

CRISPR/Cas でマウスゲノムを自在に操る

相田 知海, 田中 光一

1. ゲノム編集革命

次世代シーケンサーの登場により、ヒトを含めたさまざまな生物種に存在する、膨大な遺伝子配列の多様性が明らかになって久しい。しかし、そこから得られる情報がきわめて多様であるがゆえに、単に塩基配列を比較するだけでは、生命現象や疾患の因果関係を検証することは容易ではない。特定のゲノム配列を自在に改変する介入操作ができて、初めてゲノム配列多様性の意味するところを本当に理解できるのである。これまでも、胚性幹 (ES) 細胞を用いた一般的なノックアウトマウスの作製法、ランダム変異を導入した変異体ライブラリーからの目的遺伝子の変異体の単離など、特定の生物種や特定の遺伝子に対する変異体を単離する技術は存在した。しかし、あらゆる生物のゲノムに積極的かつ自在に遺伝子改変を導入する一般的な手段は長い間存在せず、ゲノム、さらにはその多様性を理解するための大きな障壁となっていた。

この障壁を克服するのが近年急速な発展を遂げているゲノム編集技術である¹⁾。ゲノム編集技術とは文字どおり、どのような生物・細胞の、どのようなゲノム配列であろうとも自在に改変することを実現した技術である。特定遺伝子の欠損、塩基置換、外来遺伝子の挿入、染色体欠損や転座等、ありとあらゆるゲノムの改変を可能にする技術である。ゲノム編集の基本原理は、任意の標的ゲノム部位にDNA二本鎖切断を誘導し、その後、切断されたDNA末端が細胞の持つDNA修復機構により修復される際に、塩基の欠損や挿入が起こるものである。DNA修復機構には主に2種類が存在し、このうち主要なDNA修復機構である非相同末端結合 (non-homologous end-joining, NHEJ) により修復される際には数塩基の塩基欠損・挿入が高頻度にかかる。このため、DNA二本鎖切断がタンパク質コード領域に起これば、フレームシフトによりストップコドンが生

成され、機能的なノックアウトが可能になる。もう一つのDNA修復機構は、テンプレートDNAに基づき、正確に修復する相同組換えである。テンプレートDNAを外部から供給することで、任意の塩基置換や外来遺伝子を任意の部位に正確にノックインすることが可能である。ただしその頻度はNHEJに比べると大幅に低い。この技術には、20年近い歴史のあるZFN (zinc-finger nuclease)、2009年に登場したTALEN (transcription activator-like effector nuclease) 等を用いた手法があるが、これらは標的配列ごとに組換えタンパク質を作製する必要がある、利便性や汎用性に課題があった。一方、2012年に登場したCRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated, 以下CRISPRと略) システムはそのきわめて容易な使い勝手、強力な作用、広範な応用から、わずか1年ほどの間に世界中で使われるゲノム編集の標準技術となった²⁾。

CRISPRは、微生物の獲得免疫系として発見された。ヌクレアーゼであるCas9タンパク質は、標的となる外来DNAと相同なRNA (ガイドRNA) と複合体を形成し、外来DNAの部位特異的なDNA二本鎖切断を行う。CRISPRでDNA二本鎖切断の標的部位を規定するのは100塩基のガイドRNAのうち、標的部位と相同なわずか20塩基のみである。したがってCRISPRをゲノム編集ツールとして見たとき、標的ごとに変える必要があるのはわずか20塩基のみであり、それ以外の塩基配列はCas9も含めすべて共通である。ガイドRNAの作製は容易に行うことが可能であり、それゆえ、たとえ分子生物学実験の経験が浅い研究者でも、誰もが使うことのできるゲノム編集ツールとして急速に普及した。事実、2012年の最初の発表からわずか5か月後には大腸菌、ヒト細胞からゼブラフィッシュに至る多くの細胞・生物種での応用が発表され、いまやヒトやサルを含むあらゆる動物個体、植物、微生物への膨大な数の応用が報告されている。

2. 遺伝子改変マウスとCRISPR

20年以上もの間、ES細胞を用いた遺伝子ターゲティング技術を背景に、遺伝子改変可能な哺乳類モデルとして不動の地位を築いてきたマウスにももちろんCRISPRは適用可能である。2013年にマサチューセッツ工科大学のRudolf Jaenischらにより発表された二つの論文はマウスの遺伝子

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子神経科学分野 (〒113-8510 東京都文京区湯島1-5-45)

Genome editing in mouse with CRISPR/Cas system

Tomomi Aida and Kohichi Tanaka (Laboratory of Molecular Neuroscience, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45, Yushima, Bunkyo, Tokyo, 113-8510, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880119

© 2016 公益社団法人日本生化学会

改変に革命をもたらした^{3,4)}。従来、ノックアウト・ノックインマウスの作製には、ES細胞での相同組換えによる遺伝子改変とキメラマウス（改変ES細胞由来の細胞を持つマウス）の樹立が必要であり、目的のマウスを得るまでには数年を要した。またホモマウスの迅速な樹立や複数遺伝子の同時改変はきわめて困難であるか不可能であった。CRISPRを用いた遺伝子改変マウス作製は、ES細胞を用いた場合とまったく異なる。すなわち標的配列に対するガイドRNA、Cas9をコードするmRNAおよびノックインの場合にはドナーDNAを野生型受精卵にインジェクションするだけで、受精卵内で標的遺伝子が直接改変され、3週間後にはノックアウト・ノックインマウスが産まれてくる。これにより多くの時間・労力・費用を要した遺伝子改変マウス作製が、わずか1か月・1回の実験・少額な費用で可能になった。Jaenischらの報告はこれにとどまらず、多重遺伝子ノックアウト、多重点変異ノックイン、ペプチドタグや蛍光タンパク質など機能カセットのノックイン、floxedマウス（特定エクソンが二つのloxPではさまれたマウスで、遺伝子の条件つき改変に用いる）等、研究に用いられるほぼすべての遺伝子改変マウス作製を実現した。CRISPRを用いた遺伝子改変マウスの作製法はそのきわめて高い効率性が特徴である。たとえば多重ノックアウトは各遺伝子ともほぼ100%に近く、多重点変異ノックインも50%を超える効率である。ノックインする配列が数十塩基以内であれば、従来用いられてきた二本鎖のターゲティングベクターではなく、一本鎖のオリゴDNA（いわゆるプライマー）

をドナーDNAとして用いることができる。これによりきわめて迅速で簡便な遺伝子改変マウス作製が受精卵のレベルで可能になり、かくしてES細胞はマウス作製ツールとしての役割を終えたのである⁵⁾。このように万能ツールに思われるCRISPRであるが、いまだ実現困難な課題も残っている。その代表例が数kbに及ぶ長い外来遺伝子のノックインマウス作製である。Jaenischらにより外来遺伝子のノックインマウス作製の成功が報告されているものの、その効率は10%程度であり（図1A）、ノックアウトや点変異ノックインと比べてきわめて低い効率である⁴⁾。最初の報告から2年を経てもなお、他の研究者から長い外来遺伝子のノックインマウスの作製に成功した報告はほとんどない。蛍光タンパク質やCreリコンビナーゼ等の機能カセットのノックインは、個体レベルでの生命機能を解明する上で欠かすことのできない重要な研究ツールである。このため、ノックインマウス作製の効率化は、CRISPRを用いたゲノム編集にとって大きな課題の一つであった¹⁾。

3. ノックイン技術

長い遺伝子カセットを効率よくマウスにノックインするにはどうしたらよいのだろうか？ ドナーDNAとCRISPRが導入されたマウス受精卵では、1) CRISPRによる標的部位の切断、これに引き続く2) ドナーDNAを鋳型とした相同組換え、によりノックインが起こる。したがってこれら2点を改良することによりノックイン効率を向上させることができると考えられる。

まず第一の点について、最近、筆者らが開発した改良型「クローニングフリーCRISPR」を紹介する（図1B）⁶⁾。通常、CRISPRを用いたマウス受精卵のゲノム編集では、Cas9およびガイドRNAとともにRNAの形で受精卵の前核に顕微注入する。Cas9がDNA切断酵素として前核内で作用するためには、まず注入されたCas9 mRNAが前核から細胞質へと輸送され、次にタンパク質に翻訳され、さらにタンパク質が再度、前核に移行し、マウスゲノムをスキャンして標的部位に到達、切断を行う必要がある。この過程は相当の時間を要し、CRISPRによる標的部位切断効率を低下させる。相同組換えは細胞周期のうち、後期S期/G2期に起こることからも、受精卵内での迅速な標的部位切断は重要であると考えられる。そこで筆者らはCas9のmRNAではなく、タンパク質を受精卵前核に直接注入することで、この点を改善できるのではないかと考えた。実際、培養細胞の実験ではCas9タンパク質を用いることにより、導入直後から標的部位の切断が起こることが示されている⁷⁾。またCas9タンパク質の半減期は数時間と短く、標的部位を切断した後、迅速に分解される。このためCRISPRの最大の問題であるオフターゲット

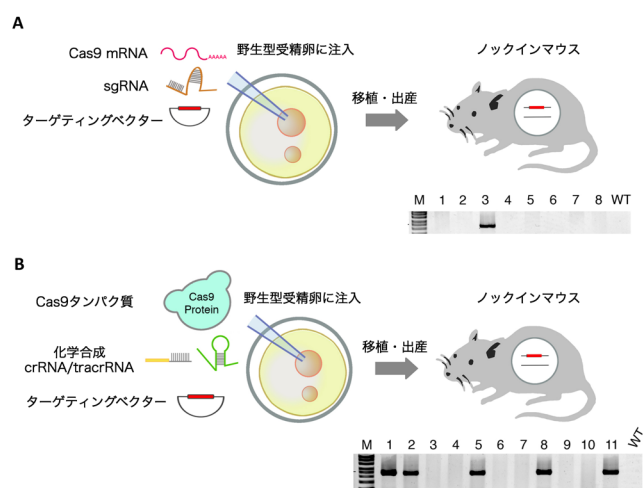


図1 クローニングフリーCRISPRシステムによる高効率ノックイン
従来型CRISPRシステム(A)では、ノックインマウスの作成効率は12.5% (1/8) だったが、クローニングフリーCRISPRシステム(B)では45.5% (5/11) という高効率化が実現した。sgRNA: single guide RNA, crRNA: CRISPR RNA, tracrRNA: trans activating crRNA。

変異（ガイドRNA配列に類似した配列の非特異的切断）が大幅に抑制されることも報告されている⁷⁾。筆者らはさらにガイドRNAにも工夫を加えた。通常のゲノム編集では、CRISPRはCas9と一本鎖ガイドRNA（sgRNA）の2要素からなるシステムである。一方、自然界に存在する微生物免疫系としてのCRISPRは、Cas9と、2種類のガイドRNA（標的を認識するcrRNAと、Cas9およびcrRNAの橋渡しとなるtracrRNAからなるデュアルRNA）を用いる、3要素のシステムである²⁾。CRISPRがゲノム編集に応用された当初には、sgRNAに比べ、デュアルRNAの方がより高い標的配列切断活性を持つことが報告されている⁸⁾。そこで筆者らはデュアルRNAをCas9タンパク質と組み合わせ、高活性のCRISPRを実現できるのではないかと考えた。デュアルRNAを用いるもう一つの利点は、化学合成による作製が可能であり、sgRNAの作製に必要な大腸菌での遺伝子組換え実験を省略できることである。sgRNAの長さが100塩基であるのに対して、crRNA、tracrRNAは各々半分程度であり、PCRプライマーをオーダーすると同様に受託企業にて合成が可能である。筆者らの改良したCRISPRシステムは、Cas9タンパク質と化学合成したデュアルRNAからなる（図1B）。Cas9タンパク質はすでに市販されているため、大腸菌での遺伝子組換え実験を行うことなく、容易に標的配列に応じたCRISPRを作製することができる。これをクローニングフリー CRISPRと名づけた⁶⁾。このクローニングフリー CRISPRは、その活性評価も容易である。従来のように培養細胞での実験を経ることなく、試験管内で標的配列を含むPCR産物やプラスミドDNAとインキュベートして電気泳動するだけで（*in vitro* digestion assay：IDA），その切断活性を調べることができる。モデル実験としてこのクローニングフリー CRISPRにより、Actb遺伝子座にEGFP（enhanced green fluorescent protein）を含む2.5 kbの遺伝子カセットをノックインすることを試みた。インジェクションプロトコルは以下の通りである。Actbに対するcrRNA（5'-cauuuaguguccuuuagugaGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG-3'；小文字はActbの標的配列，大文字は共通配列を示す，ファスマック社，最終濃度0.61 pmol/μL），tracrRNA（5'-AAACAGCAU-AGCAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG-AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU-3'；ファスマック社，最終濃度0.61 pmol/μL），Cas9タンパク質（NEB社およびPNA Bio社，最終濃度30 ng/μL），ターゲティングベクター（最終濃度10 ng/μL）を混合し，インジェクション直前に37°Cで15分以上インキュベートし，マウス受精卵の前核に注入する。新生仔のゲノムDNAを解析したところ，驚くべきことに，およそ50%の新生仔マウスがノックインマウスであることが明らかになった（図1B）。従来用いられてきたCas9 mRNAとsgRNAからなる2要素シス

テムを用い対照実験を行ったところ，その効率は先行の報告どおり10%程度だった（図1A）。このことからクローニングフリー CRISPRは遺伝子カセットノックインの効率を大幅に向上させることが明らかになった。さらに作製したノックインマウスを野生型マウスと交配し，次世代への伝達効率を調べたところ，すべての系統から50%の効率で次世代のノックインマウスが得られた。このことは，親世代はヘテロのノックインマウスであり，受精卵の早い段階で片側の染色体に遺伝子カセットがノックインされたことを示している。この結果は，クローニングフリー CRISPRでは，従来のCRISPRで問題となるモザイク（同一個体内に3アレル以上の異なる改変が共存する）の頻度が，著しく低いことを示している。またオフターゲット変異の候補となる部位を解析したところ，いずれのノックインマウスでも変異は検出されなかった。以上の結果からクローニングフリー CRISPRはきわめて簡便ながらも非常に高効率，そしてモザイクとオフターゲットのきわめて少ないマウスゲノム編集法であることが明らかになった⁶⁾。筆者が所属する東京医科歯科大学難治疾患研究所では，この手法による遺伝子カセットノックイン，点変異ノックイン，あるいはノックアウトマウス作製支援サービスを学内向けに行っている。

Cas9タンパク質や化学合成ガイドRNAを用いたCRISPR/Casシステムは，ヒトの細胞療法や遺伝子治療を目標に，さらなる改良が行われている。その一つが，ゲノム編集が困難な細胞種の改変で，CD4陽性ヒトT細胞やCD34陽性ヒト造血幹細胞が代表格としてあげられる。ヒトT細胞の効率的なゲノム編集は，がん，HIV，免疫不全，自己免疫疾患等に対する有望な細胞療法の核となる技術である。最近，CRISPR/Casシステムによるゲノム編集の発明者であるDoudnaらのグループは，Cas9タンパク質を用いることで，ヒトT細胞のCXCR4（HIVの受容体）を実に40%に達する高効率でノックアウト可能であることを報告した⁹⁾。さらに10塩基ほどの置換をコードするドナーDNAを加えることで，20%もの高効率でノックインすることにも成功している。一方，スタンフォード大学とアジレント社のチームは，化学合成技術の利点を活かして，ガイドRNAにメチル化やチオール化等の化学修飾を加えた。この修飾ガイドRNAをCas9タンパク質と組み合わせることで，ヒトT細胞でのゲノム編集効率を2倍以上高めることに成功している¹⁰⁾。最近，HIVや白血病等，血球系細胞のゲノム編集による細胞療法は臨床試験ですでに有望な結果が報告されている。Cas9タンパク質や化学合成ガイドRNAを用いたCRISPR/Casシステムの改良は，ヒトの細胞療法や遺伝子治療をさらに加速するであろう。

ノックインの効率を高めるための第二のポイントはDNA損傷の修復機構である。ゲノム編集はその基本原理

として、標的部位のDNA二本鎖を切断した後の編集，すなわちDNA損傷部位の修復を細胞の内在性機構に依存している。DNA損傷部位の修復は，多くの場合，塩基欠損・挿入を伴うNHEJにより行われ，鋳型を用いた相同組換えによる正確な修復の頻度は低い。効率のよいノックインのためには，相同組換えの頻度を高めることが重要になる。これを実現した方法の一つが，NHEJを阻害することにより相同組換え頻度を相対的に高めることである。Scr7は，NHEJの主要分子であるDNAリガーゼIVの特異的阻害剤として開発された低分子化合物である。最近，複数の研究チームから，Scr7を加えることで，オリゴDNAドナーを用いたマウス受精卵でのノックイン効率が2～10倍（実数として受精卵の60%程度がノックイン）と著しく高まることが報告された^{11, 12)}。逆に相同組換えそのものの効率を高める低分子化合物も報告されている¹³⁾。低分子化合物によるDNA損傷修復機構の制御は，強力で簡便なノックイン効率を高める方法として，今後主流となることが予想される。

別の観点として，細胞自身が持つ，頻度の高いDNA損傷修復機構を用いる方法もある。最近，NHEJでも相同組換えでもない，ごく短い相同領域間での組換えによる修復機構であるMMEJ（microhomology mediated end-joining）が注目されている。CRISPR/Casで改変したマウスの修復部位を詳細に解析すると3塩基ほどのマイクロホモロジーが頻繁にかつ繰り返し観察され^{3, 6)}，その頻度は多いと50%にも達する。広島大学の研究チームは，このMMEJを用いて長鎖の外來遺伝子を効率的にノックインできることを報告している¹⁴⁾。この方法は相同組換えによるノックインの際に必要な，長いホモロジーアームを付加したターゲティングベクターの作製を不要としており，簡便なノックイン方法として今後広まっていくであろう。

4. おわりに

このようにCRISPR/Casシステムによるゲノム編集は急速に発展している。これまで困難であった動物個体への遺伝子カセットノックイン等の高度な応用も，相次ぐ技術革新により実用可能な段階に入りつつある。本稿ではマウスを中心に最近の報告を紹介してきたが，いずれはより長く

複雑な外來遺伝子や霊長類を含む中大動物でのノックインが可能になっていくであろう。最近，CRISPR/Casシステムによるヒト受精卵の改変が中国から報告され，世界的に大きな問題となっている¹⁵⁾。CRISPR/Casシステムの持つリスクと人類にもたらす恩恵を，冷静に分析し，応用の方向性を決めることが今後の重要な課題である。

文 献

- 1) Aida, T., Imahashi, R., & Tanaka, K. (2014) *Dev. Growth Differ.*, **56**, 34–45.
- 2) Doudna, J.A. & Charpentier, E. (2014) *Science*, **346**, 1258096.
- 3) Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013) *Cell*, **153**, 910–918.
- 4) Yang, H., Wang, H., Shivalila, C.S., Cheng, A.W., Shi, L., & Jaenisch, R. (2013) *Cell*, **154**, 1370–1379.
- 5) Skarnes, W.C. (2015) *Genome Biol.*, **16**, 109.
- 6) Aida, T., Chiyo, K., Usami, T., Ishikubo, H., Imahashi, R., Wada, Y., Tanaka, K.F., Sakuma, T., Yamamoto, T., & Tanaka, K. (2015) *Genome Biol.*, **16**, 87.
- 7) Kim, S., Kim, D., Cho, S.W., Kim, J., & Kim, J.S. (2014) *Genome Res.*, **24**, 1012–1019.
- 8) Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., & Zhang, F. (2013) *Science*, **339**, 819–823.
- 9) Schumann, K., Lin, S., Boyer, E., Simeonov, D.R., Subramaniam, M., Gate, R.E., Haliburton, G.E., Ye, C.J., Bluestone, J.A., Doudna, J.A., & Marson, A. (2015) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 10437–10442.
- 10) Hendel, A., Bak, R.O., Clark, J.T., Kennedy, A.B., Ryan, D.E., Roy, S., Steinfeld, I., Lunstad, B.D., Kaiser, R.J., Wilkens, A.B., Bacchettam, R., Tsalenko, A., Dellinger, D., Bruhn, L., & Porteus, M.H. (2015) *Nat. Biotechnol.*, **33**, 985–989.
- 11) Singh, P., Schimenti, J.C., & Bolcun-Filas, E. (2015) *Genetics*, **199**, 1–15.
- 12) Maruyama, T., Dougan, S.K., Truttmann, M.C., Bilate, A.M., Ingram, J.R., & Ploegh, H.L. (2015) *Nat. Biotechnol.*, **33**, 538–542.
- 13) Yu, C., Liu, Y., Ma, T., Liu, K., Xu, S., Zhang, Y., Liu, H., La Russa, M., Xie, M., Ding, S., & Qi, L.S. (2015) *Cell Stem Cell*, **16**, 142–147.
- 14) Nakade, S., Tsubota, T., Sakane, Y., Kume, S., Sakamoto, N., Obara, M., Daimon, T., Sezutsu, H., Yamamoto, T., Sakuma, T., & Suzuki, K.T. (2014) *Nat. Commun.*, **5**, 5560.
- 15) Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., Sun, Y., Bai, Y., Songyang, Z., Ma, W., Zhou, C., & Huang, J. (2015) *Protein Cell*, **6**, 363–372.

著者寸描

●相田 知海（あいだ ともみ）



東京医科歯科大学難治疾患研究所准教授。博士（理学）。

■略歴 2008年東京医科歯科大学大学院生命情報科学教育部修了。同年東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究部特任助教。09年東京医科歯科大学難治疾患研究所助教。15年より現職。

■研究テーマと抱負 テクノロジーを駆使してゲノムから個体まで生命現象を統

合的に明らかにしていくこと。

■趣味 バドミントンコーチ。

●田中 光一（たなか こういち）



東京医科歯科大学難治疾患研究所教授。医学博士。

■略歴 1958年新潟県に生る。84年新潟大学医学部卒業。90年同大学院医学研究科修了。90年理化学研究所基礎特別研究員。93年国立精神神経センター神経研究所室長。98年より現職。

■研究テーマと抱負 モデル動物を用い精神神経疾患の病態解明・新規治療法の

開発を目指している。特に、グリア細胞やグルタミン酸輸送体に着目し研究を行っている。改良型CRISPRシステムにより研究が加速することを期待している。

■ウェブサイト <http://www.tmd.ac.jp/mri/aud/index.html>

■趣味 読書。