

ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いたノックアウトラット作製法

○滝澤明子、真下知士、国広弥生、山崎賢一、芹川忠夫
(京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設)

【目的】特定の遺伝子を欠損させたノックアウト動物は、遺伝子機能解析モデルとしての有用性だけではなく、疾患モデル動物としての利用価値も高い。我々は、これまで ENU ミュータジェネシスにより、ヒト疾患遺伝子を標的としたさまざまな疾患モデルラットを作製してきた。ラット ES 細胞を用いたノックアウトラットの作出が報告されたが、その効率はマウス ES 細胞と比べて低く、さらなる改良が必要である。近年、特定の遺伝子に特異的に DNA 二本鎖切断をいれることが可能なジンクフィンガーヌクレアーゼ

(ZFN) により、標的遺伝子に変異を導入する技術が報告された。我々は、この ZFN 技術による効率的なノックアウトラット作製方法を検討した。

【方法】複数のラット標的遺伝子について、複数のラット系統 (F344/Stm、TM/Kyo) を検討した。ZFN 発現ベクターは、シグマアルドリッチから購入した。転写したメッセンジャーRNA をラット前核期受精卵の雄性前核へマイクロインジェクションした(5 μ g/mL)。ZFN 注入胚を偽妊娠誘起したメス (CrIj:WD) の卵管内に移植し、22 日後に産子を得た。PCR ダイレクトシーケンス法により、ZFN により誘導された遺伝子変異を確認した。遺伝子変異が確認されたファウンダーラットについては、次世代へのジャームライントランスミッションを確認した。

【結果および考察】ZFN の mRNA 注入胚を移植した結果、全ての遺伝子についてそれぞれノックアウト個体が得られた(44.8%)。ファウンダーラットの中には、モザイク状に複数の欠損変異または挿入変異が導入されているものが存在した。作出されたファウンダーラットを交配させた結果、次世代にも確実に遺伝子変異が確認された。さらに複数の ZFN を Co-injection することで、ダブルノックアウトの作出も可能であった。以上の結果、ZFN により複数の系統、遺伝子でノックアウトラットを作出することができることを証明した。ZFN 作製からノックアウトラット作出まで、およそ 4-6 カ月程度であった。ジンクフィンガーヌクレアーゼは、ノックアウトラットを短期間で効果的に作製することができる優れた技術である。