

## 第13回麻布大学 生殖・発生工学セミナー

## ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いた効率的な ノックアウトラット作製法

滝澤 明子, 真下 知士, 芹川 忠夫

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

ラットは、疾患モデル動物としての利用価値が高く、薬理薬効試験、毒性試験などに多用されているが、特定の遺伝子を欠損させたノックアウトラットの作製が困難だった。これまでノックアウト動物の作製にはES細胞を用いることが一般的であった。2010年にラット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。最近、DNA配列を特異的に認識するジンクフィンガー蛋白とDNAを切断するヌクレアーゼ蛋白を融合させたジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)により、標的とする遺伝子に特異的に変異を誘導する技術が、培養細胞、植物、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュなどで相次いで報告された。ZFNは、標的とする遺伝子シーケンスにDNA二本鎖切断を導入することで、DNA修復の過程で挿入あるいは欠失の変異を引き起こすことができる。我々は、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。

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はSigma-Aldrichから購入した。ZFN発現ベクターから転写したメッセンジャーRNAをラット前核期受精卵の前核へマイクロインジェクションした。ZFN注入胚を偽妊娠誘起したメス(Crlj:WI)の卵管内に移

植し、ノックアウトラットを作製した。

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%)。作製したノックアウトラットは、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おり、これらを交配させた結果、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。

ZFNの初期胚への導入することにより、ES細胞を用いることなくノックアウトラットの作製が可能であった。このZFN作製からノックアウトラット作出まで、およそ4-6カ月程度である。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。

### 参考文献

- 1) Tong C et al., Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*. 2010 Sep 9; 467(7312): 211-3.
- 2) Geurts AM et al., Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*. 2009 Jul 24; 325(5939): 433.
- 3) Mashimo T et al., Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One*. 5: e8870. 2010.