

ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変の 概要と問題点

高橋 智(筑波大学)

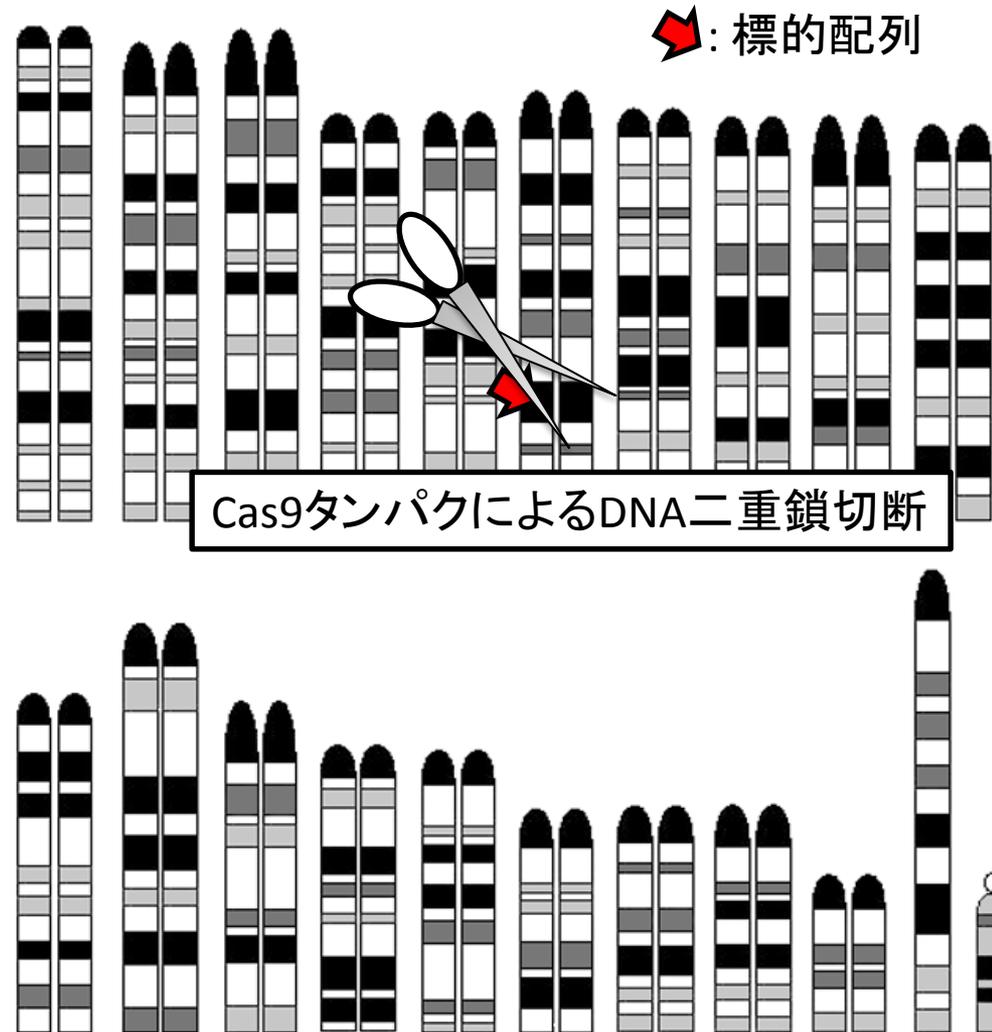
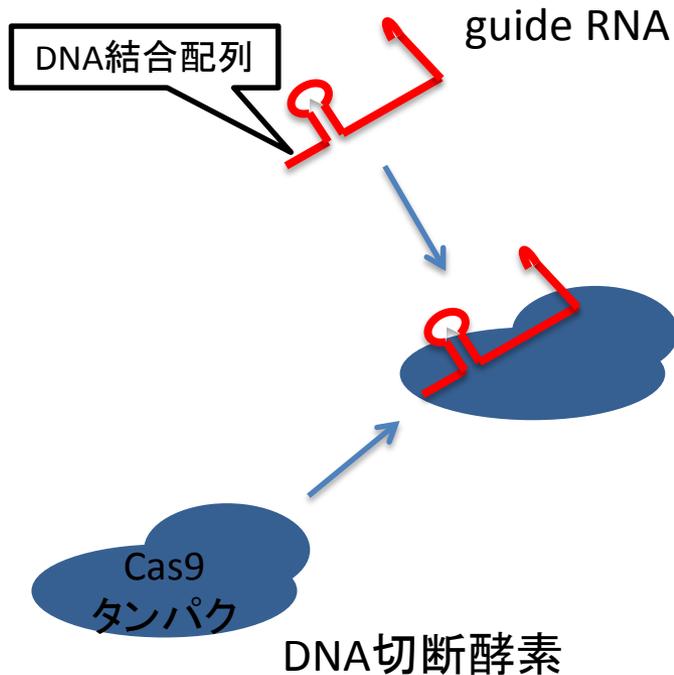
石川冬木(日本学術会議第二部、京都大学)

遺伝子改変動物の作製方法とその特徴

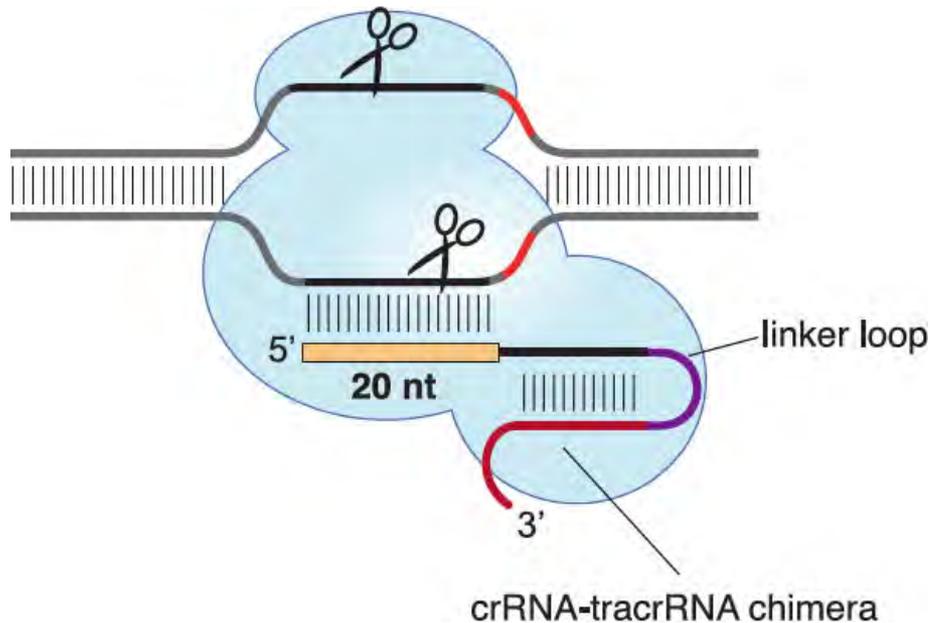
	遺伝子導入動物 トランスジェニック個体	ES細胞を用いた遺伝子 改変動物	ゲノム編集動植物
作出目的	人工外来遺伝子の導入	内在性遺伝子の改変	内在性遺伝子の改変
ゲノムでの 変異箇所	ランダム	特異的	特異的
作出方法	受精卵への インジェクション	相同組換え(ES細胞)→ キメラマウス作製→ 生殖系列細胞への移行	受精卵への インジェクション
作業・時間 (マウス)	簡便・半年	煩雑・1から2年	簡便・1ヶ月～半年
動物種	多種類 マウス・ブタ・サル...	限定的(キメラが必須) マウス・(ラット)	多種 マウス・ブタ・サル...植物

CRISPR/Cas9 の作用原理

gRNA がゲノム中の特定のDNA配列に結合する
Cas9 タンパク が2重鎖のゲノムDNAを切断する



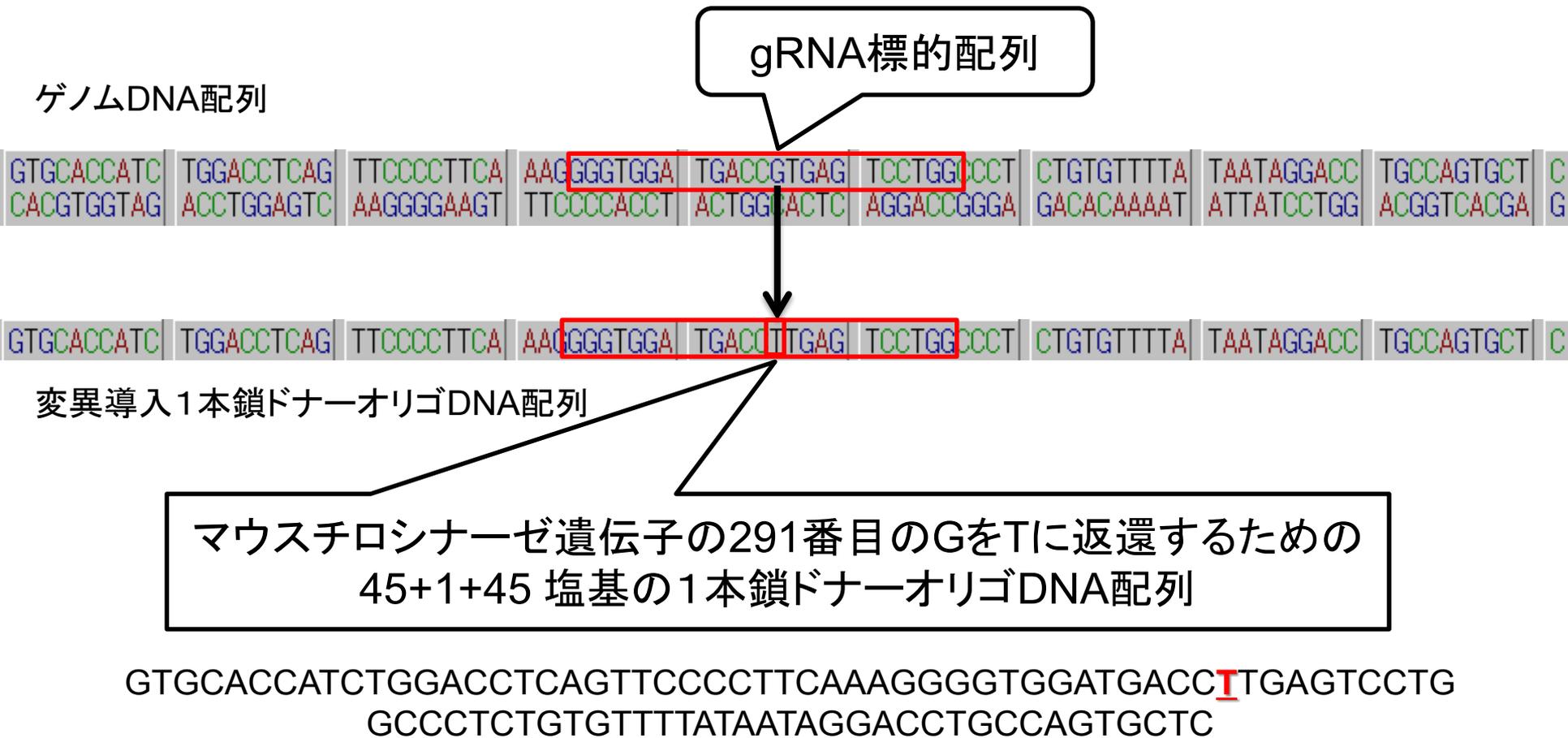
CRISPR/Cas9 システム



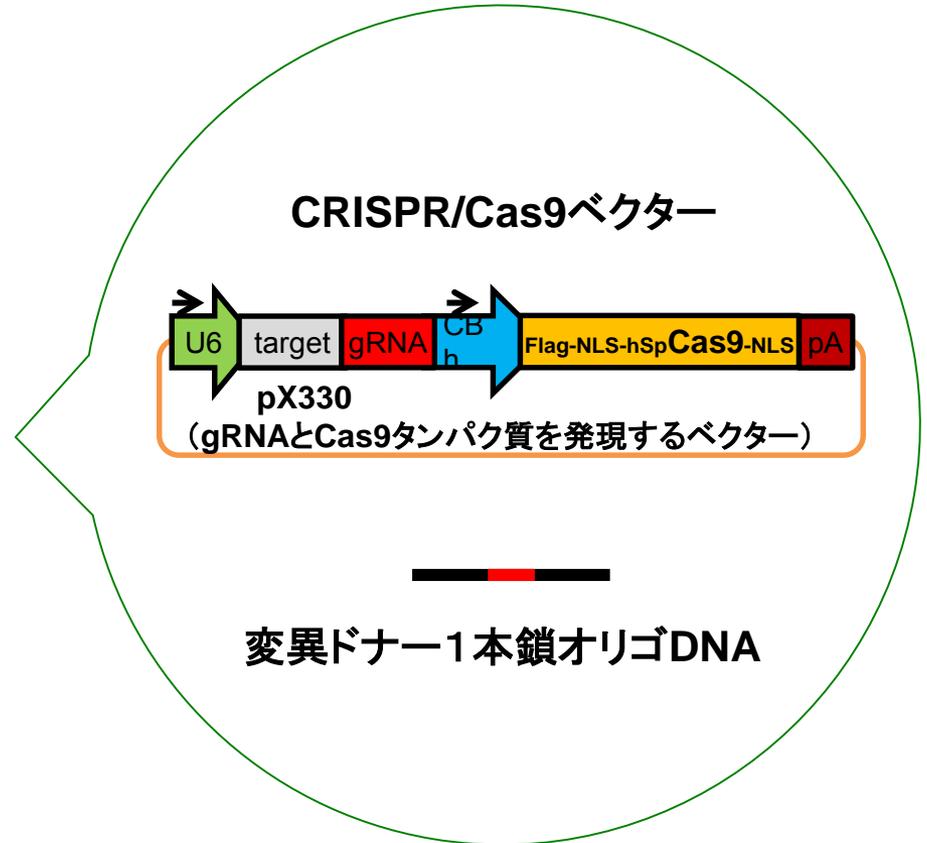
細菌や古細菌は外来性の生物に対する獲得免疫システムを有することが知られていた。そのシステムは CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) と呼ばれる RNA と DNA 切断酵素である Cas (CRISPR-associated) タンパク質より形成される (Horvath and Barrangou, 2010; Wiedenheft et al., 2012)。

CRISPR/Cas9による遺伝子改変の実際

マウス受精卵を用いて、チロシナーゼ遺伝子の291番目のGをTに改変して機能を欠損させ、黒色マウスを白色に改変した。



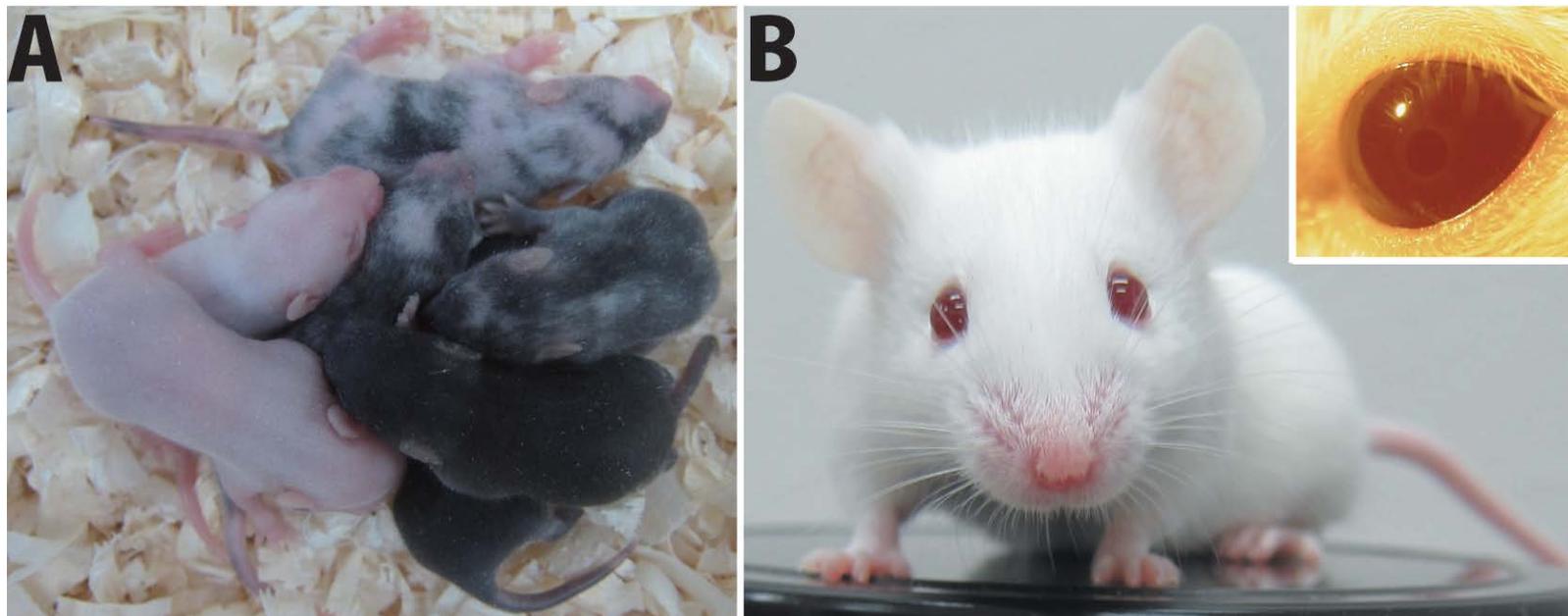
CRISPR/Cas9ベクターのC57BL/6Jマウス受精卵への導入



環状のCRISPR/Cas9 ベクターと変異ドナー1本鎖オリゴDNAを導入

(Mizuno S and Sugiyama F, et al. Mammalian Genome, 2014.)

CRISPR/Cas9による白色C57BL/6Jマウスの作製



Wild-type ACCTCAGTTCCCCTTCAAAGGGGTGGATGACC**G**TGAGTCCTGGCCCTCTGTGTTTTATAATAG
#1-1 ACCTCAGTTCCCCTTCAAAGGGGTGGATGACC**T**TGAGTCCTGGCCCTCTGTGTTTTATAATAG
#1-2 ACCTCAGTTCCCCTTCAAAGGGGTGGATGACC-----**TCCTGG**CCCTCTGTGTTTTATAATAG
#2-1 ACCTCAGTTCCCCTTCAAAG**GGG**----- (20 bp) -----CCCTCTGTGTTTTATAATAG
#2-2 ACCTCAGTTCCCCTTCAAAG**GGGTGG**---- (17 bp) -----CCCTCTGTGTTTTATAATAG

(Mizuno S and Sugiyama F, et al. *Mammalian Genome*, 2014.)

筑波大学生命科学動物資源センターにおける作製実績

2013年5月から2015年8月まで

CRISPR/Cas9による作製のみ

作製方法	作製数	平均インジェクション数	平均出生数	平均変異個体数
完全欠損	37	246	64	15*
変異導入	25	340	83	5*
ノックイン	29	336	72	5
コンディショナルノックアウト (2段階作製)	22	341	77	2

* 全ての個体は解析せず

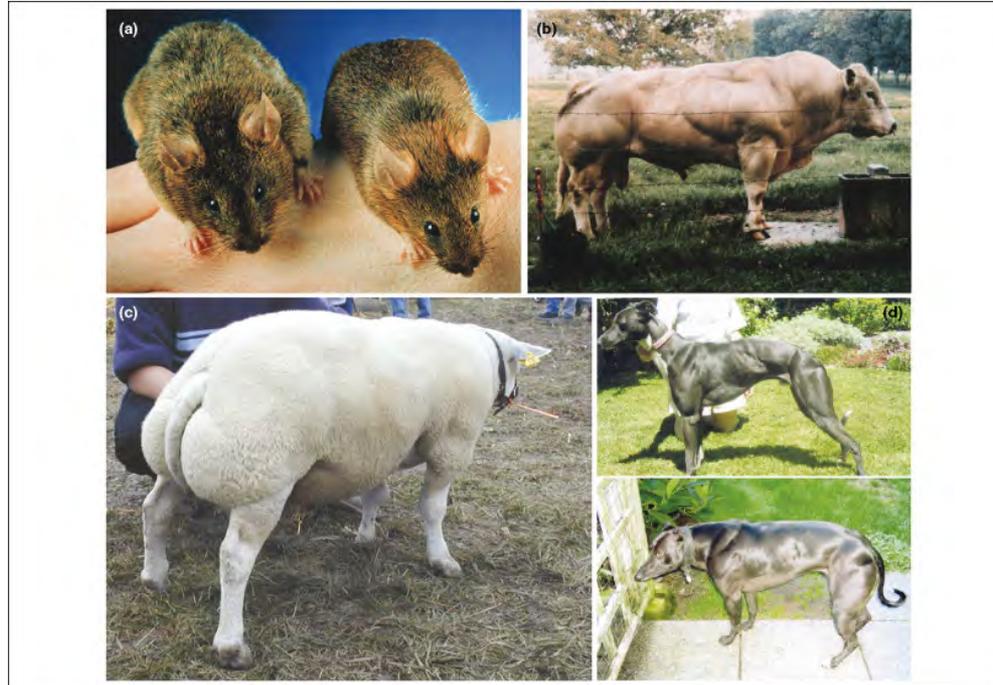


Figure 1. Double muscling phenotype resulting from inactivating mutations in the *MSTN* gene. **(a)** *Mstn*^{-/-} mouse (left) compared with a wild-type littermate (right). Reproduced, with permission, from Ref. [24]. **(b)** Belgian Blue bull. Reproduced, with permission, from Ref. [6]. **(c)** Texel sheep (photograph kindly provided by Michel Georges). **(d)** 'Bully' whippet homozygous for a *MSTN* mutation (bottom) and a whippet heterozygous for the same mutation (top). Reproduced, with permission, from Ref. [1].

from Se-Jin Lee **Sprinting without myostatin: a genetic determinant of athletic prowess**

null, Volume 23, Issue 10, 2007, 475–477

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2007.08.008>

ゲノム編集技術における社会的利点および問題点

1. 基礎研究分野では、既に無くてはならない技術となっている。
2. 農林水産業分野: 動物や植物の品種改良技術として使われる可能性
原理的には自然突然変異と区別がつかない。遺伝子組換え食品として扱わないかは、合意が得られていない。
 - 体の大きさが1.5倍になるマダイ(京都大学)
 - 良い肉質を持った繁殖に障害がない和牛(生物資源研究所)
 - 筋肉量が2倍になるウシ
3. 医療分野では、HIVや β サラセミア(地中海貧血)等の疾患に対して有望な治療法、今後ヒト体細胞に対する治療法として普及すると考えられる。ベンチャー企業が多く参入しており、患者団体からの期待も大きい。
4. 一方ヒト生殖細胞に対するゲノム編集は、技術的に十分でないとともに、解決すべき多くの倫理的な問題がある。またES細胞開発の時と同様の反応が予想される。