

CRISPR/Cas9 システムを用いたマウスゲノム編集

伊川 正人

大阪大学微生物病研究所・附属感染動物実験施設

近年、哺乳類ゲノムの遺伝子改変法として、DNA 配列を認識するタンパク質に FokI nuclease を融合させた ZFN (zinc-finger nuclease) や TALEN (transcription activator-like effector nuclease) などの人工制限酵素が注目されている。ゲノム中の標的配列を切断し、NHEJ (Non-Homologous End-Joining) や HDR (Homology Directed Repair) を利用して遺伝子欠失や挿入、置換を行う手法である。しかし ZFN や TALEN は、ペプチドにより DNA を認識するために生じる配列特異性の問題や、作製過程が複雑で難しいなどの問題があった。

そのような中、2013 年初めに、CRISPR/CAS システムをアレンジした人工制限酵素を用いて哺乳類細胞におけるゲノム改変が報告された[1, 2]。CRISPR/CAS システムは原核細菌などが有する獲得免疫システムであり、外来 DNA を自らのゲノムの特定領域に取り込み、そこから転写された RNA と CAS nuclease の複合体により、同じ DNA 配列を認識して切断することで、2 回目以降の感染を防御する。著者らは、codon optimize して NLS を付加した CAS9 nuclease と標的配列を決める sgRNA (synthetic guide RNA) を哺乳類細胞に発現させて標的 DNA 配列を切断し、NHEJ や HDR に成功した。また 5 月には、Cas9 をコードする mRNA と sgRNA を受精卵に注入することで、ダイレクトに遺伝子変異したマウス個体を得る手法も報告されている[3]。

CRISPR/CAS システムでは、RNA-DNA 結合により標的を認識することから配列特異性が高く、またオリゴ DNA を発現ベクターにクローニングするだけで簡単に遺伝子改変ベクターが構築できることから非常に簡便で高効率なゲノム編集ツールとして注目されている。

本講演では、我々のデータも踏まえ、CRISPR/CAS システムを応用したマウスゲノム編集の有用性について概説する。

1. 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 2013; 339:819-823.
2. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 2013; 339:823-826.
3. 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 2013; 153:910-918.