

特異的な遺伝子改変動物の作製法 (2)

石原 仁毅¹⁾ / 山本 正道^{1,2)} / 柳田 素子¹⁾

Yoshitaka ISHIHARA

Masamichi YAMAMOTO

Motoko YANAGITA

京都大学大学院医学研究科腎臓内科学¹⁾, 科学技術振興機構 さきがけ研究者²⁾

CRISPR/Cas

2012年8月, Charpentierらは, 標的とするDNAと相補的な配列を含んだ短いRNA (single guide RNA: sgRNA) と, 細菌由来の二本鎖DNA切断酵素Cas9により, *in vitro*で任意の塩基配列のDNAを特異的に切断できることを報告した¹⁾. その翌年には, Churchらによって, このsgRNAとCas9が, ヒトやマウスの細胞で機能することを報告し²⁾, Jaenischらは受精卵にsgRNAとCas9のmRNAを注入するだけで遺伝子が両アレル破壊されたマウスを効率に作成でき, 複数の遺伝子を同時にノックアウトできることを報告した³⁾. この方法は非常にシンプルで, 目的とするRNAを入手してから1ヵ月後には, 目的とするトランスジェニックマウスを作製することが可能となったと研究者たちに衝撃を与えた.

そもそもCRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) は, 1987年に現九州大学教授である石野良純らによって報告された*E.coli*のゲノムにある数十塩基対の短い反復塩基配列であり⁴⁾, その後様々な細菌に存在することが判明したが, その存

在意義については長らく不明であった. しかし, 近年バクテリオファージやプラスミドなどの外来DNAの排除機構 (獲得免疫のようなもの) に関与していることが明らかになり, それはCRISPR領域の上流に, CRISPR-associated genes (Cas遺伝子群) が存在し, バクテリオファージやプラスミドなどの外来遺伝子のなかのPAM (proto-spacer adjacent motif) 配列と呼ばれる短い塩基配列を認識し, その上流数10bpを切断し, 自身のCRISPR領域に挿入することで, 細菌の免疫記憶となる. 挿入された塩基配列は, このCRISPR領域から一連のpre-crRNA (pre-crisprRNA) として反復配列とともに転写され, 反復配列が切断されて成熟crRNAとなり, crRNAと一部が相補的なtracrRNA (trans-activating crRNA), Cas遺伝子群の1つであるCas9とともに複合体を形成する. そして, この複合体が標的の外来性DNAのPAM配列に結合し切断除去する. この一連の機構をCRISPR/Casシステムと呼ぶ.

CRISPR/Casシステムは, 様々な細菌に見られるシステムであり, ここでは詳しく述べないが, タイプI, II, IIIに分類される. ゲノム編集に用いら

KEY WORDS

1 トランスジェニックマウス

2 ゲノム編集

3 CRISPR/Cas システム

4 エレクトロポレーション法

5 オフターゲット効果

れているのはタイプIIである. タイプIIは, Cas9, crRNA, tracrRNAがあれば, RNA配列に依存してDNAを切断できる. tracrRNAは, crRNAとヘアピン構造を形成してCas9に結合しDSBを起こすわけだが, tracrRNAとcrRNAをキメラにしたRNA (sgRNA) を作製することで, Cas9とsgRNAの2つだけでゲノム編集が可能になる.

例えば, *S.pyogenes*のCas9は, NGG (N: A, C, G, Tいずれも可) というPAM配列を認識するため, GGの配列があればその上流をターゲットとして切断することができる. Cas9を発現するプラスミドと, sgRNA (NGG上流20baseの標的配列にcrRNAとtracrRNAのキメラのヘアピン構造約40baseを繋げたもの) を発現するプラスミドを細胞に導入することで, ゲノムの標的配列がCas9とsgRNA複合体により認識され, 同部位でDSBを生じる. その後NHEJによる修復が行われて, この修復過程で偶発的な塩基の挿入・欠失が生じ, フレームシフトが生じて遺伝子が破壊しknock outされる. また, knock inしたい部位の両端に標的遺伝子の相同配列を持つドナーDNAを導入すると, それを鋳型にHDRが生じて遺伝子挿入を起こす