

【総説】

遺伝子改変マウスの作製法と改良遺伝子トラップ法を用いた遺伝子の解析

Generation of Genetically Engineered Mice and a Gene Trap Method

金沢大学学際科学実験センター遺伝子改変動物学
(実験動物研究施設)

成 瀬 智 恵

はじめに

遺伝子改変動物は今日の医学研究に無くてはならないものとなっている。1980年にGordonらにより、マウス受精卵の前核にDNAを注入する方法を用いたトランスジェニックマウスが作製され¹⁾、個体におけるgain of functionの研究が可能になった。その後、胚性幹(ES)細胞を用いたトランスジェネシスおよび遺伝子ターゲティングが可能になり、1989年に相同組換えによる遺伝子変異ES細胞を用いた初めての遺伝子ノックアウトマウスが報告され²⁾、loss of functionの研究も可能になった。これらの技術は目的とする遺伝子が既知の場合には有力なツールとなるが、特定の機能を持つ遺伝子あるいは遺伝子群が未知の場合の遺伝子探索には使用できない。そこで考案されたのが遺伝子トラップ法である。また、ES細胞を用いた遺伝子ノックアウトマウスの作製は熟練が必要であり時間もかかるという欠点があった。しかし、今日、様々な「ゲノム編集」ツールが考案されており、マウスだけでなく、ES細胞の扱いが困難な各種動物や、これまで遺伝子変異を導入するのが困難であった細胞において遺伝子組換えを起こすことが容易にできるようになってきている。今年報告されたCRISPR/Cas9システム^{3,4)}によって、今後遺伝子改変動物の作製が加速すると考えられる。本稿では特にマウスにおける遺伝子改変方法を、著者らが行ってきた改良遺伝子トラップ法を含めて紹介したい。

トランスジェニックマウス、遺伝子ノックアウトマウス、
遺伝子トラップ変異マウス

【トランスジェニックマウス】

トランスジェニックマウスの作製期間は3つの方法の中で最も短い。作製に熟練が必要ではあるが日本SLCなどの業者に作製を外注することも可能である。トランスジェニックマウスを作製するためには、遺伝子を発現させたい細胞や組織で特異的に発現する遺伝子のプロモーター、エンハンサーに目的の遺伝子をつないだDNA断片を受精卵の雄性前核に注入する。DNA断片がランダムにゲノムに挿入されたマウスがトランスジェニックマウスである。しかしながら、すべてのマウスで目的の細胞や組織で発現するとは限らない。目的の場所・時期に確実に発現させるためには、遺伝子ノックアウトマウス

を応用した遺伝子ノックインマウスの方が適している。

【遺伝子ノックアウトマウス】

遺伝子ノックアウトマウスを作製するためには、破壊したい遺伝子部位(開始コドンまたは活性部位であることが多い)を薬剤耐性マーカーに置き換えた10kbp程度のDNA断片を、相同組換えによりES細胞に導入する。相同組換えが起こる状況は、おそらくDNA複製が頻繁に起こる状況に限られていると考えられるので、受精卵にDNA断片を注入しても相同組換えが起こらない。そこで、速い速度で細胞分裂を起こすES細胞を使用する必要がある。ベクターに点突然変異や蛍光タンパク質などを導入しておき、ES細胞に点突然変異を導入したり、内在性タンパク質の発現を忠実に再現して蛍光タンパク質が発現するようなノックインES細胞を作製したりすることも可能である。相同組換えが起こったES細胞よりマウスを作製するが、ES細胞だけでは胎盤を含めた胚外組織を形成できないのでホストとなる胚と接触させ、キメラ動物を作る必要がある。ES細胞を扱う必要があるため、遺伝子ノックアウトマウスの作製には時間がかかりおよそ半年、実験群を得るまで約1年かかることもある。

【遺伝子トラップ変異マウス】

遺伝子ノックアウトマウスの作製技術により、1990年以降、マウスを使用した論文が劇的に増加した。遺伝子ノックアウトマウスは強力なツールであるが、当時、数万から十万個ほどもあると考えられていた遺伝子を全てノックアウトすることは困難であると考えられていた。また、遺伝子同士の相補性のため、1つの遺伝子を破壊しただけでは表現型が現れないことも多かった。そこで、表現型から遺伝子を単離し、同時に遺伝子ノックアウトマウスも得られる方法として開発されたのが遺伝子トラップ法である(図1)。遺伝子トラップ法では、5'側のスプライスアクセプターに遺伝子発現モニター(LacZ、蛍光タンパク質など)と薬剤耐性マーカー、ポリA付加シグナルをつないだDNA断片を、エレクトロポレーションまたはウイルスベクターなどを利用してES細胞に導入する。遺伝子ノックアウトとは異なりトランスジェニックマウスと同じランダム挿入だが、ベクターにはプロモーターがなく、遺伝子のイントロンに挿入されて、かつその遺伝子の本来の発現があるときのみ遺伝子発現モニターと薬剤耐性マーカーが発現する。よって、薬剤によ

る選別によって遺伝子を「トラップ」されたES細胞のみを選別することが可能である。それぞれのES細胞においてトラップされた遺伝子は5' RACEやinverse PCRによって容易に同定することができる。また、遺伝子発現モニターを利用してトラップした遺伝子の発現パターンを細胞レベルで観察することが可能である。さらに、遺伝子トラップベクターの3'側にはポリA付加シグナルがあるため、遺伝子トラップベクターの挿入部位よりも下流のエクソンは転写されず遺伝子破壊ができる。この方法により簡便に遺伝子変異ES細胞が得られるようになったことから国際遺伝子トラップコンソーシアム (International Gene Trap Consortium : IGTC) が立ち上がり、全遺伝子を網羅することを目標とした遺伝子トラップ変異ES細胞のライブラリーが作製されている。10月6日現在126,189クローンの遺伝子変異細胞が得られ、10,924コーディング遺伝子をカバーしており、研究目的であれば誰でも分与を受けることができる (<http://www.genetrap.org/>)。

2000年以降、DNAシークエンスの高速化、シークエンスデータ処理技術の発達によって、様々な生物の全ゲノム配列が公表されるようになった。2001年にヒト全ゲノムの概要版が発表され、翌年2002年にはマウス全ゲノムの概要版が発表された。マウスの遺伝子は約2, 3万個

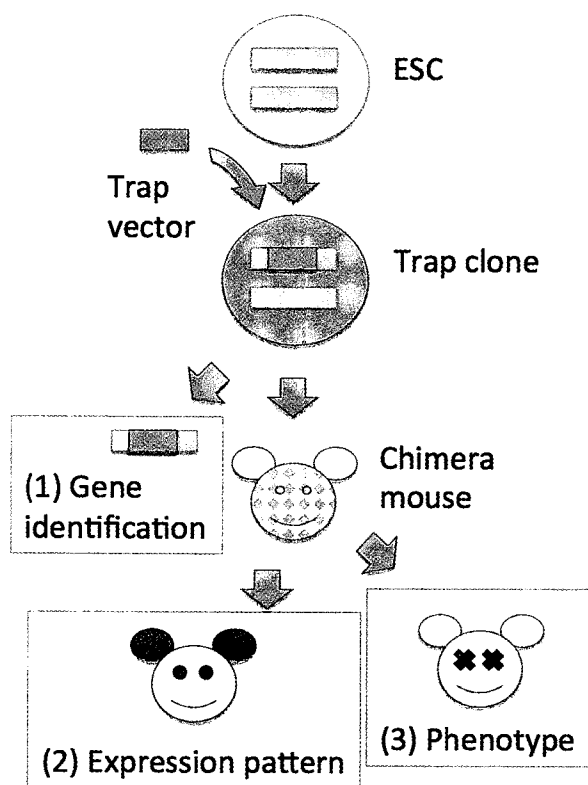


図1 遺伝子トラップ法の概略

ES細胞のある遺伝子にトラップベクターが挿入された場合の解析の模式図。(1) 遺伝子トラップ変異ES細胞クローンよりDNAを抽出してトラップされた遺伝子の同定が可能である。また、ES細胞よりキメラマウスを作製し、(2) 発現マーカーによる発現パターンの解析、(3) および表現型の解析が可能である。

と見積もられ、全ての遺伝子をノックアウトすることが非現実的なことではなくなった。細胞や組織特異的なコンディショナルノックアウトマウスの需要が増加していること、遺伝子トラップによる破壊は必ずしもタンパク質を失活させないことから、現在では、国際ノックアウトマウスコンソーシアム (International Knockout Mouse Consortium : IKMC) により単純ノックアウトおよびコンディショナルノックアウトES細胞ライブラリーが構築されている。10月6日現在5,455遺伝子の単純ノックアウトES細胞、11,135遺伝子のコンディショナルノックアウトES細胞があり、650系統の単純ノックアウトマウス、1,693系統のコンディショナルノックアウトマウスも既に作製されている (<http://www.knockoutmouse.org/>)。よって、破壊したい遺伝子のノックアウトES細胞は既にどこかに存在しており、オンラインで検索、注文してES細胞を入手するだけで比較的容易に遺伝子ノックアウトマウスを得ることができる時代になっている。

表現型から遺伝子へ—遺伝子トラップ法を用いた順遺伝学

遺伝子トラップ法は表現型から原因遺伝子を同定する順遺伝学 (forward genetics) の手法として用いられることに大きな利点がある。遺伝子を破壊することで現れる表現型を解析する逆遺伝学 (reverse genetics) に対して、表現型から原因遺伝子を同定する順遺伝学は本来の遺伝学の手法であり、これまでに自然発生突然変異マウスだけでなく、X線誘導突然変異マウスやエチルニトロソウレア (ENU) 突然変異マウスなど積極的にゲノムに突然変異を起こして様々な疾患関連遺伝子が同定された。しかしながら、これらの方法は原因遺伝子を同定することが困難であることが多い。その点、遺伝子トラップ法を用いると原因遺伝子が容易に同定できる。

我々はこれまで遺伝子トラップ法を用いたマウスの体軸形成に重要な機能を持つ因子の探索と遺伝子改変マウスを用いた機能解析を行ってきた。マウスの前後軸に沿った形態形成には、まず前方および後方に特異的な因子が発現し、その後原腸陥入によって中胚葉が形成されて中胚葉由来の脊索、体節が形成され、体節が分化して脊椎ができるという過程を経る。初めに液性因子を用いた遺伝子トラップ法を用いてEphA2変異マウスを作製し、EphA2が脊索の後方への伸長に必要であることを明らかにした⁵⁾。しかしながら、液性因子による遺伝子トラップクローンのスクリーニングは遺伝子の絞り込みには不十分だったので、発生過程において転写因子により直接制御される遺伝子を単離するべく、アデノウイルスベクターで発現させた転写因子によるクローン選別を用いた改良遺伝子トラップ法を開発した。この方法を用いて体軸形成に機能する新規因子の探索を行い、Wilmus' tumor-1 Associating Protein (Wtap) を見いだした⁶⁾。Wtap変異胚においては胚の前方に発現する遺伝子の発現に変化は無かったものの、後方に発現し原腸陥入を誘

導する因子の発現が欠失し、Wtap変異細胞は中胚葉と内胚葉に分化する能力を失っていたことから、後方の決定と原腸陥入に必須であることを示した(図2)。さらに、ヒストン脱メチル化酵素について遺伝子変異マウスを複製して解析したところ、出生直後致死となり、さらに骨格形成、形態形成に必須な因子の発現制御に異常があることが明らかになった。脊椎の形態を決定するHox遺伝子領域のヒストン修飾を調べた結果、遺伝子発現を負に制御するヒストン修飾が遺伝子変異胚では残存しており、脱メチル化が効率よく行われていないことがわかった。ヒストン脱メチル化因子が直接遺伝子の転写を制御していることが示唆された。以上のように、遺伝子変異マウスを用いて新規体軸形成関連遺伝子の同定と機能解析を行ってきたが、遺伝子トラップクローンのスクリーニングの際には予想されなかった表現型がマウスで初めて現れることがしばしばあり、さらにスクリーニング方法に工夫が必要であると考えている。

Wtapなどと同様の改良遺伝子トラップ法により得られたHeterochromatin Protein 1 γ (HP1 γ) 変異マウスは、中胚葉形成時に発現が見られるものの、体軸形成には異常が認められなかった。しかしながら、HP1 γ 変異マウスは生殖細胞の増殖や、減数分裂の進行に異常を起こし、雌雄ともに不妊となった。HP1 γ 変異マウスでは始原生殖細胞の出現数は野生型と違いがないものの、細胞周期がG1期で停滞しp21陽性の細胞が増加していることがわかった。また、野生型支持細胞を用いた培養実験により、始原生殖細胞周辺組織ではなく始原生殖細胞そのもののHP1 γ の変異が原因であることを明らかにし

た⁷⁾。さらに、HP1 γ 変異マウスでは減数分裂のパキテン期に生殖細胞の発生が停止することがわかった。レプトテン期に相同染色体を検索する際に見られるセントロメアクラスターの数が減少しており、この時、HP1 γ 変異生殖細胞のセントロメア周辺ではジメチル化されたヒストンH3の9番目のリジン (H3K9me2) が減少していたが、対照的にH3K9me3は変化しなかったことから、HP1 γ は生殖細胞においてH3K9me3があるクロマチン領域にH3K9をジメチル化するG9aをリクルートすることで、相同染色体の検索に必要であることが示唆された⁸⁾。

順遺伝学的手法として遺伝子トラップ法を用いて、細胞のリプログラミングに必須の新規因子がHannaらにより報告されている⁹⁾。彼らはES細胞よりも少し分化が進んだ状態のエピプラスト幹細胞 (EpiSC) に遺伝子トラップベクターを導入してランダムに遺伝子を破壊した。これらの遺伝子トラップEpiSCクローンにiPS細胞に脱分化させるための4因子 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) を発現させ、脱分化が起こりにくいクローンを探索した結果、Utx遺伝子がトラップされたクローンでは脱分化が起こりにくくなっていることを発見した。UtxはH3K27特異的な脱メチル化酵素であり、遺伝子の転写を促進する機能を持つ。Utxが脱メチル化する遺伝子は脱分化に重要な遺伝子群であることや、H3K27のメチル化酵素Eedとのダブルノックアウトによりレスキューできることなどから、UtxがH3K27脱メチル化酵素活性依存的に細胞のリプログラミングを促進していることが明らかになった。

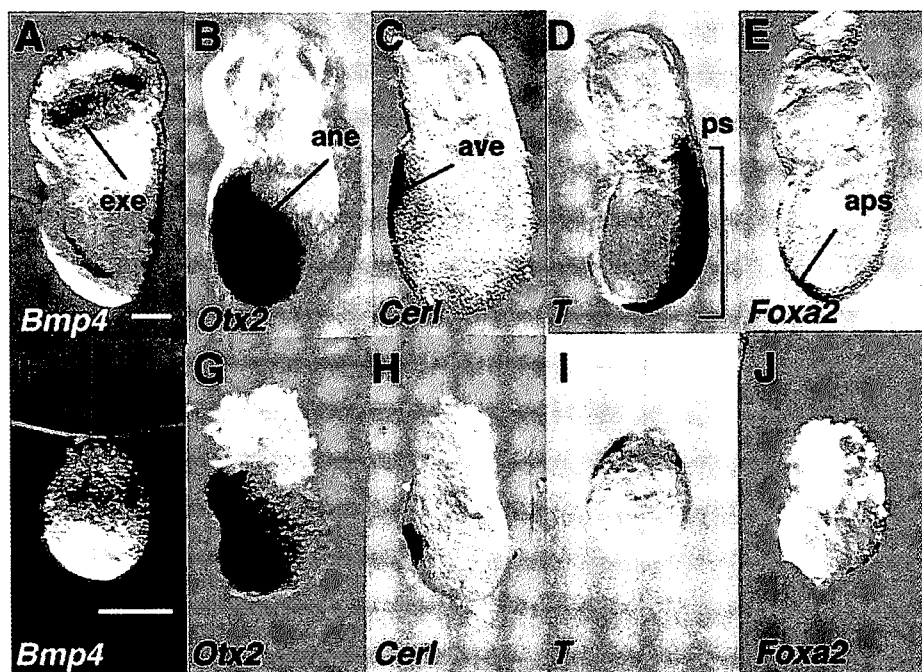


図2 Wtap変異胚におけるマーカー遺伝子の発現

(A-E)野生型胚、(F-J)Wtap変異胚における胚胎外(A, F)、前方(B-H)、後方(D-J)マーカー遺伝子の発現。ane: 前方神経外胚葉, ave: 前方臓側内胚葉, aps: 原条前側領域, exe: 胚胎外外胚葉, ps: 原条。Fukusumi et al., Dev Dyn 237: 618-629, 2008より。

ゲノム編集

近年、ES細胞以外の細胞にも突然変異を導入したり相同組換えを起こしたりすることができる技術として脚光を浴びているのがゲノム編集技術 (genome editing) である (図3)。

【ジンクフィンガーヌクレアーゼ】

最初に登場したジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) は、DNAに結合するジンクフィンガードメインとII型制限酵素Fok I由来のDNA切断ドメインから構成される人工酵素である。1つのジンクフィンガーがDNA3塩基を認識する。ZFNによるゲノム編集の特徴は、①ジンクフィンガーの組み合わせを変えることで様々なDNA配列を認識することができる。②DNA切断ドメインは二量体化することで初めてDNAを切断するので特異性が高い。③設計が多少難しく、設計込みでシグマアルドリッチ社の専売となっているので価格が高い。それでも近頃、後述する別の方法が開発されたため、価格は下がってきている。

【TALEN】

ZFNよりも設計が容易なゲノム編集ツールとして登場したのがTranscription activator-like effector nuclease (TALEN) である。DNA切断ドメインはZFNと同じくFok I由来であるが、DNA結合ドメインをジンクフィンガーでなく、植物病原菌Xanthomonas由来のTALEタンパク質に変更したものである。ZFNとの相違点は、1つのDNA結合モジュールがDNA1塩基を認識する点である。ZFNではジンクフィンガーの組み合わせによって塩基配列の認識がうまくいかないことがあるが、TALENではそのようなことがなく、特異性の高さも保たれている。TALEN作製キットはAddgene (<http://www.addgene.org/>) より配布されている。

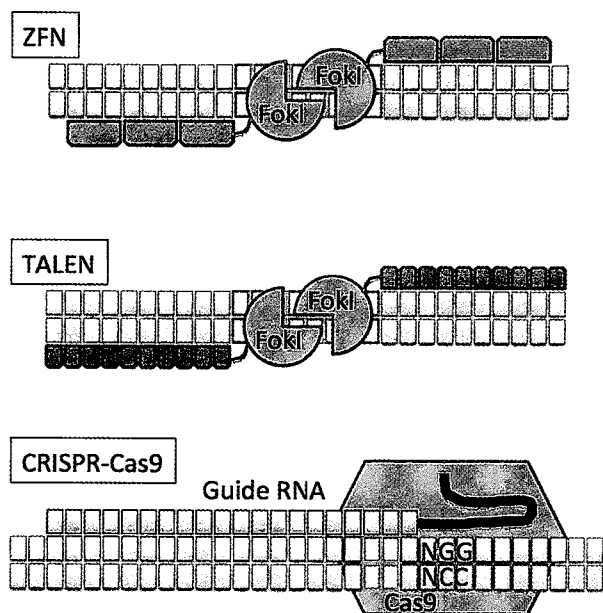


図3 ゲノム編集技術の模式図。二列に並んだブロックは二本鎖DNA、1つのブロックは1塩基を表す。

【CRISPR-Cas9】

2013年に報告され、次々と新しい技術が報告されているのがCRISPR-Cas9システムである。CRISPR-Casシステムは大腸菌や古細菌などの原核生物における一種の獲得免疫のシステムである。ウイルス由来の外来DNAが原核生物に侵入すると、初回はCasタンパク質によって分断され、CRISPR座位に組み込まれる。CRISPR座位に組み込まれたDNAはRNAとして転写され、同じ配列を持つDNAが次回侵入した際には、DNAエンドヌクレアーゼ活性を持った別のCasタンパク質が速やかに標的DNAにリクルートされて、外来DNAは破壊される。エンドヌクレアーゼ活性を持ったCas9タンパク質と、DNA配列にCas9をリクルートする20塩基のガイドRNA (gRNA) を同時に発現させると標的DNAが切断されることが、哺乳類、ゼブラフィッシュ、酵母、線虫などで既に確かめられている。CRISPR-Cas9システムの利点は、gRNAの設計が非常に容易なことである。Cas9およびgRNA発現ベクターもTALEN作製キットと同じくAddgeneから入手することができる。Cas9が切断するのに必要な配列はProto-spacer adjacent motif (PAM) と呼ばれる5'-NGG-3'の3塩基だけなので、切断したい領域の近傍にGGあるいはCCという配列がありさえすればどこでも標的として選ぶことができる。

CRISPR-Cas9システムの欠点は、前述のZFNやTALENは2種類の配列で切断位置を決定していたために特異性は高かったが、CRISPR-Cas9システムではDNA配列を規定するのが1種類の配列となるので、特異性が低くオフターゲット (標的以外の場所が切断されること) が頻繁に起こることである。特に、PAMから上流方向へ11~20塩基の塩基配列が一致しなくてもCas9がリクルートされ、DNAが切断されてしまうことがわかっている。この問題を回避するため、Cas9に点突然変異を導入し、DNA二本鎖切断活性を持つエンドヌクレアーゼではなく、一本鎖切断活性を持つニッカーゼに変えたCas9D10Aを用いる方法が報告されている¹⁰⁾。この方法では、DNAの切断位置を決定するgRNAを2種類必要にすることで特異性を高め、オフターゲットを除去することに成功している。また、受精卵においてCRISPR-Cas9システムを使用する限りオフターゲットはほとんど見られないという報告もある¹¹⁾。Jaenischらの報告によれば、受精卵にCRISPR-Cas9タンパク質を発現させた場合、生まれてきたマウスの50%程度が遺伝子変異マウスとなる¹²⁾。

これらの技術を用いることで目的遺伝子座に欠失や挿入といった変異 (これらを総称してindel mutationと呼ぶ) を導入することができるが、いずれも遺伝子配列特異的にDNAエンドヌクレアーゼをリクルートして切断することで起こる、非同末端結合 (non-homologous end joining : NHEJ) によるDNA修復の際のエラーを利用したものである。2カ所以上にindel mutationを起こすこ

とで数kbpに渡る欠失を起こすことも可能である。また、indel mutationを起こすだけでなく、DNAエンドヌクレアーゼと同時にオリゴDNAベクターを導入すれば、これまでの遺伝子ノックアウトマウス作製と同様に相同組換えを起こすことも可能である。

ES細胞を使用した相同組換えによる遺伝子変異マウス作製と、ゲノム編集を用いた相同組換えによる遺伝子変異マウス作製との大きな違いは、目的のマウスが得られるまでの速さである。これまでは遺伝子ターゲティングベクターの作製に2週間~1ヶ月以上、ES細胞のスクリーニングに1ヶ月、キメラマウスの作製に3ヶ月、遺伝子ノックアウトマウスができるまでにはベクター作製から約半年~1年かかるのが通常であった。CRISPR-Cas9システムを用いれば、ベクター作製はオリゴDNAを外注するだけなので10日、gRNA発現ベクターの作製と機能チェックに10日、受精卵へのマイクロインジェクションをすればその受精卵で遺伝子変異が起きるので、ES細胞のようにキメラマウスを作る必要がなく、うまくいけば両方の遺伝子座に変異が入ることもあるので、マイクロインジェクションから20日で、直接遺伝子ノックアウトマウスが得られる。合計40日程度で遺伝子ノックアウトマウスが得られるので、これまでの1/10程度に期間が短縮される。実際にはgRNAによって変異の導入効率には異なるので、片方の遺伝子座にしか変異が入らない場合や、2細胞期胚以降に変異が導入されてしまいモザイクになる場合もあり、40日で遺伝子変異マウスができるのはよほどうまく進んだ場合ではあるが、少なくともこれまでよりも劇的に遺伝子変異マウスの作製が容易で速くなることは間違いない。マウスだけでなく、様々な動物種あるいは細胞で使用されるようになるだろう。また、この方法を応用して、蛍光タンパク質やタグタンパク質などと内在性タンパク質の融合タンパク質を細胞内で発現させたり、点突然変異を導入してヒト疾患モデルを作製したりすることも既に行われている。今後、ゲノム編集を利用してますます研究が加速することが予想される。我々は実験動物研究施設として、できる限りこれらの技術を導入開発し、医学研究に貢献していきたいと考えている。

謝 辞

本総説執筆にあたり、御指導、助言を頂きました金沢大学学際科学実験センター遺伝子改変動物分野 浅野雅秀教授、本研究の技術面において助言、補助をしていただいた杉原一司技術専門職員に感謝いたします。

文 献

- 1) Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle HF. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 7380-7384, 1980
- 2) Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet* 7: 319-327, 2006
- 3) Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339: 819-823, 2013
- 4) Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339: 823-826, 2013
- 5) Naruse-Nakajima C, Asano M, Iwakura Y. Involvement of EphA2 in the formation of the tail notochord via interaction with ephrinA1. *Mech Dev* 102: 95-105, 2001
- 6) Fukusumi Y, Naruse C, Asano M. Wtp is required for differentiation of endoderm and mesoderm in the mouse embryo. *Dev Dyn* 237: 618-629, 2008
- 7) Abe K, Naruse C, Kato T, Nishiuchi T, Saitou M, Asano M. Loss of heterochromatin protein 1 gamma reduces the number of primordial germ cells via impaired cell cycle progression in mice. *Biol Reprod* 85: 1013-1024, 2011
- 8) Takada Y, Naruse C, Costa Y, Shirakawa T, Tachibana M, Sharif J, Kezuka-Shiotani F, Kakiuchi D, Masumoto H, Shinkai Y, Ohbo K, Peters AH, Turner JM, Asano M, Koseki H. HP1 γ links histone methylation marks to meiotic synapsis in mice. *Development* 138: 4207-4217, 2011
- 9) Mansour AA, Gafni O, Weinberger L, Zviran A, Ayyash M, Rais Y, Krupalnik V, Zerbib M, Amann-Zalcenstein D, Maza I, Geula S, Viukov S, Holtzman L, Pribluda A, Canaani E, Horn-Saban S, Amit I, Novershtern N, Hanna JH. The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming. *Nature* 488: 409-413, 2012
- 10) Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell* 154: 1380-1389, 2013
- 11) Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell* 154: 1370-1379, 2013
- 12) Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153: 910-918, 2013