

人工ヌクレアーゼを応用したゲノム改変動物作製技術の開発

藤井 渉 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

awtrfj@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

はじめに

遺伝子ノックアウト (KO) 動物やノックイン (KI) 動物をはじめとするゲノム改変動物は、ゲノム配列情報の機能を個体レベルで解析する上で有効なツールであり、農学分野をはじめとする生命科学研究分野に大きく貢献してきた。畜産分野では、集団遺伝学や順遺伝学的なアプローチによって、有用な経済形質と相関する多くの多型情報が蓄積されてきたが、それぞれについてゲノム改変をはじめとする逆遺伝学的なアプローチによって具体的な分子機構への影響を検証することで、形質との因果関係を明らかにすることができる。また、対象の形質がどのような分子機序によって制御されているかを明らかにすることで、育種への新たな観点や有用形質の作出技術への知見を提供することができると期待される。近年ではゲノム改変動物による疾患モデル動物やアニマルリアクターなどの応用も進められており、ゲノム改変動物の有用性は拡大している。

一方で、哺乳動物でゲノム改変個体を作製するには、ジーンターゲットングによる従来法ではコストや時間を要するうえ、個体作製に至るまでの実験系の技術習熟にも時間がかかる。また、従来法が利用できる動物種は限定されているため、ゲノム改変動物を汎用的なツールとして利用するには多くの課題が存在する状況であった。このような従来法に対する新たなゲノム改変技術として、人工ヌクレアーゼが登場した。人工ヌクレアーゼは細胞内で任意の座位に DNA2 本鎖切断 (DSB) を導入することができる人工的な制限酵素であり、DNA 修復機構のエラーによる KO や外来配列との相同組換えによる KI が可能である。人工ヌクレアーゼによるゲノム改変効率は従来法と比較して極めて高く、受精卵において直接ゲノム改変が可能であることが報告され、ゲノム改変動物の作製が加速化されると期待された。

そこで我々は、人工ヌクレアーゼ技術によるゲノム改変動物作製技術に着目し、汎用性の拡大のための開発と応用に取り組んできた¹⁻⁵。以下に、これまでの報告について概説する。

1. ジンクフィンガーヌクレアーゼの新規構築システムの開発と応用

人工ヌクレアーゼ研究分野の黎明期では、DNA 結合モチーフであるジンクフィンガー (ZF) と DNA 切断ユニットを連結したジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) が利用されており、ZF の組み合わせを変更することで任意の座位を標的とすることができた。しかし、任意の標的配列に対する ZFN の作製には数週間から数ヶ月の期間を要し、既製品も高価 (数十万~数百万円) であったことから、汎用的な技術とは言い難い状況であった。そこで我々は、overlap-extension PCR 法と TA-cloning 法を組み合わせ、ZFN 発現コンストラクトの新たな構築法を確立した⁶。OLTA (OverLap extension PCR and TA-cloning)法と名付けたこの方法を利用することで、多様な ZFN 発現コンストラクトをわずか3日で安価に効率よく作製することが可能となったうえ、OLTA法をゲノム改変個体の作製に応用することで、わずか1ヶ月でKOマウスの作製が可能となった⁶。加えて、OLTA法によって多様なZFNセットを作製し検討する過程で、既報のZFNと比較して極

めて改変効率の高い ZFN セットを発見した⁷。この ZFN セットは受精卵のみならず培養細胞内でも同様に高い改変効率が認められたため、今後の ZF を利用した人工酵素の開発に貢献すると期待される。

2. 受精卵で高機能な CRISPR/Cas システムの開発と応用

2013 年に新たな人工ヌクレアーゼとして報告された CRISPR/Cas システムについて、受精卵への応用にいち早く取り組み、マウス受精卵内で高効率に機能するツールの開発に成功し、極めて高効率にゲノム改変マウスの作製が可能であることを報告した⁸。この報告は CRISPR/Cas によるゲノム改変としては本邦初の報告であり、また、CRISPR/Cas を利用して作製したゲノム改変個体の変異アレルが正常に次世代へ伝達されることを確認した初めての報告であった。また、複数座位への標的設計が簡便であることを生かし、同一染色体上の 2 座位を同時に破壊することで任意の領域を欠失した個体の作製が可能であることを明らかにし、人工ヌクレアーゼによって作製可能なゲノム改変パターンの幅広い応用可能性を示した⁸。更に、このツールによってマウス受精卵内で同時に 3 ヶ所の座位をバイアレルに破壊できることや、従来法によって作製された各遺伝子のシングル KO マウスと同等の表現型を示すことを確認し、複数遺伝子に対する効率的な逆遺伝学的解析に利用できることを報告した⁹。現在このツールは、国内外の 100 を超える研究グループによって導入され利用されている。また、このような効率的な KO 動物作製法を生かして、マウス以外の動物種への応用を行うとともに¹⁰、疾患関連遺伝子についての逆遺伝学的検討や¹¹、疾患モデル動物の作製への応用例を報告した¹²。

3. オフセットニックング法によるゲノム改変マウスの作製

前述の報告⁸では、CRISPR/Cas は高効率な改変が可能である一方、高濃度で処理した場合、受精卵でもオフターゲット変異が起こりうる事が明らかとなった。そこで、通常の新クレアーゼではなくニックアーゼ活性を発揮する Cas9 変異体を利用した、オフセットニックング法が受精卵でのゲノム改変に応用可能であるかを検討した。野生型 Cas9 ではオフターゲット変異が認められた座位に対して実施したところ、オフターゲット変異を回避しつつ高効率にゲノム改変が可能であることが明らかとなった¹³。加えて、オフセットニックング法を利用して高効率に領域欠失マウスや KI マウスを作製できることも確認した¹³。

4. オーソログ CRISPR/Cas によるゲノム改変マウスの作製

従来用いられている *S. pyogenes* 由来の CRISPR/Cas は 5'-NGG という DNA 配列が存在する座位のみで活性を発揮することができるが、そのほかの原核生物に由来するオーソログ CRISPR の中には異なる配列を認識し活性を発揮するものが報告されている。我々は、その中の一つである *S. thermophilus* 由来のオーソログ CRISPR を利用し、従来のものと同様に受精卵で高効率にゲノム改変可能であることが明らかとなった¹⁴。さらに、このツールを利用し、従来の CRISPR/Cas を利用することができない座位に対して塩基置換を導入した KI マウスの作製が可能であることを報告した¹⁴。

5. 単一プロモーターによる CRISPR/Cas 発現誘導デバイスの開発

CRISPR/Cas の構成要素である Cas9 や gRNA は、本来であれば異なる複数のプロモーターを介

してそれぞれを発現誘導する必要があった。特に、gRNA についてはユビキタスな発現を行う RNA polymerase III 型プロモーターしか利用できなかったため、精密な発現制御が困難であった。そこで我々は、リボザイムによる転写後の RNA 切断反応を利用することで、RNA polymerase II 型の単一プロモーターによって複数の gRNA と機能的な Cas9 を同時に発現誘導することができるツールを開発した¹⁵。このツールに組織特異的なプロモーターを組み合わせることで組織特異的に CRISPR/Cas が発現するトランスジェニック個体の作製が可能であるため、コンディショナル KO 個体の簡便な作製法へ応用できると期待される。

今後の展望

以上のように、人工ヌクレアーゼ技術の発展によって、これまでは困難であったゲノム改変動物による逆遺伝学的研究は今や普遍的になりつつある¹⁶。さらに、ゲノムワイドな逆遺伝学的スクリーニング技術やゲノム配列を改変せずエピジェネティックな改変を行う技術の開発も進められている¹⁷。加えて最近では、我々の生活により身近な応用技術として、生態系の改変技術であるジーンドライブへの応用や、遺伝子組換え体の経済動物としての利用可能性などが検討されつつある。このような応用技術については科学的知見に基づいた安全性についての議論だけではなく、社会からの視点を取り入れたより多角的な議論が不可欠である。従って、今後は自然科学を専門とする研究者だけでなく、人文・社会科学系の農学研究者も参加した“オール農学”体制で議論を進めていくことが必要であると思われる。また、今後の実践的な逆遺伝学的技術開発の展望としては、現在の人工ヌクレアーゼによる部分的なゲノム改変から、人工リコンビナーゼなどを利用した大規模領域の正確な置換、さらには人工合成した DNA を用いたゲノムの再構成へと進んでいくと予想される。このようなより大規模なゲノム改変技術の開発には、人工ヌクレアーゼ開発によって蓄積された知見が貢献すると思われる。より高度化したゲノム改変ツールを利用することで、ゲノム配列情報と個体レベルの形質との関係の理解や操作への応用が進み、農学分野をはじめとする生命科学分野の発展に貢献していくことが期待される。

謝辞

本賞の受賞におきましては、公益社団法人日本畜産学会よりご推薦いただきました。小泉聖一理事長をはじめ関係する先生方や事務局の皆様には厚く御礼申し上げます。合わせて、本賞に関する研究の遂行にご協力いただきました共同研究者の方々に心より感謝申し上げます。本賞に関わる研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科・応用動物科学専攻・応用遺伝学研究室で実施しました。内藤邦彦教授や研究室員の方々のご指導やご協力に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 藤井渉. JSICR Newsletter 36: 22-26. (2013)
- 2) 藤井渉. JSICR Newsletter 38: 36-42. (2014)
- 3) 藤井渉. JSI Newsletter 22: 29. (2014)
- 4) 藤井渉. 医学のあゆみ 252: 2 159-163. (2015)
- 5) 藤井渉. 進化するゲノム編集技術. 133-141. (2015)
- 6) Fujii W, Kano K, Sugiura K, Naito K. PLoS One. 8: e59801. (2013)
- 7) Fujii W, Onuma A, Yoshioka S, Nagashima K, Sugiura K, Naito K. J Reprod Dev. 61: 589-93. (2015)

- 8) Fujii W, Kawasaki K, Sugiura K, Naito K. *Nucleic Acids Res.* 41: e187. (2013)
- 9) Fujii W, Onuma A, Sugiura K, Naito K. *J Reprod Dev.* 60: 324-7. (2014)
- 10) Onuma A, Fujii W, Sugiura K, Naito K. *J Reprod Dev.* (2016)
- 11) Maruyama S, Ito M, Ikami Y, Okitsu Y, Ito C, Toshimori K, Fujii W, Yogo K. *Sci Rep.* 6: 36468. (2016)
- 12) Nakamura K, Fujii W, Tsuboi M, Tanihata J, Teramoto N, Takeuchi S, Naito K, Yamanouchi K, Nishihara M. *Sci Rep.* 4:5635. (2014)
- 13) Fujii W, Onuma A, Sugiura K, Naito K *Biochem Biophys Res Commun.* 445:791-4. (2014)
- 14) Fujii W, Kakuta S, Yoshioka S, Kyuwa S, Sugiura K, Naito K *Biochem Biophys Res Commun.* 477(3): 473-6. (2016)
- 15) Yoshioka S, Fujii W, Ogawa T, Sugiura K, Naito K *Sci. Rep.* 5: 18341. (2015)
- 16) 藤井渉. *化学と生物.* 54: 568-74. (2016)
- 17) 藤井渉, 角田茂. *JSICR Newsletter* 41: 8-14. (2016)