



図4 一度の実験で多くのKI産仔が得られる。実際にGFP陽性産仔(右)の多くはKIされていた。

以上の長鎖DNAのKIはマイクロインジェクションが必須と考えられているが、倒立顕微鏡やマニピュレーター、そして何より高い技術が求められる。そのような中、水野らによってアデノ随伴ウイルス(AAV)による長鎖DNAのKI成功報告がなされた<sup>8)</sup>。我々もすぐに水野博士に協力を仰ぎラットの体外受精でのAAVによるKIを試行した。IVF由来の卵にCRISPR/CAS9をエレクトロポレーション法によって導入し、標的となる*Rosa26*遺伝子に一過的な切断を導入する。エレクトロポレーションを行った受精卵を左右両腕約1kbで挟まれたCAG-eGFP遺伝子(全長3.9kb)を搭載したAAVとともに一晚培養し、翌日に偽妊娠動物に移植した。その結果、得られた産仔19匹のうち9匹(47.4%)でKIによるGFPの蛍光が見られた(図4)。GFP陽性個体のうち、1匹で部分的な遺伝子の挿入があり、2匹で

ゲノムへのランダムインテグレーションが発生していた。また、GFPの蛍光が見られなかった全ての個体で標的部位の周辺で両アレルに変異が見られたことから、やはりIVF由来卵子へのゲノム編集効率の高さがうかがえた。このように、エレクトロポレーションで標的配列に一過的な切断を導入した後で、一晚ウイルスと共培養するだけで非常に効率よく長鎖DNAのKIが可能であることが証明された。ただしAAVによるKIには注意が必要で、産仔率が1割程度にまで減少する。これはAAVによる細胞毒性が影響していると推測されており、水野らによる先行研究でもその産仔率は5.4%と低いことが報告されている<sup>8)</sup>。

#### おわりに

本稿では、これまで制限のあったラットの過排卵、体外受精、そしてKO/KIを「誰でも」「簡単に」「効率よく」実施できる技術について紹介した。本研究によってラットを用いたモデル作製やその動物を活用した橋渡し研究が容易となるだけでなく、犠牲となるラットの数も少なくすることができる。我が国はこれまでラットの生殖工学技術開発において世界をリードし続け

てきた。実際に我々が本研究成果を誌上発表した後に、すでに二つの国内研究チームからラットの体外受精に関する報告がなされている<sup>9), 10)</sup>。今後はラットを用いたモデル開発とその研究がより一層活性化し、新しい知見の創出に貢献することが期待される。

謝辞：本研究成果は新学術領域研究「性スペクトラム」公募研究、ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」、および基盤技術整備プログラムの支援によって行われました。また、本研究は橋亮磨氏、守田昂太郎博士、水野直彬博士、伊藤大一氏、および浅野雅秀教授にお力添えいただきました。心よりお礼申し上げます。

#### 引用文献

- 1) Honda, A., Tachibana, R., Hamada, K., et al. (2019): *Scientific Reports*, 9, 11571
- 2) Taketsuru, H., Kaneko, T., et al. (2016): *Journal of Reproduction and Development*, 62, 521-526
- 3) Hasegawa, A., Mochida, K., Ogonuki, N., et al. (2017): *Journal of Reproduction and Development*, 63, 539-545
- 4) Aoto, T., Takahashi, R., Ueda, M. (2011): *Transgenic Research*, 20, 1245-1252
- 5) Yoshimi, K., Kaneko, T., Voigt, B., et al. (2014): *Nature Communications*, 5, 4240
- 6) Kobayashi, T., Namba, M., Koyano, T., et al. (2018): *BMC Biotechnology*, 18, 19
- 7) Takabayashi, S., Aoshima, T., Kabashima K., et al. (2018): *Scientific Reports*, 8, 12059
- 8) Mizuno, N., Mizutani, E., Sato, H., et al. (2018): *iScience*, 9, 286-297
- 9) Hino, C., Ueda, J., Funakoshi, H., et al. (2020): *Theriogenology*, 144, 146-151
- 10) Nakagata, N., Mikoda, N., Nakao, S., et al. (2020): *Scientific Reports*, 10, 93

(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)