

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700427

研究課題名(和文) TALENsを用いた新規かつ効率的ノックアウトラット作製法の開発

研究課題名(英文) Production of knockout rats using TALENs

研究代表者

金子 武人 (Kaneko, Takehito)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30332878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、TALENsを用いた新規かつ効率的な遺伝子改変ラットの作製法の確立を目的とした。メラニン合成に関与するチロシナーゼ遺伝子を標的としたTALENsプラスミドから合成したmRNAをDA系統の前核期胚に導入した。その結果、Exo1遺伝子の共導入により、得られた産子の25%に遺伝子変異が認められた。また、毛色がアグーチ色からアルビノに変化した個体の作出にも成功した。さらに、改良型TALENs(Platinum TALENs)を用いて、Il2rg遺伝子の破壊に100%の成功率を示した。本研究結果より、TALENsはラット遺伝子改変系統の効率的な作製を可能にする実用的な技術であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study was examined to establish the effective new method for production of genetically modified rats. Of DA pronuclear embryos introduced TALENs mRNA targeted Tyrosinase gene, 25% of offspring had an edited Tyrosinase locus. Coat-color changed albino rats were also obtained in this study. All offspring had an edited Il2rg locus when platinum TALENs was introduced into F344 pronuclear embryos. This study demonstrated that the TALENs could be used as efficient tool for production of genetically modified rats.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：実験動物 ラット ゲノム編集 遺伝子改変 人工ヌクレアーゼ TALENs

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子改変動物は、遺伝子機能を解明する上で重要なモデル動物である。通常、遺伝子改変動物の作製には胚性幹 (ES) 細胞が用いられる。相同組み換え法により、遺伝子改変した ES 細胞を用いてキメラ動物を作製することで遺伝子改変動物が得られる。しかしながら、ラットにおいては ES 細胞の樹立が報告されておらず、遺伝子改変動物の作製が非常に困難であった。2010 年、ES 細胞からノックアウトラット誕生が報告されたが、その作製効率はマウスに比べると著しく低く、またベクター構築から個体を得るまでに 1~1.5 年程の期間を必要とする。

近年、人工ヌクレアーゼ Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs) により遺伝子特異的な改変や破壊を行うことができることが報告された。TALENs は、作製が 5 日間でできる点、標的 DNA 配列を自由に変更できる点など、利便性の高い技術として注目されている。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、Zinc-finger nucleases (ZFNs) を用いたノックアウトラットの作製に既に成功している。これにより、ノックアウトラットを約 6 ヶ月という短期間で作製することが可能となった。本研究では、ZFNs よりも利便性の高い TALENs を用いた新規かつ効率的な遺伝子改変ラットの作製法の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、以下の実験を行った。

### (1)チロシナーゼ遺伝子を標的とした TALENs のラット胚への導入

チロシナーゼは、細胞内のチロシンを酸化させる酵素であり、チロシンを酸化させることによりメラニンやその他の色素を合成する。このため、TALENs が胚内で機能しチロシナーゼ遺伝子がノックアウトされると毛色が白色 (アルビノ) になる。本研究では、チロシナーゼ遺伝子を標的遺伝子とした TALENs プラスミドを作製し、このプラスミドから人工的に mRNA を合成した。この mRNA を DA 系統の前核期胚に導入し、生存胚を偽妊娠雌の卵管に移植した。その後、得られた産子を解析することにより遺伝子変異効率を算出した。また、エキソヌクレアーゼ 1 (Exo1) 遺伝子の mRNA の共導入についても検討を行った。

### (2)主要系統における遺伝子改変ラットの作製についての検討

TALENs を用いたノックアウトラット作製法の実用化には、標的候補遺伝子による使用系統の選択が必要になる。そこで本実験では、X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) の原因遺伝子であるインターロイキン 2 受容体 鎖 (Il2rg) 遺伝子を標的遺伝子とした。さらに TALENs プラスミドは、アミノ酸配列を改変した改良型 TALENs (Platinum TALENs) を用いた。このプラスミドから mRNA を合成し、F344 系統の前核期胚に導入し、生存胚を偽妊娠雌の卵管に移植した。その後、得られた産子を解析することにより遺伝子変異効率を算出した。

## 4. 研究成果

### (1)チロシナーゼ遺伝子を標的とした TALENs のラット胚への導入

TALENs mRNA を導入した胚から得られた産子を解析した結果、遺伝子変異の見られる個体を得ることはできなかった。しかしながら、TALENs mRNA と共にエキソヌクレアーゼ 1 (Exo1) 遺伝子の mRNA を共導入した結果、得られた産子の 25% に遺伝子変異が認められた。また、アグーチ色の DA 系統の毛色がアルビノに変化した個体の作出にも成功した。

### (2)主要系統における遺伝子改変ラットの作製についての検討

Platinum TALENs mRNA を導入した胚から得られた産子を解析した結果、全ての産子に遺伝子変異が認められた。

本研究結果より、TALENs はラット胚においても機能することが明らかとなり、Exo 1 の共導入により作成効率を向上させることに成功した。また、TALENs の改良により本方法はラットにおいて系統や標的遺伝子を自由に選択し、遺伝子改変系統を作製できる実用的な方法として利用可能な技術であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

金子武人、哺乳動物における生殖技術の過去・現在・未来 - マイクロマニピュレーターの出現による生殖技術の発展 -、実験動物技術、査読無、第 48 巻、2 号、2013、pp. 89-96

金子武人、ZFN/TALEN を用いた効率的な遺伝子改変ラットの作製法、LABIO21、査読無、

No.53、2013、pp. 15-17

Hiroaki Taketsuru, Takehito Kaneko. Efficient collection and cryopreservation of embryos in F344 strain inbred rats. Cryobiology, 査読有, Vol. 67, No. 2, 2013, pp. 230-234  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.07.004>

Tetsushi Sakuma, Hiroshi Ochiai, Takehito Kaneko, Tomoji Mashimo, Daisuke Tokumasu, Yuto Sakane, Ken-ichi Suzuki, Tatsuo Miyamoto, Naoaki Sakamoto, Shinya Matsuura, Takashi Yamamoto. Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. Scientific Reports, 査読有, Vol. 3, 2013, 3379  
DOI: 10.1038/srep03379

真下知士、金子武人、ラットにおける遺伝子改変技術の新展開、細胞工学、査読無、Vol. 32、No.5、2013、pp. 564-569

Tomoji Mashimo, Takehito Kaneko, Tetsushi Sakuma, Junya Kobayashi, Yayoi Kunihiro, Birger Voigt, Takashi Yamamoto, Tadao Serikawa. Efficient gene targeting by TAL effector nucleases coinjected with exonucleases in zygotes. Scientific Reports, 査読有, Vol. 3, 2013, 1253  
DOI: 10.1038/srep01253

[学会発表](計 17 件)

Takehito Kaneko, Tomoji Mashimo. Production of knockout rats by using zinc finger nucleases and TAL effector nucleases. 40th annual conference International Embryo Transfer Society (IETS), Jan 11-14, 2014, Nevada, USA

Birger Voigt, Tomoji Mashimo, Takehito Kaneko, Hiroaki Taketsuru, Kazuto Yoshimi, Yuki Neoda, Zohg-hu Cui, Yayoi Kunihiro, Kumi Kosako, Kosuke Hattori, Machiko Hayashi, Ken-ichi Yamasaki, Satoshi Nakanishi, Tadao Serikawa, Takashi Kuramoto. The third term of the national bioresource project - rat in Japan. Rat genomics & models, Dec 11-14, 2013, New York, USA

Kazuto Yoshimi, Takehito Kaneko, Tomoji Mashimo. Knockout and knock-in mutation for rat albino gene generated by CRISPR/Cas. Rat genomics & models, Dec 11-14, 2013, New York, USA

Tomoji Mashimo, Kazuto Yoshimi,

Takehito Kaneko, Tadao Serikawa. Gene targeting technologies in rats: ZFN, TALEN, and CRISPR. Rat genomics & models, Dec 11-14, 2013, New York, USA

真下知士、吉見一人、金子武人、実験用ラットにおけるゲノム編集技術：ZFN、TALENそしてCRISPRへ、第36回日本分子生物学会年会 シンポジウム ゲノム編集研究の新展開、2013年12月3日～6日、神戸ポートアイランド、兵庫県

金子武人、最新ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変動物作製法とフリーズドライによる新規精子保存法の開発、第25回生命工学校トレーニングコース(発生工学・基礎技術)、2013年11月20日、金沢大学学際科学実験センター・実験動物研究施設、石川県

吉見一人、金子武人、芹川忠夫、真下知士、CRISPR/Casを用いたSNP特異的遺伝子改変ラットの作製、第3回ゲノム編集研究会、2013年10月26日～27日、広島大学理学部、広島県

真下知士、吉見一人、金子武人、芹川忠夫、実験用ラットにおけるゲノム編集技術：ZFN、TALENそしてCRISPR、第3回ゲノム編集研究会、2013年10月26日～27日、広島大学理学部、広島県

Tomoji Mashimo, Kazuto Yoshimi, Takehito Kaneko. Efficient gene targeting with engineered nucleases in rats. The 5th EMBO meeting, Sep 21-24, 2013, Amsterdam, Netherlands

金子武人、真下知士、ZFNおよびTALENを用いたノックアウトラットの作製、第106回日本繁殖生物学会大会、2013年9月11日～14日、東京農工大学農学部、東京都

金子武人、佐久間哲史、山本卓、芹川忠夫、真下知士、TAL エフェクターヌクレアーゼ (TALENs) を用いたノックアウトラット作製技術、第60回日本実験動物学会総会、2013年5月15日～17日、つくば国際会議場、茨城県

金子武人、革新的技術開発によるラットリソースの展開～最新ゲノム編集技術によるモデルラットの開発とフリーズドライによる精子長期保存～、第17回遺伝子実験施設セミナー、2013年1月11日、熊本大学遺伝子実験施設、熊本県

芹川 忠夫、金子武人、佐久間 哲史、山本卓、真下 知士、ラットにおける遺伝子改変技術の新展開、第35回日本分子生物学会年会、2013年12月11日～14日、福岡国際

会議場、福岡県

Tomoji Mashimo, Takehito Kaneko, Tetsushi Sakuma, Junya Kobayashi, Yayoi Kunihiro, Birger Voigt, Takashi Yamamoto, Tadao Serikawa. Efficient gene targeting by TAL effector nucleases coinjected with exonucleases in zygotes. Techniques and Procedures for Rat Gene Targeting, Reproduction, and Cryopreservation, Dec 3, 2012, Cambridge, UK

Tomoji Mashimo, Takehito Kaneko, Tetsushi Sakuma, Yayoi Kunihiro, Birger Voigt, Takashi Yamamoto, Tadao Serikawa. Efficient gene targeting by TAL effector nucleases in rats. Rat Genome and Models, A Wellcome Trust Scientific Conference, Dec 3-6, 2012, Cambridge, UK.

真下知士、金子武人、国広弥生、佐久間哲史、山本卓、芹川忠夫、人工ヌクレアーゼ TALEN によるノックアウトラットの作製、日本実験動物科学・技術九州 2012、2012 年 5 月 24 日～26 日、別府国際コンベンションセンター、大分県

真下知士、金子武人、国広弥生、芹川忠夫、TALEN を用いた遺伝子改変ラットの効率的な作製方法、第 2 回ゲノム編集研究会、2012 年 9 月 20 日、岡崎コンファレンスセンター、愛知県

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
ラット・マウスの生殖学/生殖工学研究のページ

[http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/reproduction/home\\_jp.aspx](http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/reproduction/home_jp.aspx)

ラット・マウスの生殖学/生殖工学研究のページ (英語版)

<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/reproduction/home.aspx>

新しい人工ヌクレアーゼ Platinum TALEN を用いたゲノム編集によって高効率にカエルやラットの遺伝子改変が可能に!

[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news\\_data/h/h1/news6/2013\\_1/131129\\_1.htm](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2013_1/131129_1.htm)

TAL エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) を用いた効率的な遺伝子改変ラットの作製技術

[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news\\_data/h/h1/news6/2012/130213\\_1.htm](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2012/130213_1.htm)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金子 武人 (Takehito Kaneko)  
京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設・特定講師  
研究者番号：30332878

### (2) 研究協力者

真下 知士 (Tomoji Mashimo)  
京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設・特定准教授  
研究者番号：80397554

### (3) 研究協力者

山本 卓 (Takashi Yamamoto)  
広島大学大学院理学研究科・教授  
研究者番号：90244102