

遺伝子改変マウスの作製の歴史と技術進歩



技術解説

宮脇 慎吾*, 立花 誠**

Technological advances in the production of genetically modified mice

Key Words : knock out mouse CRISPR/Cas

1. はじめに

マウスは生命科学・医学の分野で一般的に使われているモデル生物の一つである。哺乳動物としては小型で飼育が容易であること、ライフサイクルが短いこと（約2ヶ月で次世代を得ることができる）、多産であることなど、実験動物としての多くの利点を備えている。

遺伝子の過剰発現や欠損がどのような表現型をもたらすのかを明らかにすることは、その遺伝子の機能を知るうえで非常に重要である。もともとは細菌や酵母などの微生物で開発されてきた遺伝子改変のノウハウが今日では多くの生物種に応用され、植物や動物でも遺伝子改変が可能となっている。マウスにおいても、外来遺伝子を発現するトランスジェニック (TG) マウス、内在性遺伝子が欠損したノックアウト (KO) マウスを作製するための技術開発がおこなわれてきた。これには分子生物学の発展の

みならず、胚培養などの生殖工学技術の発展も大きく貢献している。本稿では遺伝子改変マウスの作製の歴史を紹介するとともに、KO マウス作製のための最新の技術の一端を紹介する。

2. TG マウスの作製の歴史

TG マウスの初めての報告は、1980年に米国Yale大学のGordon博士らによってなされた [1]。大腸菌から精製したプラスミドDNAをマウス受精卵の前核へマイクロキャピラリーを用いて注入した。図1は私たちが通常おこなっているマウス受精卵前核へのDNA注入の写真である。このマイクロキャピラリーによるDNA注入法は、Gordon博士らが1980年当時に報告したやり方とほぼ変わりなく、現在でもトランスジェニック動物の作製で広く使われている。Gordon博士らは、プラスミドDNAを注入した受精卵を偽妊娠母親マウスの卵管内に移植し、産仔を得た。計187個体の産仔のゲノムDNAをサ



* Shingo MIYAWAKI

1985年2月生まれ
慶應義塾大学大学院 医学研究科
(2015年)
現在、大阪大学大学院 生命機能研究科
エピゲノムダイナミクス研究室
特任助教 博士(医学) 分子生物学
TEL : 06-6879-4672
FAX : 06-6879-4671
E-mail : miyawaki@fbs.osaka-u.ac.jp



** Makoto TACHIBANA

1967年4月生まれ
東京大学大学院 農学生命科学研究科
(1995年)
現在、大阪大学大学院 生命機能研究科
エピゲノムダイナミクス研究室
教授 博士(農学) 分子生物学
TEL : 06-6879-4670
FAX : 06-6879-4671
E-mail : tachiban@fbs.osaka-u.ac.jp

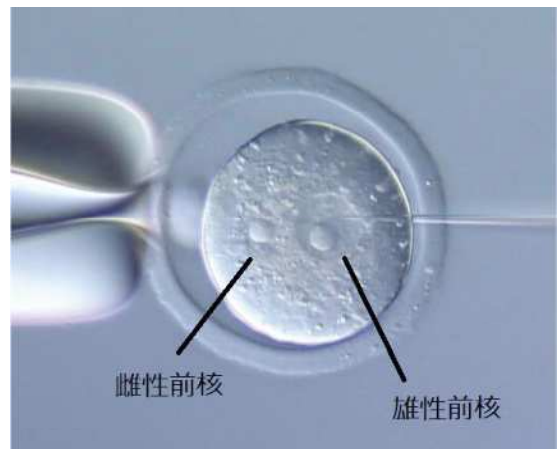


図1. マイクロキャピラリーによるマウス受精卵へのDNA注入
左側の太いガラスキャピラリーは、内部を陰圧することで受精卵の保持に使用している。右側の細いガラスキャピラリーはDNA注入用であり、先端部を受精卵の雄性前核に差し込んでDNA溶液を注入する。

ザンプロット解析したところ、うち2個体で注入されたプラスミドDNAが保持されていることが分った。この2年後には、米国のPalmiter博士やBrinster博士らによるラット成長ホルモンのTGマウスの作製が報告された[2]。このTGマウスは、導入されたラット成長ホルモンの作用によって通常の大きさの約2倍のジャイアントマウスに成長した。人工的に導入した外来DNAがマウス生体内でも機能しうることを初めて示した研究であった。この研究成果は、家畜を望ましい形質へ変えるなど、産業面での応用へとつながった。

3. 胚の培養技術について

胚体外で培養したマウス胚に由来する産仔の獲得が成功したとの報告は、1858年に英国のMcLaren博士とBiggers博士によってなされた[3]。受精後2.5日の胚(8細胞期)を二日間試験管内で培養することで、胚盤胞へと成長させることに成功した。胚盤胞を仮親マウスへ移植し、出生直前の段階での生存率を調べた。自然条件で発育した胚盤胞(妊娠したマウスの子宮から採取した胚盤胞)65個を別個体の子宮へ移植して発育させた結果、15個の個体を得ることができた。一方で、試験管内で培養した胚盤胞98個を移植した実験では、19個の個体を得ることができた。出生直前までの発生率は、自然発生した胚盤胞で23%、試験管培養した胚盤胞で19%であり、遜色ない結果となった。McLaren博士とBiggers博士によって開発された胚の試験管培養法は、今日ではマウスを含む動物の生殖工学だけでなく、ヒトの不妊治療にも欠かせない技術の一つとなっている。

4. ノックアウトマウスの作製の歴史

2万以上あるとされるマウスの遺伝子のうちの特定の遺伝子を欠損させるのはたやすいことではない。このため、TGマウスに比べてKOマウスの作製は困難であった。遺伝子工学と幹細胞生物学の2つのブレークスルーがKOマウスの作製に大きく貢献しており、本稿ではそれについて紹介したい。

4-1. 胚性幹(embryonic stem, ES)細胞の樹立

先行研究によって、少なくとも着床直後までのマウスの初期胚の中には、分化の多能性を維持している細胞が存在していることが分っていたが[4]、そ

の細胞の単離と培養には成功していなかった。1981年、Evans博士とKaufman博士は、マウス胚盤胞から多能性幹細胞を単離することに成功した[5]。成功の秘訣は以下の3つだったと彼らは述べている。(1)多能性幹細胞の樹立に適したマウス胚の発生ステージを明らかにしたこと、(2)十分な数の前駆細胞(胚)を集めて実験を進めたこと、(3)分化を抑制し、かつ増殖を促進するような培養条件を確立したこと。それまでは、胚性の多能性幹細胞はカルシノーマと呼ばれる癌化した細胞(の塊)からしか樹立できていなかった。このため、ES細胞は正常な胚から初めて樹立された多能性幹細胞であった。ES細胞は長期間培養しても多能性を失わず、マウス胚に移植すると様々な組織に分化してキメラマウスを作ることができる(図2)。この性質を利用してKOマウスを作る。すなわち、ES細胞を未分化状態で培養しながら遺伝子を改変する。遺伝子を改変したES細胞をレシピエント胚に移植し、キメラマウスを作製する。通常ES細胞は黒色あるいはドブネズミ色のマウスに由来する。このため、ES細胞をアルビノマウスに移植したときのキメラマウスの体色を見れば、ES細胞の寄与率を判定することができる。ES細胞の寄与率が高いキメラマウスでは、ES細胞に由来した配偶子を産生し、次世代では目的のKOマウスができるというやり方である(図2)。

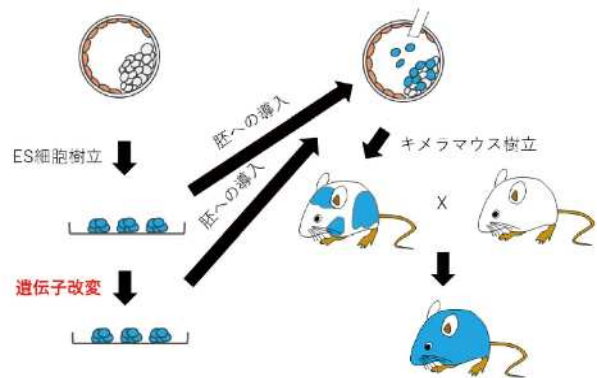


図2. ES細胞を用いたキメラマウスの作製方法
現在では様々なマウス系統に由来するES細胞を入手することが可能である。また、自分たちで胚盤胞からES細胞を樹立することもできる。今日では培地組成などが最適化されており、さほど困難なくES細胞を樹立することもできる。ES細胞をレシピエントの初期胚(8細胞から胚盤胞)に導入し、仮親の子宮に移植すると、仮親由来の細胞とES細胞由来の細胞からなるキメラマウスができる。移植の前にES細胞に遺伝子変異を導入しておけば、変異を持つ細胞を有するキメラマウスができる。ES細胞の寄与率が高いキメラマウスではES細胞由来の配偶子を産生しているため、次世代に変異が伝わる。

4-2. 特定の遺伝子を狙い撃ちする技術

TG マウスの作製 (図1) では、外来遺伝子がホストゲノムに何コピー組み込まれるのか、ホストゲノムのどの部分に組み込まれるのかなどを制御することができない。一方 KO マウスの作製では、2万以上あるとされるマウスの遺伝子の特定の一つだけを破壊しなければならないため、様々な工夫が盛り込まれている。外来 DNA がホストのゲノムに組み込まれるときには二つのパターンがある。一つは非同相末端結合 (non-homologous end joining, NHEJ) である。NHEJ は DNA 二本鎖切断において切断末端同士が連結される形での修復である。TG マウスにおける外来遺伝子の組み込みは NHEJ によるものが大半である。NHEJ がホストゲノムのどこで起きるのかを制御することは不可能である。もう一つの組換えのパターンは相同組換え (homologous recombination, HR) である。HR は DNA 切断の修復経路の一つであり、損傷した DNA と相同な配列を利用して修復をおこなう。減数分裂の際の相同染色体間の遺伝子組換えはこの経路を利用する。

一般的に哺乳類の細胞では、外来 DNA は HR よりも NHEJ による組換えで取り込まれるケースが殆どであるため、挿入される宿主ゲノムの場所を制御することが難しい。このため KO マウスの作製では、外来 DNA をなるべく HR によって導入させるような創意工夫がなされている。図3に KO マウス作製で一般的に使われている外来 DNA (ターゲティングベクターという) の模式図を示す。ターゲティングベクターは、薬剤耐性遺伝子を含み、ベクターが組み込まれた細胞が薬剤に耐性になるようにデザインされている。図3の場合はネオマイシン耐性遺伝子で、この遺伝子があれば G418 などのタンパク質合成阻害剤の存在下でも生存が可能になる (ポジティブセレクション)。HR の頻度を上げる目的で、薬剤耐性遺伝子の 5' 側と 3' 側に標的とするゲノム配列と相同な配列を持たせる。相同配列が長ければ長いほど HR が起き易くなると考えられる。このターゲティングベクターには、NHEJ によって遺伝子が挿入された細胞を除外する目的で、チミジンキナーゼ遺伝子 (Tk) をつなげてある。Tk はガンシクロビルを DNA 合成阻害剤であるガンシクロビル-3リン酸に変えるため、Tk を有する細胞はガンシクロビル存在下で増殖できない (ネガティブセレクション)。

HR では相同配列の外側の Tk 配列はゲノムに組み込まれないため、正しく組換えを起こした細胞はガンシクロビル存在下でも増殖できる。

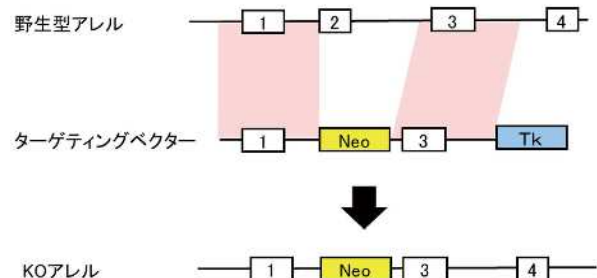


図3. 典型的なターゲティングベクターの構成
Neoは薬剤耐性遺伝子。Neoの5'側と3'側には、標的ゲノムと相同な配列（赤色）をつなげている。さらに相同配列の外側（5'でも3'どちらでも良い）には、ネガティブセレクションに使用するための遺伝子 (Tk) をつなげている。四角はエクソンとその番号を示しており、このターゲティングベクターはエクソン2をNeoで置き換えるようにデザインされている。

Mansourらは1988年に、最初のKOマウスを報告した [6]。この論文では、およそ 3×10^7 個のES細胞から4クローンの組み換え体ES細胞の単離に成功している。このようにして開発されたポジティブ・ネガティブセレクション法は一般的にどの遺伝子に対しても適用できるようになり、世界中の研究者に広まった。2007年には、遺伝子組換え技術を開発したCapecchi博士とSmithies博士、ES細胞を樹立したEvans博士の3人にノーベル医学生理学賞が与えられた。

5. CRISPR/Casによるゲノム編集によるKOマウスの作製

上述の方法によるKOマウス作製では、1) ターゲティングベクターの構築 (サイズが大きい)、2) 正しく組換えを起こしたES細胞の取得 (4'でも述べたようにHRの頻度は極めて低い)、3) ES細胞の寄与率が高いキメラマウスの取得、などいくつかのハードルを超えなければならない。また、もしこれらを順調にクリアしたとしても、実験開始からKOマウスを獲るまでは最低1年はかかってしまう。

近年、細菌の獲得免疫機構に働くCRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats CRISPR-Associated Proteins 9) を用いたゲノム編集がマウスの受精卵をはじめとして様々な動物や細胞種などで実用化されている [7-9]。現在、

普及している CRISPR/Cas9 システムは① *Streptococcus pyogenes* 由来の Cas9 ヌクレアーゼ (SpCas9) と② 標的配列を認識する CRISPR RNA (crRNA) とトランス活性化型 CRISPR RNA (tracrRNA) の複合体であるガイド RNA (sgRNA) から構成される。20塩基の標的配列を含む sgRNA により誘導された SpCas9 は近隣のプロトスペーサー隣接配列 (PAM) の直前の DNA を切断する。切断された DNA は NHEJ および HR により修復を受け、その際に本稿 4-2 で記した特定の遺伝子を狙い撃ちする技術を応用することにより、任意の配列にゲノムを編集することができる。具体的には、KO マウスの作製は、標的の遺伝子をはさんで設計した2種類の sgRNA により2ヶ所のゲノムを切断し、はさまれた領域を欠失させることで標的遺伝子をノックアウトする (図 4A)。また、任意の配列をゲノムに挿入するノックインマウスを作製する場合には、標的の sgRNA に加えてドナーとなる DNA を同時に導入することにより、任意の配列をゲノムへ挿入することが可能である。我々は、1種類の sgRNA の導入により、タンパク質をコードする配列へ終始コドンを含む配列をノックインすることで、効率良く遺伝子機能を破壊する KO マウスの作製方法を開発している (図 4B)。また、標的遺伝子をはさんで loxP 配列を2ヶ所に挿入して flox マウスを作製することにより、Cre-loxP システムによる組織特異的な遺伝子のノックアウトが可能である (図 4C)。

6. エレクトロポレーション法によるゲノム編集の効率化

マウス受精卵へ SpCas9 および sgRNA、ドナー DNA を導入する方法は大きく分けて2種類の方法がある。1つ目は、ガラスキャピラリーによるマイクロインジェクション法である。この方法は、熟練の技術と専用の設備が必要であるが、ドナー DNA としてプラスミドなどの長鎖 DNA を受精卵に導入することができる利点がある。2つ目は、電氣的に穿孔した受精卵にゲノム編集ツールを導入する受精卵エレクトロポレーション法である [10,11]。この方法は一般的なエレクトロポレーションの装置を用いて行うことができ、操作が簡単で、受精卵へのダメージが少なく、高効率でゲノム編集された産仔を得ることができる。

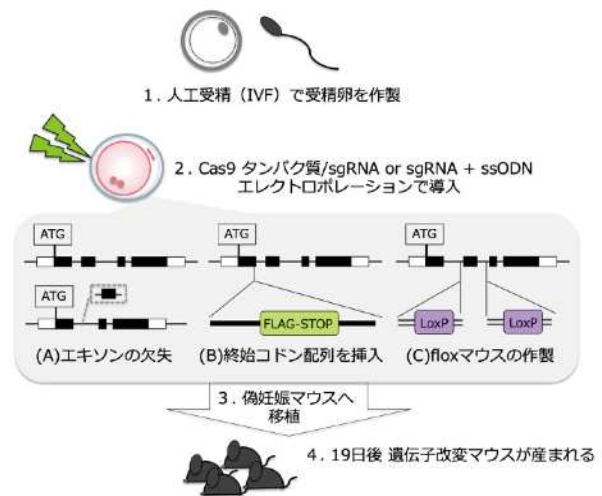


図4. エレクトロポレーション法によるゲノム編集マウスの作製

はじめに、人工授精により受精卵を得る。受精後、約10時間後に Cas9 タンパク質と sgRNA (ノックインを実施する場合には ssODN を加える) を混合した溶液に受精卵を浸し、エレクトロポレーションを実施する。翌日、2細胞期に発生した受精卵を偽妊娠マウスの卵管に移植する。移植後19日目には遺伝子改変マウスが得られる。遺伝子機能を破壊する方法として以下の3つを実施している。(A) エキソンを欠損させてフレームシフト変異を生じさせる。(B) FLAG タグ配列などとともに終始コドン配列を挿入してタンパク質の翻訳を止める。(C) loxP 配列を2カ所に挿入した flox マウスを作製する。

CRISPR/Cas9 システムに必要な Cas9 タンパク質、sgRNA およびドナー DNA として使用する一本鎖 DNA (ssODN) は人工的に合成する受託作製が可能である。つまり、必要なすべての試薬が低コストで手軽に入手することができ、研究者は目的の配列をターゲットとする sgRNA を設計し、受託会社に crRNA をオーダーするのみで、ターゲティングベクターの構築などの作業は不要である。エレクトロポレーション法によりゲノム編集マウスを作製する工程は非常に簡便である。はじめに、過排卵処置をしたメスのマウスから卵子を採取し、オスの精子と人工授精 (in vitro fertilization : IVF) をすることにより受精卵を得る。その受精卵と、SpCas9 タンパク質、sgRNA およびドナーとなる ssODN を混合し、電極の間に整置して、エレクトロポレーションを実施する。翌日に2細胞期に発生が進んだ受精卵を偽妊娠マウスに移植する。ゲノム編集ツールの導入に要する実際の作業時間は5分程度で、移植後19日目には遺伝子改変マウスを得ることができる。従来の ES 細胞を用いた方法では1年程度の時間を要していたことを考えると、ゲノム編集による KO マウス

の作製がいかに革新的な技術であるかがわかる。現在、我々の研究室では、受精卵エレクトロポレーション法を導入して年間で数十系統の遺伝子改変マウスの作製に成功している。具体的には、マウスの性決定期に発現が上昇する遺伝子群をトランスクリプトーム解析により抽出して、候補となる20個の遺伝子のKOマウスを網羅的に作製し、性決定に異常を示すマウスをスクリーニングする実験を実施している。

7. エレクトロポレーション法によるゲノム編集の制限

エレクトロポレーション法でノックインのドナーに使用するssODNは、ゲノムに挿入する配列の前後に「のり」に相当する相同な配列を30から60塩基含んだ配列を合成する。現在、人工的に合成することができるssODNの長さは150塩基程度である。これはタンパク質の標識として利用されているHAタグ(27塩基)やFLAGタグ(24塩基)などのタグ配列を合成することができる長さである。標的のゲノム領域にこのタグ配列を挿入することで、目的のタンパク質とタグ配列が融合したタンパク質を発現させることができる。タグ配列を認識する抗体を使用することで、これまで検出できなかったタンパク質の発現や細胞内局在を調べることが可能である。

現在、ドナーDNAとして用いるssODNの人工合成できる長さが、ゲノム編集の応用の律速となっている。1000塩基程度の長鎖ssODNを合成することができればGFP(714塩基)などの蛍光タンパク質を標的のゲノム領域に挿入することができる。蛍光タンパク質を指標にして、簡便に目的のタンパク質の発現や細胞内局在を調べることができる。さらに長い配列を挿入することが可能となった場合には、遺伝子を発現させるためのプロモーター配列や目的の遺伝子そのものの配列をゲノムに挿入することにより、任意の遺伝子を発現させるTGマウスの作製が可能となる。現在、200塩基を超える長鎖ssODNを調整する方法がいくつか報告されており、長い配列のノックインマウスの作製に成功している[12]。しかしながら、それらの方法はいずれもssODNの収量が少ないことや、鋳型となるプラスミドを作製する工程が含まれるなどの問題点がある。より長いssODNが人工的に合成できるようになれば、遺伝

子改変マウスの利便性がさらに向上すると思われる。

一方で、現在ドナーDNAとして利用可能な短い配列で機能するアミノ酸やタンパク質の開発も進んでいる。例えば、小さなGFP断片と大きなGFP断片がフォールディングすることにより蛍光を発するsplit GFPの技術を応用して、小さなGFP断片(51塩基)をコードする配列を標的の遺伝子にノックインすることで目的のタンパク質を蛍光標識する方法などが報告されている[13]。今後、単独の短い配列で蛍光を発するタンパク質の開発や、タンパク質分解シグナルの付加により任意の時期や組織で目的のタンパク質を分解させる方法の開発など、ゲノム編集への利用に特化した技術の開発が期待される。

8. おわりに

KOマウスやTGマウスなどの遺伝子改変マウスは、分子生物学的な解析手法のひとつとして遺伝子機能の解明に大きく貢献してきた。一方で、遺伝子改変マウスの作製は、「宝探し」のような一面を有する。研究者は、ゲノム情報やトランスクリプトーム情報などの「宝の地図」をもとにして様々な仮説を立て、その仮説を立証するために遺伝子改変マウスを作製する。しかしながら、すべての遺伝子改変マウスが想定通りの表現型を示すわけではなく、思いも寄らない「宝」となる表現型を見出し、生物学的に重要な発見に繋がることがある。これまで、数え切れないほどの遺伝子改変マウスが作られてきているが、代表的なモデル生物であるマウスでさえ、機能未知の遺伝子やゲノム領域が未だに多く存在する。これらの遺伝子やゲノム領域には「宝」が隠されているかもしれないが、特筆すべき表現型が得られないリスクもある。現在、ゲノム編集技術の発展により、短期間で手軽に遺伝子改変マウスが作製できるようになり、「宝探し」を実施するリスクは大きく低減している。今後、長鎖ssODNの合成など工学的な技術開発も背景となり、ゲノム編集技術は様々な用途で応用されることが期待される。我々もその時流に便乗しつつ、果敢に「宝探し」に挑み、生命科学の発展に貢献したい。

参考文献

- [1] Gordon J. W. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 77, 7380 (1980).

- [2] Palmiter R. D. *et al.*, *Nature*, **300**, 611 (1982).
[3] McLaren A. and Biggers D. *Nature* **182**, 877 (1958).
[4] Gardner R. L. and Papaioannou V. E. in *The Early Development of Mammals* 107 – 132 (Cambridge University Press, 1975).
[5] Evans M. J. and Kaufman M. H. *Nature* **292**, 154 (1981).
[6] Mansour S. L. *et al.*, *Nature* **336**, 348 (1988).
[7] Cong L. *et al.*, *Science*, **339**, 819 (2013).
[8] Mali P. *et al.*, *Science*, **339**, 823 (2013).
[9] Tanihara F. *et al.*, *Sci Adv.* **14**, e1600803 (2016).
[10] Hashimoto M. *et al.*, *Sci Rep.* **11**, 11315 (2015).
[11] Hashimoto M. *et al.*, *Dev Biol.* **418**, 1 (2016).
[12] Yoshimi K. *et al.*, *Nat Commun* **7**, 10431 (2016).
[13] Kamiyama D. *et al.*, *Nat Commun* **7**, 11046 (2016).

