



動物細胞への遺伝子導入

上平 正道

はじめに

筆者が動物細胞へ遺伝子を導入するという操作を本格的に行うようになったのは1993年頃である。それから20年以上の歳月が経ち、この間さまざまな技術が開発されてきた。近年のゲノム編集技術の登場など、着実に技術は進歩している。本稿では、動物細胞への遺伝子導入について代表的な方法を時代の流れとともに紹介していきたい。

動物細胞への遺伝子導入法、過去から現在まで

そもそも動物細胞に遺伝子を導入するには目的があり、万能な方法は残念ながら存在しないので目的に応じてどの方法が良いか考えなくてはならない。動物細胞に遺伝子を導入する目的としては、細胞でその遺伝子を発現させてその効果を見る、導入遺伝子産物として発現させた物質がほしい、細胞の染色体に有している遺伝子を置き換えたい、などがある。導入した遺伝子の細胞内での保持についても一時的でよいのか(一過性発現)、長期にわたって保持させ続けたいのか(安定発現)、また、対象細胞の形態(培養細胞か組織細胞か)・種類によって方法の選択は変わる。一般に、一過性発現の場合は、目的遺伝子を細胞染色体に組み込む必要はないが、安定発現が必要な場合は、目的遺伝子を染色体に組み込む必要がある。大腸菌で通常よく用いられるプラスミドベクターのように、動物細胞でも、OriP/EBNA-1(エプスタイン・バー核抗原-1)が組み込まれたプラスミドでは、細胞内で複製できるエピソーマルベクターとして利用できるが、目的遺伝子を選択薬剤非存在下で長期維持させるためには、基本的に染色体に組み込む必要がある。

図1は、外来遺伝子材料を細胞に導入する際に障害となる各段階を示している。まず、外来遺伝子材料が細胞内に到達するためには細胞膜に接触して細胞膜を透過する必要がある。場合によっては、細胞膜を透過して細胞内に侵入できても直接細胞質に取り込まれるばかりではなく、細胞内のエンドソーム経由で取り込まれることもありうるので、効率的な導入遺伝子発現のためにはエンドソーム/リソソームからの脱出も重要となる。次に、

導入遺伝子材料がDNAの場合は、転写のために核膜を透過して核に移行する必要がある。一過性発現の場合は、遺伝子導入の目的としてはここまでで良いが、安定発現ではさらに導入した遺伝子材料が細胞染色体に組み込まれる必要がある。これまでにさまざまな方法が動物細胞への遺伝子導入法として開発され使われてきた。遺伝子材料を細胞に取り込ませる方法は、物理・化学的方法と生物学的方法に分けられる。物理・化学的方法は、試薬あるいは装置を使って遺伝子材料を細胞に導入するもので、生物学的方法は、ウイルスベクターに代表されるウイルスが宿主細胞に自らの遺伝子材料を導入するメカニズムを利用するものである。

表1に、現在までによく用いられている動物細胞への代表的な遺伝子導入法について示した。1980年代までは、培養動物細胞への遺伝子導入法としてリン酸カルシウム法とDEAE-デキストラン法がよく用いられていた。これらの方法は、特別な装置を必要とせず、簡便に行えることが最大の利点である。当時すでにエレクトロポレーション法やマイクロインジェクション法も必要に応じて使われていたが、多数の細胞に対して簡便に行える方法としては試薬と混ぜて細胞にふりかけるだけといった簡便さから使用された。原理的には、リン酸カルシウムやDEAE-デキストランがDNAと複合体を形成して、その複合体が細胞表面に付着するとエンドサイトーシス

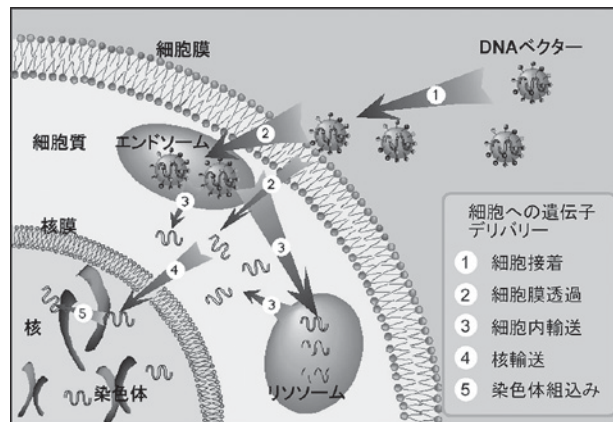


図1. 動物細胞への遺伝子導入における各段階

表1. 動物細胞への代表的な遺伝子導入法

分類	手法
物理・化学的	リポフェクション
	ポリカチオン
	リン酸カルシウム
	エレクトロポレーション
	マイクロインジェクション
生物学的	レトロ/レンチウイルスベクター
	アデノウイルスベクター

表2. 染色体への外来遺伝子の組込み

分類	手法
ランダムインテグレーション	偶発的な組込み
	レトロ/レンチウイルスベクター
	トランスポゾンベクター
ターゲットインテグレーション	相同組換え法
	リコンビナーゼシステム利用 (Cre- <i>loxP</i> , Flp- <i>FRT</i> , ϕ C31 など)
	ゲノム編集ツール利用 (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 など)

によって細胞内に取り込まれることによるとされている。これらの方法は簡便な一方で導入効率や再現性に問題があり、細胞種によって効率がかなりばらつくことや、細胞毒性を伴うことが問題点として指摘された。1990年代になってリポフェクション試薬¹⁾がこれらの方法にとってかわった。この方法は、主にカチオン性の人工脂質からなるリポソームを用いるもので、リポソーム法として報告されていたリポソーム内にDNAを封入するものとは異なり、DNAと混ぜることで静電的相互作用により複合体を形成させ、細胞の貪食作用や膜融合によって取り込ませるものである。多くの試薬メーカーから遺伝子導入用のリポフェクション試薬が開発・販売されるようになり、操作が簡単で細胞毒性が比較的強く高効率に遺伝子材料を細胞に導入する方法として、試薬は高価であるが多用されるようになった。現在まで、効率のさらなる向上や低毒性化のための改良が進められてきた。リポフェクション試薬での改良のターゲットは、エンドソームからの脱出（プロトンスポンジ効果の利用など）や核内輸送の促進、細胞内代謝促進といったものである。また、カチオン性脂質に比べて安価なトランスフェクション試薬として、ポリエチレンジアミンなどのポリカチオンも動物細胞への遺伝子導入に使われている。

リポフェクションなどトランスフェクション試薬を用いる遺伝子導入法は、動物細胞への遺伝子導入法の定番の一つとなっているが、細胞種によっては、依然として遺伝子導入が難しい場合もあり、こういった場合にはエレクトロポレーション法が用いられる。エレクトロポレーション法は、1980年代後半に開発された方法で、DNA溶液に懸濁した細胞に電気パルスを加えることによって細胞膜に微小な穴を生じさせ、その際にDNAを細胞内に取り込ませるものである。専用の装置を必要とするが、特殊な試薬が不要で汎用性が高く簡便なため、現在でも動物細胞への遺伝子導入法として多用され

ている。

物理・化学的な遺伝子導入法は、基本的に細胞内へ遺伝子材料を送り込むための方法であり、染色体に組み込むためのメカニズムを含んでいない。動物細胞では、非常に低頻度ではあるが細胞増殖の過程で偶発的に外来DNA材料が染色体に組み込まれることがあり、物理・化学的な遺伝子導入法で導入したDNAを染色体に組み込んで安定発現する細胞を得たい場合には、この現象を利用することになる。このため、DNA材料を細胞に導入後、偶発的に染色体に組み込まれた細胞をいかにして大多数のその他の細胞から選び出すかがポイントとなる。そのための方法として、目的の細胞を選抜するために選択マーカー遺伝子を同時に細胞に導入し、対応する選抜薬剤を添加した培養環境下における細胞の生存によってスクリーニングが行われる。細胞に導入したDNAが染色体に組み込まれる効率は細胞種によってかなり異なるが、千分の1以下の効率である。培養細胞で増殖によって無限に増やすことができる細胞の場合には、頻度は低くても選抜さえできれば上記の方法で取得することができる。表2に、動物細胞における外来遺伝子の染色体への組込み法についてまとめた。

遺伝子導入動物個体（トランスジェニック動物）を取得したい場合は、遺伝子導入の対象細胞が受精卵ということになり、培養細胞と異なり簡単に増殖させることはできないので、一つひとつの受精卵に確実に遺伝子を導入するための手段として、顕微鏡下でガラス針を受精卵の核に突き刺して遺伝子材料を注入するマイクロインジェクション法がとられる。これは、1980年代から標準的に行われてきたトランスジェニック動物作製法である（図2A）。この方法も注入したDNA材料が細胞分裂

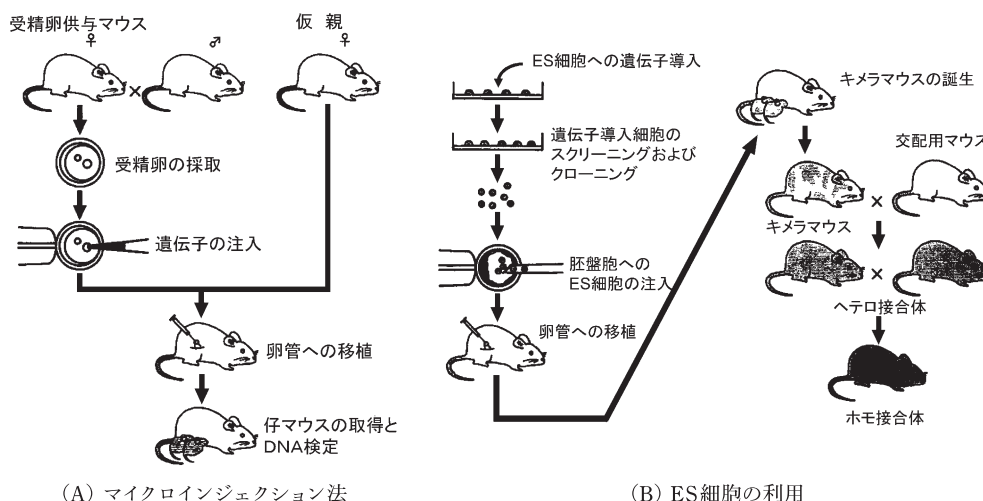


図2. トランスジェニック動物作製法²⁾

の過程で偶発的に組み込まれることを期待するものであるが、高濃度のDNA溶液を直接核に注入するため、導入遺伝子が染色体に組み込まれた個体が得られる効率は数%以上にのぼる。単なるDNA溶液のマイクロインジェクションによるトランスジェニック動物作製法では、導入遺伝子の染色体での挿入部位は不特定（ランダム）となる。導入遺伝子を任意の染色体部位へ組み込みたい場合は、相同組換え法が用いられてきた。これは、目的の遺伝子を組み込みたい染色体部位の相同領域の遺伝子配列で挟んだものを調製して細胞に導入することで、細胞の修復メカニズムによって導入した遺伝子が置換され、目的遺伝子が標的染色体部位に組み込まれるものである。染色体に目的遺伝子が組み込まれた細胞で、標的部位に組み込まれた細胞とランダムに組み込まれた細胞をより分けることができるスクリーニングシステムを組み込んだベクター（ターゲティングベクター）の開発により効率的に目的細胞の取得ができるようになっていところがミソであり、ベクター側の工夫による方法ということになる。ゲノム編集技術が出現する前は、染色体部位特異的な遺伝子改変は、相同組換えに基づくジーンターゲティングが唯一の方法であった。動物細胞での相同組換えの頻度は、ランダム組込みと比べて低いため、受精卵へのマイクロインジェクションによる方法は特定染色体部位を改変した個体を得る方法として現実的ではなかった。マウスでは1980年代中盤に胚性幹細胞（ES細胞）が樹立され、マウスES細胞は胚に戻すことによって体組織のみならず生殖細胞にも分化することから、ES細胞由来の遺伝子を有するマウスの作出が可能である（図2B）。これによってマウスでは、培養細胞であるES細胞に相同組換え用ベクターを遺伝子導入して相同

組換えによって目的の染色体部位を改変したES細胞を取得後、そのES細胞を胚に戻すことによって遺伝子改変したES細胞由来の遺伝子バックグラウンドを持つトランスジェニックマウスの作製が可能であり、特定染色体部位を改変したマウスを作製するための確立した方法となった。

一方で、1980年代から1990年代にかけて動物細胞への遺伝子導入法として代表的なウイルスベクターが開発された。アデノウイルスベクターとレトロウイルスベクターである。ウイルスベクターでは、本来ウイルスが有している複製能や病原性などの害となる部分を削除し、遺伝子導入において必要な部分を残すことによってベクター化された。これらは遺伝子治療用のベクターとして開発されたが培養細胞への遺伝子導入法としても使われる。アデノウイルスベクターは、2本鎖DNA型ウイルスをベースとするもので、高力価のウイルス溶液を調製でき、染色体に組み込まれず非分裂細胞への遺伝子導入が可能であるという特徴を有するが、細胞毒性があり生体内での使用としては抗原性が高いといった短所を有する。レトロウイルスベクターは、導入遺伝子を染色体に組み込むことができる点に最大の長がある。他にもウイルスベクターにはアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターやヘルペスウイルスベクターなどがある。ウイルスベクターによる遺伝子導入では、ウイルスベクター自身を遺伝子導入によって細胞（ウイルスパッケージング細胞）で生産させる必要があるため、物理・化学的な遺伝子導入法と比べて簡便とはいえない。そのため、ウイルスベクターの利用が効果的であり、他の方法では代替が難しい場合に使用される。そういった観点では、動物細胞への遺伝子導入法としてもっとも利用されているウイ

ルスベクターはレトロウイルスベクターである。レトロウイルスベクターでは、物理・化学的な遺伝子導入法では困難である細胞染色体への遺伝子組込みを高効率に行うことが可能である。レトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルス (mouse leukemia virus; MLV) をベースとしたものが複製能欠損型ベクターとして1990年代前半に完成した。その後開発されたヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus; HIV) をベースとするものもレトロウイルスベクターの一種であるため、それぞれを区別するためにMLVベースのものをガンマレトロウイルスベクター、HIVベースのものをレンチウイルスベクターとよんでいる (単にレトロウイルスベクターという時は、MLVベースのものを指す場合が多い)。レトロウイルスベクターは、ウイルス粒子内に逆転写酵素や組込み酵素 (インテグラーゼ) といった機能タンパク質を有しており、ウイルス表面のエンベロープタンパク質を介して細胞表面レセプターに結合後、細胞内でウイルス機能タンパク質の作用によってウイルスゲノムからの2本鎖DNA生成および染色体への組込みが起こる。ガンマレトロウイルスでは細胞内でウイルスゲノム複合体は核膜を透過することができないので、染色体組込みの際に細胞分裂時の核膜消失が必須となっているが、レンチウイルスは核膜透過のメカニズムを有しているため、非分裂細胞への染色体組込みも可能となっている。レトロ/レンチウイルスは元来エンベロープタンパク質によって宿主特異性が決まっているが、レトロ/レンチウイルスベクターのエンベロープタンパク質として汎感受性エンベロープであるVSV-G (vesicular stomatitis virus glycoprotein) を用いることによって細胞種・生物種をこえた動物細胞への染色体組込みが可能である。iPS細胞の作製では、多数の遺伝子を染色体に高効率に組み込む必要があるためレトロウイルスベクターが使われた。マイクロインジェクション法に比べて簡便かつ高効率にトランスジェニック動物を作出する方法としてレトロ/レンチウイルスベクターは非常に有効な手段であり、2000年代には多用されていた³⁾。他のシステムのみか、メカニズムを組み込むことによってウイルスベクターの高機能化が試みられておりハイブリッドウイルスベクターとよばれている⁴⁾。

非ウイルスの遺伝子導入法で動物細胞染色体に目的遺伝子を組み込む方法としてトランスポゾンベクターがある。代表的なものにSleeping BeautyシステムやPiggyBacシステムがある。1990年代から2000年代に入ってベクター開発が行われ利用され始めた。トランスポゾンベクターでは、ITRで挟まれた目的遺伝子を含むベクターと

転移酵素 (トランスポザーゼ) の発現ベクターを細胞に共導入することで転移酵素の作用によってITRで挟まれた遺伝子が染色体に組み込まれる。トランスポゾンでの遺伝子の組込みと切り出しは可逆なので、染色体に導入した遺伝子を後で切り出すことも可能である。これらはプラスミドとして供給されるので、一般には、細胞への導入に物理・化学的遺伝子導入法が用いられる。

レトロ/レンチウイルスベクターやトランスポゾンベクターといった酵素的に目的遺伝子を染色体に組み込む遺伝子導入法は、偶発的な遺伝子組込みと比べて格段に効率が高い。しかしこれらの方法は、組込み先が特定されないため組み込まれた先の遺伝子の変異を引き起こしたり、導入遺伝子発現の不安定性やサイレンシングの原因となる場合もある。染色体の任意の部位への遺伝子導入には、ターゲティングベクターを用いる相同組換え法が唯一の方法であったが導入効率が低いため、先に述べたジーンターゲティングされたトランスジェニックマウス作製のためのES細胞への遺伝子導入など限られた場合にしか用いられなかった。2000年代に入って大規模遺伝子配列解析技術の進歩によりさまざまな生物種のゲノム配列解析が行われるようになり、染色体上で導入遺伝子が安定的に高発現可能な部位も明らかとなってきた。物質生産のための遺伝子や遺伝子治療における治療遺伝子をそういった部位に導入したいという要求が高まってきている。動物細胞染色体上のあらかじめ決められた部位への遺伝子導入に、Cre-*loxP*, Flp-*FRT*, ϕ C31システムといった配列特異的な組換え酵素 (リコンビナーゼ) システムを利用することも行われている。この場合、あらかじめリコンビナーゼのターゲットサイト配列を、外来遺伝子を導入したい染色体部位に組み込んでおく必要はあるが、リコンビナーゼによってその染色体部位に繰返し導入することも可能となっている^{5,6)}。

ゲノム上の任意の遺伝子配列を認識してDNAの2本鎖切断を誘発する人工制限酵素をゲノム改変のツールとして用いる方法、いわゆるゲノム編集技術 [Zinc-finger nuclease (1996–2003), TAL effector/TAL nuclease (2009–2010), CRISPR-Cas9 (2013–)]⁷⁾ の出現によって動物細胞への遺伝子導入に新しい基軸が生まれた。この技術によって、受精卵へのマイクロインジェクション法でジーンターゲットされたトランスジェニック動物の作製が行えるようになった。CRISPR-Cas9を用いる方法では、相同組換えベクター存在下において、相同組換えを期待する染色体部位での2本鎖DNA切断により、相同組換えの効率がDNA切断をしない場合と比べて数百倍向上することが報告されている。ゲノム編集技術を応用した

染色体部位特異的遺伝子導入法(ターゲットノックイン)も方法の改良が進められている。最近の報告では、ベクターに組み込む相同配列がなくても標的部位への高い組み込み効率が達成できるとのことである⁸⁾。しかし、これらのゲノム編集ツールは、染色体上の任意の配列を切断する技術であり、目的遺伝子の組み込みは細胞の修復システムに依存するものとなっているため、先に示したりコンビナーゼを用いる遺伝子組み込みと比べると組み込み効率は依然として低い。将来的には2本鎖DNA切断の修復時に積極的に目的遺伝子を組み込むメカニズムを導入することが効率および確実性の向上に必要と考えられる。ゲノム編集技術はシステムであり、システムの細胞へのデリバリーには、上記で述べたような物理・化学的な導入手法が使われることになる。

おわりに

ここでは取り上げなかったが、遺伝子銃(パーティクルガン)やソノポレーションなど特徴をもった遺伝子導入法も開発されている。大きな遺伝子を扱うための人工

染色体ベクターも利用されている。画期的な新技術が従来技術にとってかわるのは世の常であり、そういった技術の出現は、研究者にとって心躍るものがある。近年話題のゲノム編集技術もさらに進化をはたし、SF映画にあるような夢のような技術に近づくことを期待したい。

文 献

- 1) Felgner, P. L. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7413 (1987).
- 2) 佐田栄三・砂本順三 編: バイオケミカル・エンジニアリング—生物工学基礎コース—, p. 133, 丸善 (1997).
- 3) Kamihira, M. *et al.*: *J. Virol.*, **79**, 10864 (2005).
- 4) Huang, S. and Kamihira, M.: *Biotechnol. Adv.*, **31**, 208 (2013).
- 5) Kameyama, Y. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **105**, 1106 (2010).
- 6) Wang, X. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 583 (2017).
- 7) Doudna, J. A. and Charpentier, E.: *Science*, **346**, 1077 (2014).
- 8) Suzuki, K. *et al.*: *Nature*, **540**, 144 (2016).