

連載講座

ヒトを知るモデル動物としてのゼブラフィッシュ-I

ゼブラフィッシュを使った遺伝子操作

木村 有希子 東島 眞一

Key words : ゼブラフィッシュ, トランスジェニックフィッシュ, ゲノム編集

ゼブラフィッシュはモデル脊椎動物として様々な研究分野で有用である。ゼブラフィッシュは飼育が容易で、胚発生が速いなど、モデル動物として有利な条件を多数備えているが、遺伝子操作が容易なことも利点の一つである。ゼブラフィッシュの遺伝子操作は、古典的な変異体の作製に始まり、現在ではゲノム編集技術を用いたノックアウト、ノックインも可能になっている。本稿では、ゼブラフィッシュを用いた遺伝子操作技術を概説する。

I 大規模突然変異体スクリーニング

ゼブラフィッシュがモデル動物として注目されるようになった研究の一つは、1990年代に行われた順遺伝学による大規模変異体スクリーニングである^{1,2)}。順遺伝学とは、特定の異常を示す突然変異体を単離し、原因遺伝子を同定する手法である。前述の研究では、化学変異原 ENU (N-エチル-N-ニトロソウレア) で成魚のオスを処理し、生殖細胞の DNA に塩基置換などの突然変異を誘導した。これらの魚の子孫から発生や器官形成、運動に異常のある数千種類の変異体が単離された。得られた変異体の解析から、多数の原因遺伝子が同定されている。ゼブラフィッシュゲノムにランダムに変異を導入する方法としては、ほかに、レトロウイルスやトランスポゾンを用いて、

外来 DNA をゲノムにランダムに組み込む方法も開発されている。

化学変異原による突然変異体の作製は、逆遺伝学的解析にも利用されている。逆遺伝学とは、特定の遺伝子の発現を改変し、表現型の変化を調べることで、遺伝子の機能を調べる方法である。代表的なものに TILLING (targeting induced local lesions in genomes) 法がある³⁾。TILLING 法では、化学変異原処理されたオスの子ども個体 (F1) のゲノム DNA と凍結精子をセットでライブラリー化しておく。ゲノム DNA ライブラリーから標的遺伝子に変異のある候補をスクリーニングする。目的の変異が見つければ、凍結精子から変異体を得ることができ、標的遺伝子の変異による表現型の変化を調べることができる。

大規模スクリーニングや TILLING 法などによって作製された多数の突然変異体は、ZFIN⁴⁾ (ゼブラフィッシュの主要なデータベースで、遺伝子の発現パターンや変異体、トランスジェニック系統など様々な情報が検索可能) などのデータベースで検索、入手することが可能である。ランダム変異を用いる方法はこれまで多数の研究成果を生み出してきた。しかし、解析に多大な労力を要することから、現在新たに特定の遺伝子を破壊した系統を得るためには、後述するゲノム編集が主流の方法となっている。

Genetic engineering of zebrafish

Kimura Yukiko, Higashijima Shin-ichi : 自然科学研究機構生命創成探究センター, 自然科学研究機構基礎生物学研究所 (〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山 5-1)

0370-9531/08/¥500/ 論文/JCOPY

II トランスジェニックフィッシュ

1. トランスジェニックフィッシュの基本的な作製方法

トランスジェニック技術は外来の遺伝子をゲノムに組み込む技術であり、遺伝子機能の解析や、細胞の可視化および機能操作に不可欠な技術である。ゼブラフィッシュのトランスジェニックフィッシュ作製に関しては、1988 年に受精卵に注入したプラスミド DNA がゲノムに組み込まれ、子孫に伝達されることが報告された⁵⁾。特定の組織に安定したレポーター遺伝子の発現をするトランスジェニックフィッシュの作製が成功するのは、1990 年代の後半である。

筆者らは、筋肉特異的に発現する α -actin⁶⁾ や運動ニューロンに発現する *islet1* 遺伝子⁷⁾ の発現制御領域を用いて、GFP (緑色蛍光タンパク質) を特定の組織に発現させ、可視化することに成功した (図 1A)。これらの研究で用いられているトランスジェニックフィッシュの基本的な作製方法を図 1B に示す。まず、組織特異的なプロモーターと GFP 配列を含む DNA コンストラクトを用意し、1 細胞期の受精卵の細胞質にマイクロインジェクションする。一過的な GFP の発現解析はインジェクションした胚で可能である。注入 DNA は一部の細胞にのみ残るため、インジェクション胚の GFP 発現はモザイク状になる。注入した DNA コンストラクトで、必要な目的の組織に GFP が発現することを確認したら、その胚を成魚まで育てる。外来 DNA は一定の確率で生殖細胞系列のゲノムに取り込まれるため、育てた成魚の一部 (5-20%) の子孫から、トランスジェニックフィッシュを得ることができる。更にトランスジェニックフィッシュの作製効率を上げるには、tol2 トランスポゾンを使用する方法もある⁸⁾。なお、ノックインと異なり、この方法では外来 DNA はゲノムのランダムな位置に取り込まれる。そのため、レポーター遺伝子の発現量は、ポジション効果により系統ごとに異なる可能性がある。実験によっては複数の系統を作製し、発現の良いものを選ぶとよい。

ゼブラフィッシュの 1 ペアからは、一度の掛け

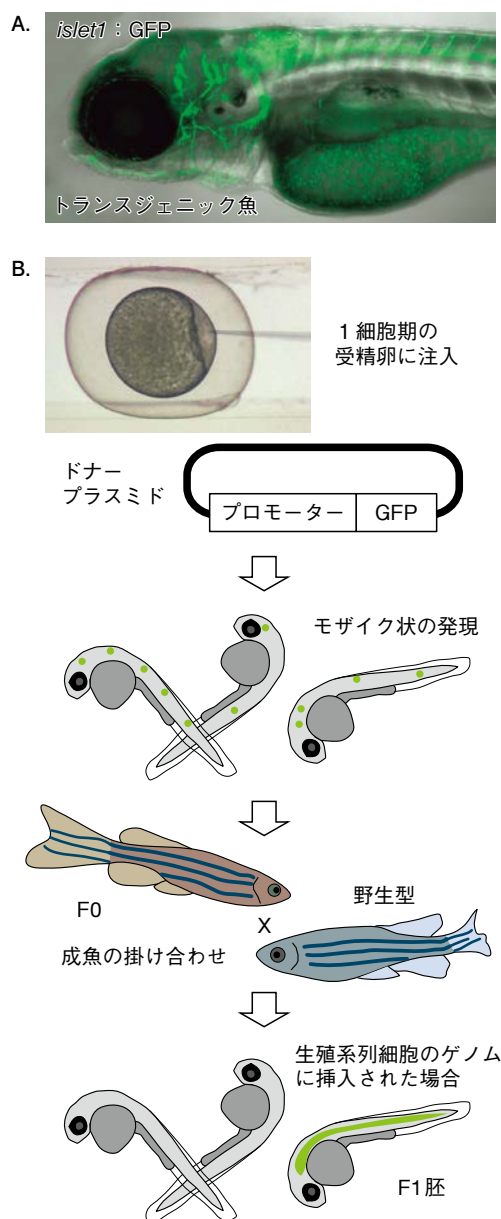


図 1 外来 DNA のランダムゲノム挿入によるトランスジェニックフィッシュの作製

- islet1* 遺伝子の発現制御領域を用いて作製した運動ニューロンに GFP を発現するトランスジェニックフィッシュ
- トランスジェニックフィッシュの作製では、ドナープラスミドを受精卵に注入する。モザイク状の GFP 発現をする胚を成魚まで育てる。一定の確率で生殖細胞系列のゲノムにランダムにドナー DNA が挿入されるため、育てた魚の 5-20% の子孫からトランスジェニックフィッシュを得られる。

合わせて 100-200 個程度の受精卵が体外受精で得られる。受精卵へのインジェクション操作も簡単である。また、胚発生が速く、胚の体は透明なため、胚の時期に発現する遺伝子を対象にした場合、蛍光タンパク質によるスクリーニングもインジェクション後 2-3 日という早期に容易にできる。性成熟に 2-3 か月要する点が律速段階ではあるが、総じて低労力でトランスジェニックフィッシュを得ることができる。

2. BAC を用いたトランスジェニックフィッシュの作製

2000 年代に入ると、人工染色体ベクターである BAC を用いたトランスジェニックフィッシュの作製方法が加わった。前述の方法では、組織特異的にレポーター遺伝子を発現させる DNA コンストラクトを用意するために、標的遺伝子の組織特異的発現に必要な制御領域を解析、単離して、プラスミドベクターに組み込む必要がある。BAC を用いれば、この労力を省くことができる。BAC は、100 kb を超える DNA 断片をクローン化することが可能で、ゼブラフィッシュのゲノム DNA 断片を保持した BAC ライブラリーが作製されている。標的遺伝子の発現部位にレポーター遺伝子を発現させる DNA コンストラクトを作製するには、標的遺伝子の前後の領域を広く含む BAC クローンを検索、購入し、標的遺伝子の発現制御領域の支配を受ける位置にレポーター遺伝子を挿入すればよい。BAC クローンの任意の部位へのレポーター遺伝子の挿入は、組換え酵素を持つ大腸菌内で、相同組換え法により行う。組換えを行った BAC を受精卵に注入することで、BAC がゲノムのランダムな位置に取り込まれ、トランスジェニックフィッシュが作製できる。この方法で、多数の有用なトランスジェニック系統がつけられたが⁹⁾、現在では、後述するゲノム編集を用いたノックインフィッシュ作製法のほうが簡便であり、新たに使われる機会は減少している。

III ゲノム編集を用いたノックアウト、ノックイン

1. ゼブラフィッシュのゲノム編集

最近まで、ゼブラフィッシュはマウスと異な

り、ノックアウトやノックインが困難であることが欠点であった。これは、ゼブラフィッシュでは胚幹性細胞が樹立されておらず、胚幹性細胞内での相同組換えを用いたノックアウト、ノックイン技術が利用できなかったためである。前述の様々な技術は、その欠点を補うために発展してきた面もある。

2012 年に細菌の獲得免疫機構を利用して、任意の DNA 配列を切断できる CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) /Cas9 が報告されると¹⁰⁾、ゼブラフィッシュでもノックインやノックアウトなどのゲノム編集が簡単にできるようになった。標的遺伝子の任意の配列を切断できれば、細胞自身の修復機構を介して、切断部位へのフレームシフト変異導入による遺伝子破壊 (ノックアウト) や、外来遺伝子の組み込み (ノックイン) が可能になる。実際には、CRISPR/Cas9 の登場以前にもジンクフィンゲースクレアーゼ (zinc finger nuclease ; ZFN)¹¹⁾ や TALEN (transcription activator-like effector nuclease)¹²⁾ といった人工ヌクレアーゼにより任意のゲノム配列部位に DNA 二重鎖切断を誘導する研究がゼブラフィッシュでも行われ、ゲノム編集研究の基礎となった。しかし、圧倒的な簡便さにより、現在のゲノム編集の主役は CRISPR/Cas システムに移行している。

2. CRISPR/Cas システムによるノックアウト

CRISPR/Cas システムで任意の配列を切断するためには、sgRNA (single-guide RNA) と Cas9 スクレアーゼを用いる (図 2A)。Cas9 が標的配列を認識する際には、PAM (protospacer adjacent motif) と呼ばれる配列が必要である。一般的に使われる化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) の Cas9 の PAM 配列は 5'-NGG-3' であり、グアニンが 2 塩基並んだゲノム配列があれば、標的配列とすることができる。sgRNA に PAM に隣接する 20 塩基程度の標的ゲノム配列を持たせると、sgRNA と複合体を形成した Cas9 スクレアーゼは標的配列に誘導され、PAM 配列の 3 塩基上流で DNA 二重鎖を切断する。

ゲノム DNA に二重鎖切断が生じると、真核生物の細胞では複数の修復経路によって、修復が行

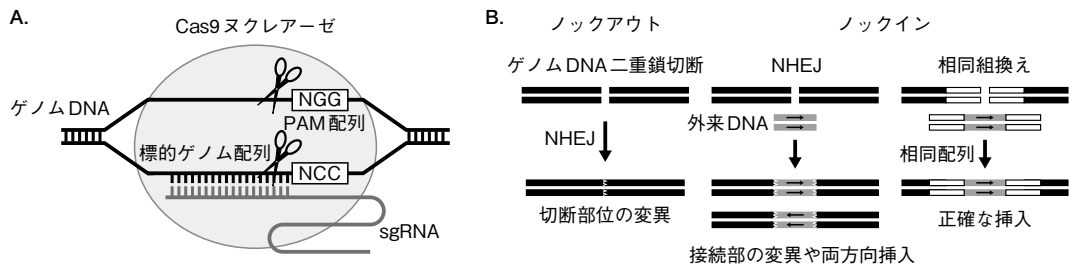


図 2 CRISPR/Cas9 によるノックアウト、ノックイン

- A. Cas9 スクレアーゼは標的配列と相補的な 20 bp 程度の配列を持つ sgRNA と結合し、標的ゲノム配列に誘導される。Cas9 は PAM 配列を認識し、その 3 塩基上流で DNA 二重鎖を切断する。
- B. CRISPR/Cas システムにより生じたゲノム二重鎖切断は、細胞内の複数の経路によって修復される。ノックアウトでは NHEJ によるエラーの多い修復による切断部位の変異を利用する。ノックインでは、外来 DNA を複数の修復経路によって組み込ませる。NHEJ 修復では、接続部の変異や両方向の挿入が起こりやすい。相同組換え修復では、正確な組み込みが起こる。効率は NHEJ のほうが高い。

われる。主に知られているものは、相同組換え修復と非相同末端結合 (non-homologous end joining; NHEJ) 修復である。相同組換えによる修復は、正常な鋳型を使い、正確な修復が行われる。一方、NHEJ による修復は、修復時に塩基欠失や挿入などのエラーが起こりやすい。CRISPR/Cas システムによるノックアウトでは、選択的に切断した標的遺伝子のコード領域に、NHEJ 修復により導入される挿入・欠失変異を利用するのが一般的な方法である (図 2B)。

実際のノックアウトフィッシュの作製では、Cas9 の mRNA またはタンパク質と、標的配列を認識するようデザインした sgRNA を用意する。sgRNA の作製に関しては様々な方法があるが、ルーティンに作製している研究室であれば、1-2 日程度の作業時間で作製できる。作製した sgRNA と Cas9 を 1 細胞期の受精卵に注入する。CRISPR/Cas システムによる変異の誘導頻度は高く、変異が両アレルに導入されることも多い。表現型にもよるが、標的遺伝子の破壊の結果はインジェクションした F0 胚でもある程度は確認可能である。ただし、F0 胚では、すべての細胞の標的部位に挿入・欠失変異が入るわけではなく、その変異も多様である。変異が生殖系列細胞で入れば、次の世代で変異が固定された F1 胚を得ることができる。標的部位の変異の状態を解析するには、標的部位をまたぐようにプライマーをデザインし、PCR 法で増幅した DNA を解析する。

CRISPR/Cas システムによるゼブラフィッシュへの突然変異の誘導は 2013 年には報告され¹³⁾、急速に広まった。ゲノム編集登場以前に遺伝子の機能解析を行う際には、アンチセンス・モルフォリノ¹⁴⁾を用いた標的 mRNA の機能阻害 (ノックダウン) を行う実験が標準であったが、現在ではノックアウト個体の表現型が簡単に調べられるようになってきている。

3. CRISPR/Cas システムによるノックイン

ゲノム編集によるノックインは、CRISPR/Cas システムにより任意のゲノム配列を切断し、切断部位が細胞により修復される機構を利用して外来遺伝子を挿入する。前述のように、細胞の DNA 切断修復では複数の機構が働く。ノックインの方法には、ドナーベクターの設計の違いにより、主に利用される修復機構が異なる複数の方法がある (図 2B)。これらの方法には長所と短所があり、目的に応じて使い分けられている。

1) 相同配列を用いないノックイン

外来 DNA に相同配列を用いないノックインでは、典型的な NHEJ 修復を介して外来 DNA とゲノムの切断末端がそのままつなぎ合わされるため、正確性が低いという欠点がある。つなぎ目に挿入や欠失の変異が入ることが多く、外来遺伝子の挿入方向はランダムである。その一方で、ノックインの効率は良く、相同配列を用いないためドナーベクターの構築が簡便であるという利点がある。相同配列を用いないノックインはゲノムの正

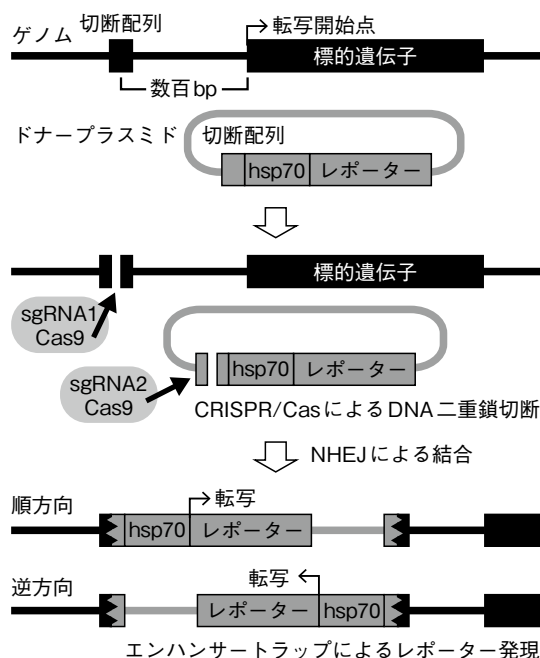


図 3 hsp70 プロモーターを用いた NHEJ を介したノックイン

CRISPR/Cas システムにより、標的遺伝子の転写開始点上流を切断すると、直鎖化したドナーベクターが NHEJ 修復によりゲノムに組み込まれる。ドナーベクターが持つ hsp70 プロモーターがミニマルプロモーターとして働き、エンハンサートラップにより標的遺伝子制御領域の制御を受けて、レポーター遺伝子が発現する。

確な改変を必要としない研究で特に有用で、標的遺伝子の発現細胞にレポーター遺伝子を発現させる研究などでよく用いられる。

筆者らが改良した相同配列を用いないノックインフィッシュの作製法を紹介する¹⁵⁾。この方法では、hsp70 プロモーターをレポーター遺伝子上流に配置したドナーベクターを用いる(図 3)。ゲノムの切断部位は標的遺伝子の転写開始点上流に設定する。CRISPR/Cas9 を用いてゲノムとドナーベクターを切断すると、NHEJ 修復によりドナーベクターが標的遺伝子の転写開始点上流に挿入される。その結果、hsp70 プロモーターを介したエンハンサートラップにより、標的遺伝子の発現細胞にレポーター遺伝子が発現する。この方法は、エンハンサートラップによる遺伝子発現であるため、NHEJ 修復による読み枠のずれや逆向き挿入が問題になりにくい。また、転写開始点上流の数百 bp の広い領域がノックインの標的にでき

るため、sgRNA の設計の自由度が高い。ドナーベクターに相同配列を持たせる必要がないため、複数の遺伝子に同じドナーベクターを利用できるという利点もある。

実際の作製方法としては、ゲノム切断用とベクター切断用の 2 種類の sgRNA、ドナーベクター、Cas9 mRNA を用意し、受精卵に同時に注入する。切断効率の良い sgRNA が選択できていれば、インジェクションした 5% 程度の胚で、発現が期待される細胞にレポーター遺伝子が幅広く発現する。切断効率の良い sgRNA は GC 含量の高い配列の sgRNA を 2-3 個試せば、多くの場合得ることができる。発現の良い胚を選んで育てれば、育てた魚の 30% 程度からノックインフィッシュが得られる。

この方法は、標的遺伝子の機能欠損解析にも利用できる。標的遺伝子上流ではなく、開始コドン付近に hsp70 プロモーターとレポーター遺伝子をノックインすると、標的遺伝子が破壊される。ヘテロ接合体では、標的遺伝子の発現領域にレポーター遺伝子が発現するため、発現解析も可能である¹⁶⁾。

2) 相同配列を用いたノックイン

相同組換え修復を用いたノックインは、NHEJ によるノックインより正確性が高い。病気の原因遺伝子の変異を忠実に導入する研究や、内在性遺伝子の読み枠に合わせてタグをつける研究などでは、正確性の高いノックインが必要で、相同組換えをベースにしたノックイン法の確立が望まれている。しかし、ゼブラフィッシュを用いた相同組換えによるノックインの方法や効率は報告により様々で、標準的な手法は確立されておらず、現在も改良が続けられている¹⁷⁾。

一般的に相同組換えには数百 bp の長い相同配列が利用される。しかし、相同配列を介した修復のメカニズムには、相同組換えのほかにもマイクロホモロジー媒介末端結合 (microhomology-mediated end joining) などのように、数塩基から数十塩基の短い相同配列を用いて行われる修復機構もある。川原らは、ゲノムの切断配列の前後の短い相同配列 (40 bp) を組み込んだドナーベクターを用いて、ケラチンの終始コドン付近に正しい読

み枠で GFP を挿入し、ケラチンと GFP の融合タンパク質を発現する F1 胚を得ることに成功した¹⁸⁾。この方法は、ドナーベクターの構築も簡単で、比較的正確なノックインを行いたい場合の選択肢の一つとなり得る。

標的ゲノム配列に対して短い相同配列を持つ一本鎖オリゴ DNA (ssODN) をドナーに利用したノックインは、HA タグや loxP 配列などの短い配列の挿入に用いられる。ゲノム欠損を誘導したい領域を 2 つの loxP 配列で挟み、Cre リコンビナーゼで削除することのできるコンディショナルミュタントも作製されている¹⁹⁾。また、ssODN を用いたノックインで、ヒト疾患に関わる遺伝子にミスセンス変異を導入する研究も行われている²⁰⁾。

4. 塩基編集

CRISPR/Cas システムを応用して、一塩基の正確な編集を行う方法が開発されている²¹⁾。この方法では、ヌクレアーゼ活性を低下させた Cas9 に塩基変換酵素を融合させ、DNA の二本鎖切断を伴わずに標的領域の一塩基変換を行う。ゼブラフィッシュでも塩基編集によるアミノ酸置換に成功して²²⁾、その後も疾患に関連する遺伝子の編集など複数の報告がある。塩基編集のツールは今後も充実、改良が期待される。また、塩基編集と同様に不活性型 Cas9 を用いて、より多くの塩基を編集できるプライム編集²³⁾などもゼブラフィッシュで今後応用されていくと思われる。

おわりに

ゼブラフィッシュの遺伝子操作方法は、ゲノム編集の登場により 10 年前には想像もできないほど充実し、大抵の遺伝子操作は望みのままに行えるようになった。次の 10 年には、これらの技術を活用することで、基礎生物から医療まで幅広い分野で、ゼブラフィッシュを用いた新たな視点の研究が展開されることを期待したい。

●文 献

- 1) Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF et al : *Development*. **123** : 37-46, 1996
- 2) Haffter P, Granato M, Brand M et al : *Development*. **123** : 1-36, 1996
- 3) Wienholds E, van Eeden F, Kosters M et al : *Genome Res*. **13** : 2700-2077, 2003
- 4) Ruzicka L, Howe DG, Ramachandran S et al : *Nucleic Acids Res*. **47** : D867-D873, 2019
- 5) Stuart GW, McMurray JV, Westerfield M : *Development*. **103** : 403-412, 1988
- 6) Higashijima S, Okamoto H, Ueno N et al : *Dev Biol*. **192** : 289-299, 1997
- 7) Higashijima S, Hotta Y, Okamoto H : *J Neurosci*. **20** : 206-218, 2000
- 8) Urasaki A, Morvan G, Kawakami K : *Genetics*. **174** : 639-649, 2006
- 9) Kimura Y, Okamura Y, Higashijima S : *J Neurosci*. **26** : 5684-5697, 2006
- 10) Jinek M, Chylinski K, Fonfara I et al : *Science*. **337** : 816-821, 2012
- 11) Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S : *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93** : 1156-1160, 1996
- 12) Christian M, Cermak T, Doyle EL et al : *Genetics*. **186** : 757-761, 2010
- 13) Hwang WY, Fu Y, Reyon D et al : *Nat Biotechnol*. **31** : 227-229, 2013
- 14) Nasevicius A, Ekker SC : *Nat Genet*. **26** : 216-220, 2000
- 15) Kimura Y, Hisano Y, Kawahara A, Higashijima S : *Sci Rep*. **4** : 6545, 2014
- 16) Ota S, Taimatsu K, Yanagi K et al : *Sci Rep*. **6** : 34991, 2016
- 17) Albadri S, Del Bene F, Revenu C : *Methods*. **121** : 77-85, 2017
- 18) Hisano Y, Sakuma T, Nakade S et al : *Sci Rep*. **5** : 8841, 2015
- 19) Burg L, Palmer N, Kikhi K et al : *PLoS Genet*. **14** : e1007754, 2018
- 20) Tessadori F, Roessler HI, Savelberg SMC et al : *Dis Model Mech*. **11** : dmm035469, 2018
- 21) Komor AC, Kim YB, Packer MS et al : *Nature*. **533** : 420-424, 2016
- 22) Zhang Y, Qin W, Lu X et al : *Nat Commun*. **8** : 118, 2017
- 23) Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR et al : *Nature*. **576** : 149-157, 2019