

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04606

研究課題名(和文) 受精卵への簡便なゲノム編集ベクター導入法の開発

研究課題名(英文) Application of lipofection-mediated genome editing in mouse zygotes created by IVF via ultra-superovulation

研究代表者

中潟 直己 (Nakagata, Naomi)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授

研究者番号：30159058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、高額な装置と高度な技術を必要とするマイクロインジェクション法を用いることなく、当センターの生殖工学技術や設備を活用し、受精卵への簡便なゲノム編集技術導入法の開発を目的とした。使用したリポフェクション法は、核酸とトランスフェクション試薬の混合液を受精卵の培養液へ添加するだけで、多くの卵を一度に処理できる利点があるため、非常に簡便な方法であり、この方法が受精卵への核酸導入およびゲノム編集個体作製に利用可能であったことから、本研究は、今後の遺伝子改変マウス作製およびその応用研究に大いに貢献できると考える。ただし、実用的な個体作製には、効率改善が必要であり、今後更に条件検討を行う必要がある。

研究成果の概要(英文)：Recently, genome editing in mouse zygotes has become convenient and scalable, in association with various technological developments and improvements such as novel nuclease tools, alternative delivery methods, and contemporary reproductive engineering techniques. We have so far demonstrated the applicability of ultra-superovulation, in vitro fertilization (IVF), and vitrification/warming of zygotes in microinjection-mediated mouse genome editing. Here, we present an example of an application coupling the following three technologies: 1) CRISPR-Cas9 system as the most convenient genome-editing technology, 2) lipofection as the most simple, economical and effortless delivery method, and 3) cryopreserved oocytes created by IVF via ultra-superovulation as the most animal welfare- and user-friendly strategy. We successfully created gene knockout mice carrying insertion/deletion mutations.

研究分野：生殖工学

キーワード：マウス ゲノム編集 受精卵 核酸導入

1. 研究開始当初の背景

マウスは、様々な分野の研究に欠かせない実験動物として世界中の研究者が利用している。その理由として、飼育管理が行いやすいことに加え、遺伝的に均一な性質をもつ近交系の確立、体外受精や胚移植などの生殖工学技術の確立、様々な遺伝子機能を調べるための遺伝子改変マウスやヒト疾患モデルマウスの作製・解析法の確立など、他の実験動物よりも研究上有利なことがあげられる。これまで、ES細胞を用いた標的遺伝子の改変により、ノックアウトマウスやノックインマウスの作製が行われてきた。しかしながら、近年、受精卵へのマイクロインジェクション法とジンクフィンガーヌクレアーゼ (zinc-finger nuclease; ZFN) や TALE ヌクレアーゼ (transcription activator - like effector nuclease; TALEN)、CRISPR-Cas システム等のゲノム編集技術を組み合わせることにより、高速な遺伝子改変マウスの作製が可能となった。そのため、実験動物としてのマウスの利用は今後も増加し、受精卵を用いたゲノム編集研究の需要も急増することが予想される。

2. 研究の目的

受精卵へのマイクロインジェクションには、高額な装置と高度な技術が必要であり、誰もが容易に行うことができる方法とは言い難い。当センターではマウス胚・精子の凍結バンク業務だけでなく、効率的な遺伝子改変マウスの作製および様々な生殖工学技術の開発・改良・確立を目的として研究を行っている。そこで、本研究では、当センターの生殖工学技術や設備を活用し、マイクロインジェクション法を用いない、受精卵への簡便なゲノム編集技術導入法の開発を目的とした。

これまでに報告されているリポフェクション法を利用した受精卵への核酸導入では、Esponda らの受精卵へのプラスミド DNA 導入によるトランスジェニックマウス作製の試み (Mol. Rep. Dev., 56: 360-365, 2000、Zygote, 10: 209-216, 2002) やウシ受精卵での siRNA によるノックダウンの試み (Rep. Fert. Dev., 23: 534-543, 2011) が行われている。しかしながら、論文数は非常に少なく、広範な研究に使用されるまでには至っていない。また、Esponda らは透明帯を完全に除去せずとも酸性タイロートにて短時間処理するだけで、プラスミド DNA の導入が可能と記述しているが、当研究室で確認したところ、酸性タイロートにて短時間処理し、透明帯を薄くするだけではプラスミド DNA の導入ができず、透明帯を完全に除去しなければ、その導入を確認することはできなかった。

受精卵に適した、卵への毒性が低く、産子への発生率も良好なりポフェクション試薬を選別できれば、これまでに報告のないリポフェクション法を利用したゲノム編集個体

作製が可能となる。そのため、本研究では、まず、透明帯除去受精卵(裸化卵)を用いて、リポフェクション法による簡便な受精卵へのゲノム編集用ベクターの導入法を開発し、次に、透明帯が存在しても受精卵内に核酸が取り込まれ、ゲノム編集個体の作製が可能となる方法の開発を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

簡便に効率よく研究を進めるため、過排卵処理した雌マウスと個別飼育の雄マウスを交配し、雌マウスから採卵する従来法ではなく、体外受精にて作製した凍結融解受精卵を研究に用いることとした。裸化卵を用い、レポーター遺伝子を含むベクターを導入することにより、現在販売されている様々な核酸導入試薬のうち、導入効率が高く、受精卵の生存率やその後の胚発生への毒性が低い試薬を選定した。選定した試薬を用い、マイクロインジェクション法にて変異導入効率を確認した実績のあるゲノム編集ベクターを受精卵へ導入し、培養した。胚盤胞期胚を回収し、標的配列を PCR により増幅し、シーケンシング解析による変異導入の確認を行った。変異導入が確認できた条件で核酸導入後、培養した胚盤胞期胚を仮親の子宮へ移植した。

透明帯が存在しても受精卵内に核酸が取り込まれるような方法を開発するため、選定したりポフェクション試薬を使用し、透明帯無処理受精卵や透明帯菲薄化受精卵、透明帯穿孔受精卵へのゲノム編集ベクター導入を検討した。

4. 研究成果

受精卵でのゲノム編集を容易にし、様々な研究へのアプローチに役立つ技術開発をめざし、簡便なりポフェクション法による受精卵へのゲノム編集用ベクター導入法の開発を目的として研究を行った。

裸化卵を用いた研究により、受精卵の培養液へ直接添加でき、核酸導入効率が高く、卵の生存率や胚発生率の良いリポフェクション試薬を9種の中から1種選定した。既にマイクロインジェクション法にて変異導入効率を確認済のゲノム編集プラスミド DNA ベクターあるいは TALEN mRNA を裸化卵へ導入し、PCR 産物のシーケンシング解析を行ったところ、変異配列導入胚を高効率に得ることができた。そこで、ゲノム編集用核酸を導入した裸化卵を培養し、胚盤胞期胚を仮親の子宮へ移植した。しかしながら、裸化卵の使用では、リポフェクション処理や仮親への胚移植作業が困難なうえ、産子への発生率が極めて低率かつ変異個体が得られなかったことから、以下3通りの受精卵へのゲノム編集ベクターの導入を試みた。(1)無処理受精卵への核酸導入。試薬量やリポブックス複合体作製時のメディウム検討等を行い、卵が死滅することなく、正常発生可能な極限まで高濃度の

リポフェクション処理を検討したが、胚盤胞期胚の解析において変異導入を確認することはできなかった。(2)透明帯菲薄化処理後の核酸導入。当研究室で透明帯菲薄化作用を確認済みの還元型グルタチオン、あるいはマウスや家畜の受精卵において広範に使用されている透明帯除去試薬(酸性タイロド、プロナーゼ、コラゲナーゼ)を用いて、受精卵の生存や発生に毒性を与えない程度の透明帯菲薄化処理を行い、核酸導入後、胚盤胞期胚の解析を行ったところ、一部の実験区において、若干、標的配列への変異導入を確認することができた。胚移植を行い、得られた産子を解析したが、変異導入を確認することはできなかった。(3)透明帯穿孔処理後の核酸導入。当研究室に設置済みのレーザー装置を用いて透明帯を穿孔し、核酸導入後、胚盤胞期胚を解析したところ、標的配列への変異導入を確認することができた。胚移植後の産子の解析においても、変異導入を確認することができ、現在、この変異が次世代へ伝達されるかを確認するため、交配を行っている。

また、これまで本研究と平行して進めてきたマイクロインジェクション法を用いたゲノム編集個体の作製において、ゲノム編集可能な核酸(プラスミドDNAやmRNA)に限らず、合成gRNAおよびCas9タンパク質の複合体(Ribonucleoprotein; RNP)を使用することにより、産子への発生率、変異導入効率共に良好な成績が得られたことから、リポフェクション法によるRNPの導入についても検討した。今回の検討では、RNPの導入による変異導入効率の改善を確認することはできなかったが、今後も検討を続ける予定である。

本研究では多くのマウス受精卵を作製する必要があったが、当研究室で開発した新規の超過排卵誘起法を用いることによって、通常の過剰排卵誘起法を用いた場合に比べ、雌1匹あたり2~3倍多くの卵を採取することが可能となり、効率的に受精卵を作製することができた。さらに、広島大学の山本研究室と連携して研究を進めることにより、本研究に必要なゲノム編集ベクターや合成gRNA等を速やかに作製および供与いただいた。山本研究室と頻りに意見交換を行い、技術協力をいただくことにより、確かなゲノム編集技術を用いて本研究課題に取り組むことができた。

本研究と平行し、ゲノム編集技術とマイクロインジェクション法を用いたゲノム編集個体の作製を進め、超過排卵誘起法を用いた体外受精凍結受精卵の利用、導入するベクターや核酸種の違い、使用受精卵のステージによる産子への発生率やゲノム編集効率の差異等を精査することにより、本研究課題を効率よく進めるための基盤作りを行うことができた(文献、)。)

リポフェクション法は、核酸とトランスフェクション試薬の混合液を受精卵の培養液へ添加するだけで、ベクターの導入が可能な

方法である。高額な装置や高度な技術も必要なく、多くの卵を一度に処理できる利点があるため、非常に簡便な方法であり、この方法が受精卵への核酸導入およびゲノム編集個体の作製に利用可能であったことから、本研究は、今後の遺伝子改変マウス作製およびその応用研究に大いに貢献できると考える。ただし、実用的な変異導入個体の作製には、効率改善が必要であり、今後、更に条件検討を行う必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 30 件)

Culture time of vitrified/warmed zygotes before microinjection affects the production efficiency of CRISPR-Cas9-mediated knock-in mice. Nakagawa Y, Sakuma T, Nishimichi N, Yokosaki Y, Takeo T, Nakagata N, Yamamoto T. Biol Open.6(5):706-713 (2017). 査読有

Ultra-superovulation for the CRISPR-Cas9-mediated production of gene-knockout, single-amino-acid-substituted, and floxed mice. Nakagawa Y, Sakuma T, Nishimichi N, Yokosaki Y, Yanaka N, Takeo T, Nakagata N, Yamamoto T. Biol Open., 5: 1142-1148 (2016). 査読有

Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed fertilized oocytes. Nakagawa Y, Sakuma T, Sakamoto T, Ohmuraya M, Nakagata N, Yamamoto T. BMC Biotechnol., 15: 33 (2015). 査読有

[学会発表](計 195 件)

中川佳子、中瀧直己 他 13 名
CRISPR-Cas システムを用いたノックインマウス作製における凍結受精卵培養時間の検討 第 64 回日本実験動物学会総会 2017 年 5 月 25-27 日 福島県郡山市

中川佳子、中瀧直己 他 5 名
CRISPR-Cas システムを用いたノックインマウス作製における凍結受精卵培養時間の検討 日本ゲノム編集学会 第 2 回大会 2017 年 9 月 28-30 日 大阪府大阪市

Yoshiko Nakagawa, Tetsushi Sakuma, Norihisa Nishimichi, Yasuyuki Yokosaki, Toru Takeo, Naomi Nakagata, and Takashi Yamamoto. Culture time of zygotes before microinjection affects the production efficiency of CRISPR-Cas9-mediated knock-in mice. 2nd

annual Genome Editing & Engineering Conference 2017年2月6-7日、アメリカ合衆国サンディエゴ

中川佳子、中瀧直己 他13名
CRISPR-Cas システムによる遺伝子破壊マウスの作製 - 超過剰排卵誘起法を用いた凍結受精卵の利用 - 第63回日本実験動物学会総会 2016年5月18-20日 神奈川県川崎市

中川佳子、中瀧直己 他6名
CRISPR-Cas システムによる様々なゲノム編集個体の作製 - 超過剰排卵誘起法を用いた体外受精凍結卵の利用 - 日本ゲノム編集学会 第1回大会 2016年9月6-7日 広島県 広島市

中川佳子、中瀧直己 他13名
CRISPR-Cas システムによる flox マウスの作製 - 超過剰排卵誘起法を用いた凍結受精卵の利用 - 第50回日本実験動物技術者協会総会 2016年9月29日-10月1日 埼玉県川越市

中川佳子、中瀧直己 他4名
凍結受精卵を用いた CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子破壊マウスの作製 第62回日本実験動物学会総会 2015年5月28-30日 京都府京都市

〔図書〕(計 2 件)

著者名：中瀧直己
出版社名：羊土社
書名：マウス表現型解析スタンダード 胚および配偶子の凍結・冷蔵保存とその応用(第6章) 311-316、熊本大学 CARD マウスバンクシステム(第7章) 332-338
発行年：2016年
総ページ数：351

著者名：中瀧直己
出版社名：羊土社
書名：実験医学 Vol.35 No.11 バイオ研究施設の震災対策－熊本地震における実験動物施設の被災・復旧からのレッスン 1862-1866
発行年：2017年
総ページ数：141

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：マウス精子の冷蔵保存液および保存方法
発明者：竹尾 透、吉本英高、中瀧直己
権利者：竹尾 透、吉本英高、中瀧直己
種類：特許
番号：特願 2016-230757 号
出願年月日：平成 28 年 11 月 29 日
国内外の別：国内

取得状況(計 1 件)

名称：新規過剰排卵誘起処理によるマウス卵子の大量作製法
発明者：中瀧直己、竹尾透
権利者：同上
種類：特許
番号：特許第 5927588 号
取得年月日：平成 28 年 5 月 13 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
http://irda.kuma-u.jp/divisions/reproductive_engineer/reproductive_engineer.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中瀧 直己 (Nakagata Naomi)
熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授
研究者番号：30159058

(2) 研究分担者

中川 佳子 (Nakagawa Yoshiko)
熊本大学・生命資源研究・支援センター・特任助教
研究者番号：30732739

(3) 連携研究者

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

佐久間 哲史 (Sakuma Tetsushi)
広島大学・大学院理学研究科・講師
研究者番号：90711143

(4) 研究協力者