

第 118 回関西実験動物研究会 トピックス抄録
高活性型 TALEN の開発と様々な動物におけるゲノム編集

広島大学・大学院理学研究科・数理分子生命理学専攻 山本 卓

これまで多くの動物において、細胞内あるいは生物個体内において目的の遺伝子のみを改変（遺伝子ノックアウトあるいは遺伝子ノックイン）する技術は確立していなかった。マウスでは ES 細胞を用いて目的の遺伝子を改変し、改変した ES 細胞を利用した個体作製法が確立しているが、他の動物ではこの方法が困難なため化学変異原やトランスポゾンでゲノム遺伝子にランダムに変異を導入する方法が用いられてきた。しかしながら、ランダムな変異を導入された集団から目的の遺伝子を改変した変異体を選別する作業は多大な労力を必要とするため、遺伝子改変は飼育が容易で変異体スクリーニングが可能な限られた動物を中心に行われてきた。このような状況の中、任意の配列に対して設計可能な人工制限酵素（人工ヌクレアーゼ）の Zinc-finger nuclease (ZFN) や Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を用いた遺伝子改変技術（ゲノム編集技術）が開発され、基礎から応用までの広い分野での利用が期待されている。ゲノム編集技術は、人工ヌクレアーゼを細胞や受精卵に導入するだけで可能なこと、原理的に全ての生物に利用可能であることから、次世代の遺伝子改変技術と考えられている。

本講演では、TALEN を基盤とするゲノム編集技術を用いた様々な動物での遺伝子改変の現状と可能性について紹介する。2010 年に TALEN が初めて報告されて以来、様々な動物（ゼブラフィッシュやカエルなど）での遺伝子ノックアウトが成功する一方、マウスやラットでは期待される効率での変異導入が実現していなかった。そこで我々は、Voytas ラボの Golden Gate 法を改良し、TALE の N 末端と C 末端を欠失させた TALEN (TALEN-NC) の効率的作製方法（6 モジュール法）の開発と培養細胞での評価方法を確立してきた (Sakuma et al., 2013)。さらに、京都大学の真下らは、TALEN-NC と Exonuclease I との共導入によってラットでの変異導入に成功した (Mashimo et al., 2013)。しかしながら、TALEN-NC のみのインジェクションでラット個体への変異導入を確認できず、さらなる改良が必要と考えられた。今回、TALEN の DNA 結合モジュールに改良を加えた Platinum Gate 法を確立し、高活性型の Platinum TALEN を用いて培養細胞およびカエル、マウスでの変異導入効率を調べたので、その結果について紹介する。Platinum TALEN は培養細胞の SSA 活性評価において、これまでの Voytas TALEN の 1.5~2.5 倍の高い活性を有し、培養細胞および個体においても高い変異導入を示すことが明らかになった。特にカエルにおいては F0 において完全な遺伝子破壊個体を得ることに成功したので (Suzuki et al., 2013)、その結果について紹介する。

Sakuma et al., Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes Cells*, **18**: 315-326, 2013

Mashimo et al., Efficient gene targeting by TAL effector nucleases coinjected with exonucleases in zygotes. *Scientific Reports*, **3**, 1253, 2013

Suzuki et al., High efficiency TALENs enable F0 functional analysis by targeted gene disruption in *Xenopus laevis*, *Biology Open*, in press, 2013