

超簡単！遺伝子改変動物作製法の開発

-エレクトロポレーション（電気穿孔）法による哺乳類受精卵への ZFN、TALEN、CRISPR-Cas の導入に成功-

金子武人

京都大学大学院医学研究科
附属動物実験施設 特定講師

1. 本研究成果のポイント

- ・ エレクトロポレーション（電気穿孔）法を用いて、遺伝子改変ラットの作製に世界で初めて成功した。
- ・ 本方法を用いて、近年注目されているジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、TALEN、CRISPR-Cas の受精卵への導入に成功し、ゲノム編集技術の加速化を推進させる技術として利用できる。
- ・ エレクトロポレーション法は、マイクロインジェクション法よりも操作が容易であり、熟練した作業者が不在の研究機関・研究室で、目的の遺伝子を改変した動物を容易に作製することができる。
- ・ 多くの動物種の受精卵への遺伝子導入に応用可能であり、研究に適した動物種を用いて短期間で遺伝子改変動物を準備することができ、研究効率を向上できる。
- ・ 本技術は、Technique for Animal Knockout system by Electroporation (TAKE : テイク法)と命名した。

2. 要旨

遺伝子解析研究の発展により、多くの遺伝子の機能が明らかになってきている。現在では、これら遺伝子の機能を生体レベルで評価するために、目的の遺伝子を導入あるいは欠損させた動物（遺伝子改変動物）が作製され、研究に用いられている。

遺伝子改変動物は、受精卵へ目的遺伝子を導入したり、ZFN、TALEN および CRISPR-Cas などの人工制限酵素を導入し、目的遺伝子を破壊することで作製される。受精卵は直径が 0.1mm と極めて小さく、その中に遺伝子を導入するために、マイクロマニピュレーターと呼ばれる特殊な機械が必須である。マイクロマニピュレーターは、遺伝子を導入した微細なガラス針を操作し、顕微鏡下で受精卵へ注入する方法で、その操作は繊細かつ熟練した技術を要する。このため、遺伝子改変動物を作製できる機関は限定され、研究が制限されているのが現状である。

エレクトロポレーション法は、電気の作用により細胞に微少な穴をあけることで、そこから遺伝子を導入する方法である（図 1）。この方法は、マイクロマニピュレーション法よりも容易に遺伝子導入が可能である。しかしながら、哺乳類の受精卵は透明帯と

呼ばれる殻に守られており、従来のエレクトロポレーション法では、透明帯に穴をあけ、そこから遺伝子を導入することは困難であった。また、一度に強い電気パルスを与えて穿孔と遺伝子導入を同時に行うために、受精卵へのダメージも大きかった。

本研究では、3ステップの電気穿孔を設定し、1ステップ目の電気パルスで細胞に穴を空け、2および3ステップ目の電気パルスで遺伝子を導入するという段階的な方法で、効率的に受精卵内へ遺伝子を導入することに成功した（図2）。近年、注目されているZFN、TALEN および CRISPR-Cas の導入にも成功し、目的の遺伝子を破壊した（ノックアウト）ラットの作製に成功した（図1下）。

本研究で用いたエレクトロポレーション法による遺伝子改変動物作製法は TAKE（テイク）法と命名し、マイクロマニピュレーターや熟練した技術が必要とせず目的の遺伝子改変動物を短期間で作製することが可能である。また、多くの動物種の受精卵への遺伝子導入にも応用が可能であるため、研究の多様化・加速化が期待される。

本研究成果は、10月1日付（英国現地時間）の英国の科学雑誌「Scientific Reports」（ネイチャーパブリッシンググループ）に掲載された。

3. 研究方法と結果

標的遺伝子は、X連鎖重症複合免疫不全症（X-SCID）の原因遺伝子であるインターロイキン2受容体 γ 鎖（*Il2rg*）遺伝子として、ZFN、TALEN あるいは CRISPR-Cas の mRNA を作製した。エレクトロポレーションシステムは、NEPA21（ネッパジーン株式会社）を用いた。mRNA を混合した溶液は、電極を装着したシャーレ（図1右上）に満たし、そこへ受精卵を導入した。テイク法により、受精卵への穿孔および mRNA 導入を行った（図2）。導入後の受精卵は、雌親へ移植し産子にまで育てた。その結果、ZFN、TALEN および CRISPR-Cas の全てにおいて、目的の遺伝子が破壊された産子を得ることに成功した（図1下）。

4. 今後の期待

これまで、遺伝子改変動物の作製には繊細かつ熟練した技術が必要とされ、そのことが研究遂行の妨げになっていた。今回開発したテイク法を用いることにより、簡易に短期間で目的の遺伝子を改変した動物を作製することが可能となった。この方法で開発された新規システムは、我々が以前開発したフリーズドライ精子保存法により簡易かつ安全にシステム保存することができる（2012年4月10日報告：http://www.kyoto-u.ac.jp/static/ja/news_data/h/h1/news6/2012/120410_1.htm）。本研究成果は、遺伝子改変動物を必要とする研究の加速化に大いに貢献できるものであり、今後他の動物種での成功が期待される。

5. 本研究成果掲載論文

Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos

Takehito Kaneko, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Tomoji Mashimo

Scientific Reports 4: 6382

DOI: [10.1038/srep06382](https://doi.org/10.1038/srep06382)

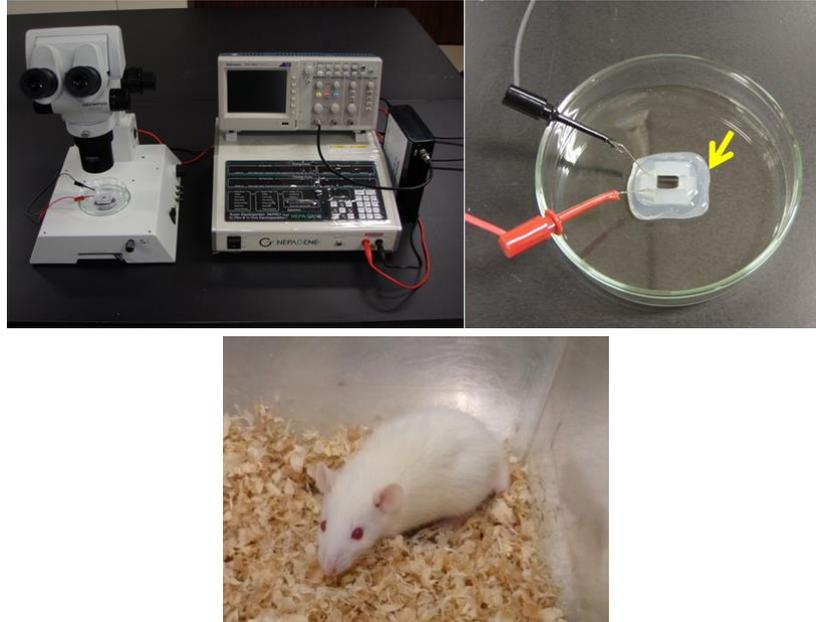


図1：NEPA21 エレクトロポレーションシステム（左上）、電極を装着したシャーレ（右上）、テイク法を用いて CRISPR-Cas を導入したノックアウトラット（下）

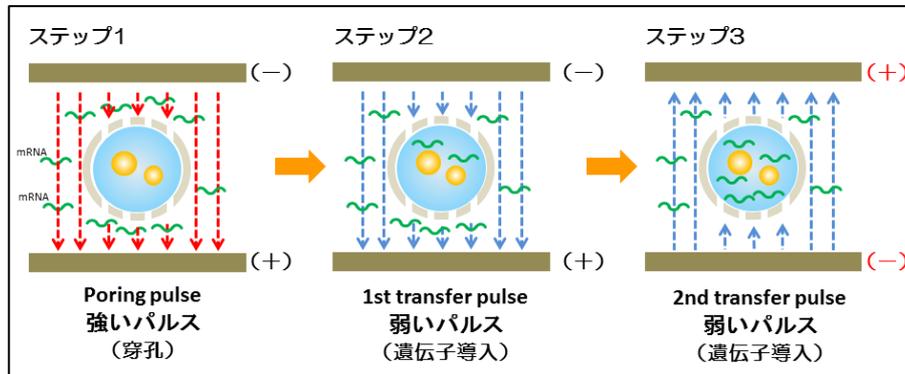


図2：3ステップのエレクトロポレーションの原理