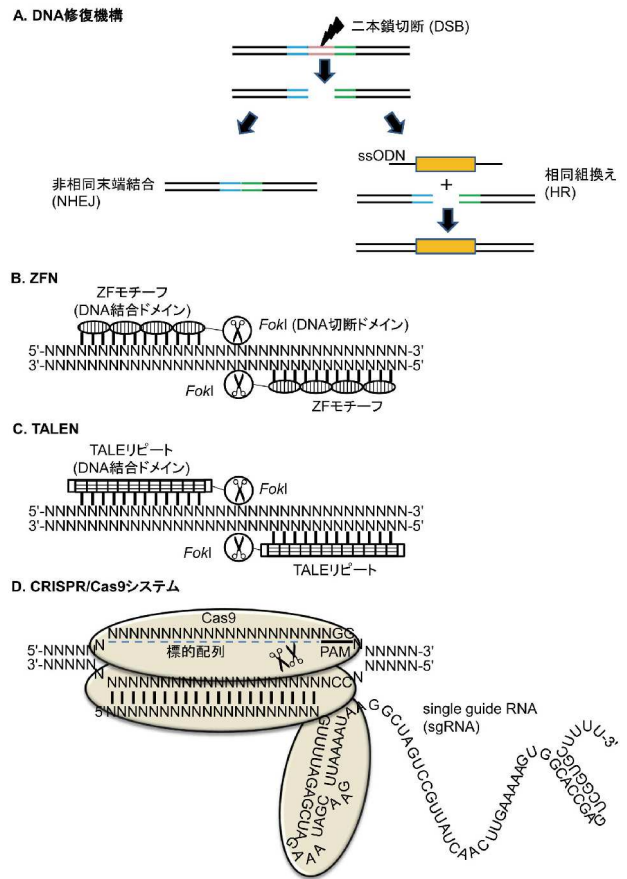


図 2. DNA 修復機構と人工ヌクレアーゼ

- A: ゲノム DNA が切断されると主に非相同末端結合 (NHEJ) と相同組換え (HR) により修復される。
- B: ZFN は 3 塩基を認識する ZF モチーフを数個繋ぎ合わせ、その末端に FokI ヌクレアーゼを結合させた融合タンパク質を作る。2つの ZFN がセンス鎖とアンチセンス鎖をそれぞれ認識することで FokI ダイマーが形成されて、DNA 切断活性を發揮する。
- C: TALEN は TALE (TAL エフェクター) リピートの各モジュールが 1 塩基をそれぞれ認識する。ZFN では ZF モチーフを結合すると互いの塩基配列の認識に干渉が起こり、認識の特異性が低下するという問題があったが、TALEN ではこの点が解消された。
- D: CRISPR/Cas9 法は sgRNA の 5' 側の 20 塩基で標的配列を認識する。標的配列の直下に存在する PAM 配列の上流 3 目と 4 目の間を Cas9 が切断し、平滑末端が生じる。図は文献 41 を一部改変。

題があったが [4], 2013年にDNA結合モジュール連結部位のアミノ酸配列を改良したPlatinum TALENが開発され, 哺乳類細胞でも高い切断効率が得られることが報告された [5].

### 3. CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集

ZFN や TALEN の登場で人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集が注目を集め, 2011年にはNature Method誌のMethod of the Year, 2012年にはScience誌のBreakthrough of the yearに取り上げられた。このような状況の中, 2013年に原核生物の獲得免疫として働くCRISPR/Casシステムを利用した新たなゲノム編集ツールが開発された [6,7]。CRISPR/Casシステムは, フェージなどを介して侵入する外来DNAを断片化して自らのゲノム上に取り込み, 2度目の感染の時に, 先に取り込んだゲノム断片から発現する2つの小分子RNAを用いて外来DNAの標的部位を認識し, CASヌクレアーゼをリクルートしてこれを切断する [8]。Zhangらが開発したCRISPR/Cas9システムでは, 2つの小分子RNAを一つにしたキメラRNA [single guide RNA (sgRNA) と呼ばれる] と Cas9 の 2 因子を発現させれば標的ゲノム DNA が切断できる (図 2D) [6]。ZFN や TALEN では, DNA 結合ドメインと切断ドメインを融合タンパク質として機能させるために標的遺伝子ごとに複雑なベクター構築が必要だったが, CRISPR/Cas9 システムでは標的配列に対応する塩基を変えるだけでいい。このように手軽にもかかわらず, 特に哺乳類細胞では, TALEN と同等かそれ以上の活性効率が低コストで再現性も高く得られる [9-11]。また, 遺伝子改変効率は異なるが, ヒト由来の細胞株 [12] から, モデル生物 (マウス [13-15], ラット [16,17], ブタ [18], サル [19], イネや小麦 [12] など) に至るまで遺伝子改変ができることから, 瞬く間に生命研究者の間に広がった。

### 4. CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子改変マウスの作製方法

Wang らは sgRNA と Cas9 をコードする mRNA を受精卵の細胞質にそれぞれ注入することで, 遺伝子改変マウスの作製に成功した (RNA 法, 図 3A) [13]。RNA 法は, sgRNA と Cas9 の濃度比を調整できるというメリットがある一方, インジェクションまで

に作製した mRNA が分解するリスクが伴う。そこで, 私たちは sgRNA の配列と Cas9 カセットが挿入された pX330 プラスミドを環状のまま受精卵前核に注入する方法を開発した (DNA 法, 図 3B) [14]。

DNA 法では, “マウスゲノムへプラスミド DNA が組み込まれる” というリスクと, “毒性が高く高濃度のプラスミドを注入できない” という問題点が

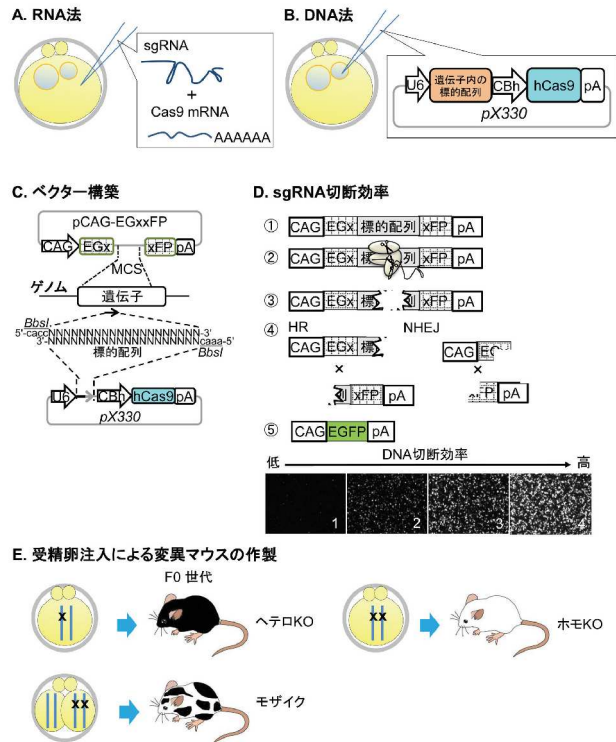


図 3. CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子改変マウスの作製

- A: RNA 法では, sgRNA と Cas9 をコードする mRNA を同時に細胞質に注入する。
- B: DNA 法では pX330 プラスミド DNA を環状のまま受精卵前核へ注入する。
- C: 標的配列 (矢印) の断片を pX330 の BbsI サイトに挿入する。レポータープラスミドとして, 標的配列をカバーする領域を pCAG-EGFP のマルチクローニングサイト (MCS) に挿入する。
- D: レポータープラスミドを用いた sgRNA 活性の検討。①レポータープラスミドでは, 中央の約 400 塩基が重複するように EGFP 遺伝子を前半 2/3 と後半 2/3 に分けてある。さらに標的配列を挿入するため, そのままでは EGFP は発現しない。②Cas9 が標的配列を認識して, ③切断すると, ④NHEJ や HR が起こるが, ⑤HR により EGFP カセットが復活すると蛍光を発する。私たちは, 標的配列の DNA 切断効率を 4 段階に分けて評価している (各写真の右下に示した数字がスコア)。
- E: 受精卵に注入した sgRNA/Cas9 が標的遺伝子の片方もしくは両方のアレルを切断すると変異マウスが得られる。両アレルが破壊された場合には, 遺伝子 KO マウスとなるが, 卵割したのちに Cas9 が標的配列を切断するとモザイクマウスが生まれる。体細胞で見つかる変異とは異なる変異が子孫に伝わることも少なくない。図は文献 40,41 を改変。

ある。前者に関して、私たちが直鎖状DNAと環状DNAを注入して比較したところ、直鎖状DNAでは、産まれたマウスの約33%でプラスミドDNAの挿入が確認されたのに対し、環状DNAでは3%と低い効率であった[15]。もし、マウスゲノム上にプラスミドDNAが挿入されても、交配により次世代でプラスミドDNAが挿入されていない個体を選べば良いと考える。後者に関して、私たちはHEK293T細胞を用いてsgRNA切断効率の検討系を開発し(図3C,D)、切断活性の高いsgRNAを使用することで、変異マウスを効率よく得ていることから現実的には問題でないと考えている[14,15]。うまくいけば、両アレルに変異を持ったF0マウスが最短1ヶ月で得られる点もRNA法と比べて遜色ない(図3E)。ただし、卵割が進んだ後にCas9が標的配列を切断するとホモ変異だけでなく複数アレルに変異を持つマウス(モザイクマウス)が生まれるため、F0マウスで表現型解析を行うことはリスクが高い(図3E)。当初、プラスミドからRNAを介したタンパク質発現に時間がかかるために、モザイク率が高いのではないかと考えたが、RNA法でもモザイクになることは避けられないことから[20,21]、F0でのアッセイを無理に行うのではなく、むしろ交配等で目的の変異のみを持つ次世代を得て解析の方が間違いないと考える。

また、sgRNA、Cas9 mRNAと標的領域と相同した配列を持つssODNを同時に受精卵に注入すれば、相同組換えにより点変異やFlagなどの短いタグの挿入ができる(図2A)[22,23]。我々はプラスミド法でも同様に点変異マウスが得られることを確認している。ヒト遺伝性疾患の多くは、1~数塩基の欠失や置換によるものであることから、今後はゲノム編集によりヒト型変異を持つ実験動物の作製と解析が主流になると考えられる。

## 5. オフターゲット効果

約20塩基×2箇所の合計30~40塩基で標的配列を認識するZFNやTALENと比べて、CRISPR/Cas9システムは20塩基×1箇所で認識するため、標的配列と類似した配列が意図せずに切断されてしまう“オフターゲット効果”が問題とされる[24-26]。残念ながら、30塩基のsgRNAを細胞に導入しても、その後プロセッシングにより20塩基になるので、sg

RNAの伸長で認識配列の特異性を上げることはできないとされる[27]。私たちは、PAM (protospacer adjacent motif) 配列であるNGGとすぐ上流13塩基以上が完全一致するオフターゲット配列が切断され易いとされることから[6]、その数が少ない(5個程度以下)sgRNAを選んでインジェクションしている。その結果、私たちが作製した遺伝子改変マウスでは、382カ所中3カ所のみ(0.7%)でしかオフターゲット切断が見られなかった[15]。また、CRISPR/Cas9システムを使ってiPS細胞のゲノム編集を行った報告でも、オフターゲット切断が少なかったことが示されている[28]。ガン細胞株などと異なり、遺伝子修復活性の高いES細胞や受精卵ではオフターゲット効果は少ないと考えて良さそうである。さらに全てのオフターゲット切断の可能性を否定することは難しいことから、交配と統計処理による判断が現実的な解決策と考える。ただし、次世代を得るまでに時間がかかる動物種や少産種では、交配によるオフターゲット切断された箇所の分離は現実的ではない。そのような場合、オフターゲット効果を抑えることが報告されている2つのヌクレアーゼ活性部位の片方を不活性化したCas9 nickase (D10AあるいはH840A)と2つのsgRNAとを組み合わせて(Double nicking)遺伝子改変することを提案する(図4A)[27]。

## 6. 応用例

CRISPR/Cas9システムを用いて実施されているゲノム編集の中から特徴的なものをいくつか紹介したい。例えば、2種類のsgRNAを同時に培養細胞やES細胞へ導入することで、メガベースにもおよぶ長鎖欠損[29,30]や逆位[30,31]などが起こせる(図4B)。また、Cas9が持つ両方のヌクレアーゼ活性を不活性化させたdead Cas9 (dCas9)を、標的遺伝子のプロモータ領域に結合させて、RNA干渉のように遺伝子の転写を抑制することや、VP64あるいはp65といったエフェクターと結合させることで標的遺伝子の転写を活性化させること(図4C)[32-35]、dCas9に修飾酵素やGFPなどの蛍光タンパク質を結合させてエピゲノム改変や可視化が報告されている(図4D,E)[36,37]。さらに、シロイヌナズナに由来するCRY2 (cryptochrome 2)とCIB1 (cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix 1)が青色光の照射

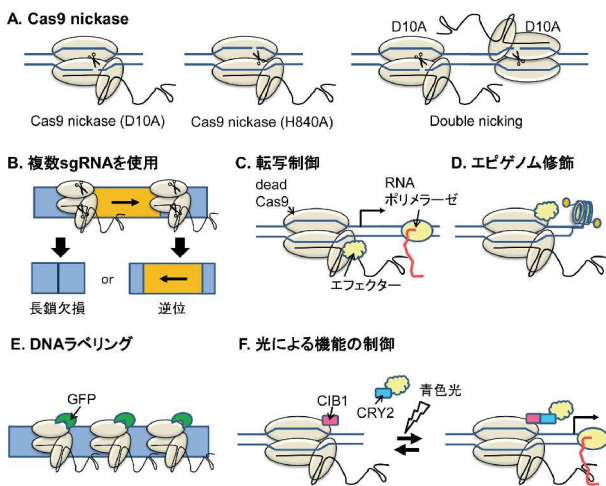


図4. ゲノム編集の応用

- A: 2カ所のヌクレアーゼ活性のうち片方を不活性化した Cas9 nickase と2つの sgRNA を組み合わせれば、認識配列の特異性を上げてオフターゲット効果を抑えることができる。
- B: 2種類の sgRNA と Cas9 を注入すれば、長鎖領域の欠損や逆位を誘導できることが知られている。
- C-D: 2カ所のヌクレアーゼ活性を破壊した dead Cas9 にエフェクターを結合させて、転写やエピゲノム修飾をコントロールできる。
- E: dead Cas9 に EGFP を融合させることで、標的遺伝子座を可視化できる。
- F: CIB1 と CRY2 が青色光の照射で可逆的に二量体を形成するメカニズムを用いて、エフェクターが機能する時期を制御できる。

で二量体を形成するメカニズムを利用して、dCas9 に CIB1 をつないだ融合タンパク質と CRY2 にエフェクターを結合させたタンパク質を細胞に注入して、上述した Cas9 システムが機能する時期を制御する取り組みも行われている (図4F) [38]。また、標的配列と Cas9 カセットが挿入された *pX330* をマウス尾静脈内に注入すれば、標的遺伝子の欠損変異が *in vivo* で誘導できる [39]。CRISPR/Cas9 システムを基礎研究に利用するだけでなく、臨床応用を目指した遺伝子治療に用いる研究も進められている。例えば、筋ジストロフィー患者から樹立された iPS 細胞で欠損している *DYSTROPHIN* 遺伝子が修復されたこと [28] が報告されている。

## 7. おわりに

本稿では、ゲノム編集技術の歴史とともに CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子改変マウスの作製やその応用について紹介してきた。2013年に、CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子改変に関する報告がされてからまだ2年しかたっていないが、

CRISPR, Cas9, genome editing というキーワードを入力して Pubmed で検索すると TALEN の2倍以上にあたる300件を超える論文が2015年3月現在でヒットする。このように CRISPR/Cas9 システムの爆発的な普及は、ベクター構築のしやすさ、高い切断効率や汎用性の高さにあるだろう。今後は、ヒト疾患モデル動物の開発に加え、本稿で紹介したような様々な応用技術を活かして、さらなる生命科学研究の発展が期待される。

## 引用文献

- [1] Choulika A. *et al.*, Nicolas, Mol Cell Biol, **15**, 1968 (1995).
- [2] Kim Y.G. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, **93**, 1156 (1996).
- [3] Cermak T. *et al.*, Nucleic Acids Res, **39**, e82 (2011).
- [4] Sung Y.H. *et al.*, Nat Biotechnol, **31**, 23 (2013).
- [5] Sakuma T. *et al.*, Sci Rep, **3**, 3379 (2013).
- [6] Cong L. *et al.*, Science, **339**, 819 (2013).
- [7] Mali P. *et al.*, Science, **339**, 823 (2013).
- [8] Horvath P. and Barrangou R., Science, **327**, 167 (2010).
- [9] Hwang W.Y. *et al.*, Nat Biotechnol, **31**, 227 (2013).
- [10] Doudna J.A. and Charpentier E., Science, **346**, 1258096 (2014).
- [11] Chen L. *et al.*, Gigascience, **3**, 24 (2014).
- [12] Sander J.D. and Joung J.K., Nat Biotechnol, **32**, 347 (2014).
- [13] Wang H. *et al.*, Cell, **153**, 910 (2013).
- [14] Mashiko D. *et al.*, Sci Rep, **3**, 3355 (2013).
- [15] Mashiko D. *et al.*, Dev Growth Differ, **56**, 122 (2014).
- [16] Li W. *et al.*, Nat Biotechnol, **31**, 684 (2013).
- [17] Li D.L. *et al.*, Nat Biotechnol, **31**, 681 (2013).
- [18] Whitworth K. M. *et al.*, Biol Reprod, **91**, 78 (2014).
- [19] Niu Y. *et al.*, Cell, **156**, 836 (2014).
- [20] Zhu X. *et al.*, Sci Rep, **4**, 6420 (2014).
- [21] Yen S.T. *et al.*, Dev Biol, **393**, 3 (2014).
- [22] Yang H. *et al.*, Cell, **154**, 1370 (2013).

- [23] Inui M. *et al.*, *Sci Rep*, **4**, 5396 (2014).  
[24] Fu Y. *et al.*, *Nat Biotechnol*, **31**, 822 (2013).  
[25] Hsu P.D. *et al.*, *Nat Biotechnol*, **31**, 827 (2013).  
[26] Lin Y.N. *et al.*, *Nucleic Acids Res*, **42**, 7473 (2014).  
[27] Ran F.A. *et al.*, *Cell*, **154**, 1380 (2013).  
[28] Li H.L. *et al.*, *Stem Cell Reports*, **4**, 143 (2015).  
[29] Essletzbichler P. *et al.*, *Genome Res*, **24**, 2059 (2014).  
[30] Kraft K. *et al.*, *Cell Rep*, **10**, 833 (2015).  
[31] Maddalo D. *et al.*, *Nature*, **516**, 423 (2014).  
[32] Gilbert L.A. *et al.*, *Cell*, **154**, 442 (2013).  
[33] Qi L.S. *et al.*, *Cell*, **152**, 1173 (2013).  
[34] Perez-Pinera P. *et al.*, *Nat Methods*, **10**, 973 (2013).  
[35] Konermann S. *et al.*, *Nature*, **517**, 583 (2015).  
[36] Chen B. *et al.*, *Cell*, **155**, 1479 (2013).  
[37] Hsu P.D. *et al.*, *Cell*, **157**, 1262 (2014).  
[38] Nihongaki Y. *et al.*, *Chem Biol*, **22**, 169 (2015).  
[39] Xue W. *et al.*, *Nature*, **514**, 380 (2014).  
[40] 伊川正人, 領域融合レビュー, **3**, e008 (2014).  
[41] 野田大地, 伊川正人, 脳21, **18**, 104 (2015).

