

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07695

研究課題名(和文) 独自システムによるホモK0マイクロミニブタ細胞の効率的濃縮とその応用

研究課題名(英文) Efficient enrichment of homozygous bi-allelic knockout microminiature porcine cells using a novel selection system and production of genome-edited cloned piglets

研究代表者

佐藤 正宏 (SATO, Masahiro)

鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・教授

研究者番号：30287099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、CRISPR/Cas9と呼ばれるゲノム編集法を用いて遺伝子改変ブタ細胞を作製し、これをドナーとする体細胞核移植を通じてクローン個体を作製することができるようになった。現行法では、ピュアなゲノム編集細胞を濃縮するには難があった。そこで、本研究では、我々が独自に開発したtargeted toxin法を用いて効率よく複数の標的遺伝子が破壊されたブタ細胞株を取得する検討を行った。その結果、ほぼすべての細胞で標的遺伝子に変異が見られた。一部の細胞株を体細胞核移植に付すと胚盤胞までの発生が認められたが、移植後の発生は失敗した。今後、移植後の胚発生を担保する細胞の選別を行う必要がある。

研究成果の概要(英文)：Somatic cell nuclear transfer (SCNT) has been employed as one of the efficient tools for the production of genetically modified (GM) pigs. The GM cell isolation used for SCNT is often difficult due to occasional contamination of untransfected cells. We here used a novel approach for enrichment of porcine cells after introduction of CRISPR/Cas9 components. A single guide RNA targeted to GAAT1 gene, involved in the synthesis of cell-surface α -Gal epitope, is a prerequisite. When the transfected cells were reacted with toxin-labeled IB4 for to eliminate α -Gal epitope-expressing cells, the surviving clones lacked α -Gal epitope expression and were highly expected to exhibit induced mutations at another target loci. SCNT using these cells as donors successfully resulted in the production of cloned blastocysts with genome-edited nuclei. Thus, this novel system will be useful for SCNT-mediated acquisition of GM cloned piglets..

研究分野：応用動物科学

キーワード： α -Gal epitope GAAT1 CRISPR/Cas9 targeted toxin genome editing isolectin IB4 LDLR

1. 研究開始当初の背景

ブタを含む哺乳類種動物ゲノム内の特定の遺伝子を標的とした遺伝子破壊 (gene targeting) は、遺伝子機能解析、疾患モデル動物開発の上で強力なツールとなりえる。これまでの方法は、標的遺伝子の一部および細胞選択マーカーを利用した標的遺伝子破壊用ベクター (gene targeting vector) の構築、それを用いた細胞への遺伝子導入、細胞の薬剤選別、gene targeting を引き起こした細胞株の単離、それを用いた核移植あるいは正常胚とのキメラ胚作製という非常に複雑な、且つ時間と労力を伴う方法を採用せざるを得なかった。しかし、2013年より登場したゲノム編集技術によりより簡便に、より短時間に細胞あるいは胚ゲノム内の標的遺伝子を破壊することが可能になった。特に、CRISPR/Cas9 と呼ばれる方法は、広範に採用されており、Cas9 (endonuclease の一つ) をコードする遺伝子を内蔵するプラスミドあるいはその mRNA やタンパク、更に、標的遺伝子部位に特異的に結合する guide RNA を組み合わせて細胞や胚に導入すれば、直ちに標的遺伝子が破壊 (knockout, KO) された、所謂、ゲノム編集細胞/胚を手にする事ができる。

CRISPR/Cas9 の基本原理は、guide RNA/Cas9 複合体が、標的遺伝子に特異的に結合し、直ちに、切断する、その後、DNA 修復のための non-heterogenous endo joining (NHEJ) が起こる結果、塩基配列の挿入あるいは欠失などのいわゆる indel mutation が生じる。その結果、標的遺伝子がコードするアミノ酸配列が変わり (frame-shift)、本来のものとは異なるタンパクが生まれる。また、時として、蛋白合成終止コドン (TGA, TAA, TAG) が生じた場合には、アミノ酸合成の早期終了 (premature termination of protein synthesis) が誘導される。

本研究では、1) このような最近開発された次世代型 KO と呼ばれる CRISPR/Cas9 を用いてブタ (マイクロミニブタ) 胎仔由来の繊維芽細胞 (MPEF) ゲノム内の特定遺伝子 (異種移植関連遺伝子 alpha-1,3-galactosyltransferase [alpha-GalT] や動脈硬化責任遺伝子 low density lipoprotein receptor [LDLR]) を完全に破壊し、2) これまでに独自に開発した KO 細胞のみを効率的に濃縮する系 (targeted toxin-based selection) を用いて alpha-GalT、LDLR 遺伝子が同時に破壊された遺伝子改変 MPEF 株が効率的に取得できるかを検討することを当面の課題とし、3) 最終的に遺伝子改変 MPEF 株をドナーとする体細胞核移植によるクローン胚の作製、クローン胚の受容、ブタ卵管移植による動脈硬化モデルブタ作製を試みる。

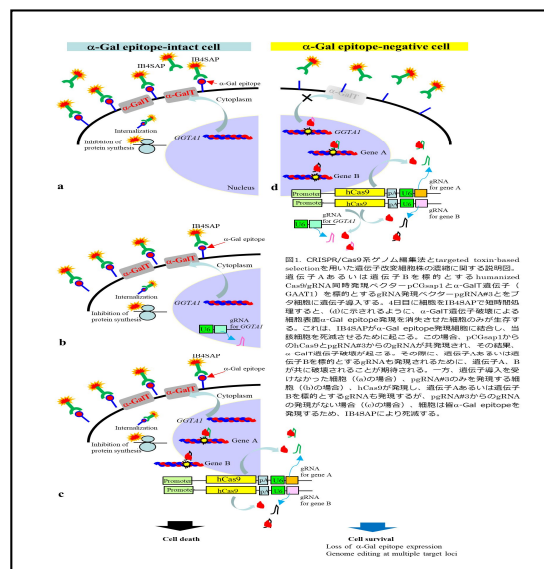
2. 研究の目的

次世代型 KO と呼ばれる CRISPR/Cas9 ゲノム編集系をマイクロミニブタのゲノム改変に適用し、特定の遺伝子が破壊された KO クローンブタを作製する。当該ブタ個体は LDLR 破壊に起因する動脈硬化を発症すると考えられ、動脈硬化治療薬開発に資する「動脈硬化モデル」動物作製が期待される。

3. 研究の方法

1) targeted toxin-based selection の概要

本研究では、MPEF に CRISPR/Cas9 系成分 (LDLR 遺伝子および α -GalT 遺伝子に変異を誘導する成分) を遺伝子導入し、導入後、図 1 に掲げる方法にて細胞を α -Gal epitope 発現細胞のみを特異的に排除するサポリン毒素結合 IB4 (IB4SAP; Advanced Targeting Systems Inc., San Diego, CA, USA) を短時間作用させ、その後生存した細胞コロニーを得ることから実験をスタートさせた。この IB4SAP を用いた特定の細胞の排除システムは、targeted toxin-based selection と呼ばれるもので、当グループが独自に開発したものである (Akasaka et al., Xenotransplantation 17, 81-89, 2010; Sato et al., Biology 2, 341-355, 2013)。



具体的には、以下のメカニズムとなる。 α -GalT は、細胞表面糖鎖の一種 α -Gal epitope を合成する。 α -Gal epitope はヒト細胞では発現されていないが、 α -Gal epitope に対する抗体は自然に備わる。従って、ブタ組織をヒトに移植した場合、ヒトの抗 α -Gal epitope 抗体が移植組織を攻撃し、超急性拒絶という拒絶反応が起こる。即ち、 α -Gal epitope は異種移植抗原になりえる。 α -Gal epitope の存在はそれに特異的に結合する BS-I-B₄ (IB4) と呼ばれる植物性レクチン染色により識別される。従って、 α -GalT 遺伝子の exon 4 にある ATG 近傍の DNA 配列を標的とした gRNA を含む発現ベクター (pgRNA#3) と Cas9 発現ベクター (pCas9) とを共遺伝子導入し、遺伝子導入から 4 日目に細胞を回収し、それを IB4SAP を含む液に 37 °C、2 h 漬け、その後、細胞を正常培地に培養すると、 α -Gal epitope の発現を示す細胞 (遺伝子改変がなかった細胞) は排除され、遺伝子改変細胞 (α -GalT 遺伝子が KO された細胞) のみが生存する。このような細胞は、 α -Gal epitope 陰性であり、それは、細胞を Alexa Fluor 594 標識 IB4 (AF594-IB4) で染色することで判明出来、且つ、分子生物学的解析から α -GalT 遺伝子に変異があ

ることが判った (Sato et al., Xenotransplantation 21, 291-300, 2014)。このことから、CRISPR/Cas9 系がブタでも適用できることが示された。従って、この場合、LDLR 遺伝子の ATG 近傍の DNA 配列を標的とした gRNA を含む発現ベクター (pgRNA for LDLR) を pgRNA#3 + pHCas9 と共に遺伝子導入すれば、targeted toxin-based selection 後、 α -GalT、LDLR 両遺伝子が同時に KO された細胞が得られることになる。このような細胞をドナーとする体細胞核移植を行えば、それから得られるクローンブタ個体、即ち、 α -GalT KO ブタ個体は正常であり、LDLR KO 個体は動脈硬化を発症すると期待される。

2) Cas9/gRNA 同時発現ベクター-pCGsap1 を基にした派生体 pCGsap1/LDLR の構築

gRNA と Cas9 を同時に発現するベクター pCGsap1 (Sakurai et al., Sci Rep 6, 20011, 2016) の Sap I 制限酵素部位に LDLR 遺伝子の ATG 直下の配列、いわゆる gRNA 配列となる 20 bp オリゴヌクレオチド (外部業者に合成委託) を挿入し、pCGsap1/LDLR を構築した。合成されたオリゴヌクレオチドが正しく pCGsap1 上の Sap I 部位に挿入されているかを sequencing により確認した。 α -GalT 遺伝子の exon 4 の ATG 近傍を標的とする gRNA 発現ベクター-pgRNA#3 は、既報 (Sato et al., Xenotransplantation 21, 291-300, 2014) に依る。これら CRISPR/Cas9 系プラスミドの MPEF への遺伝子導入の成否を判定するための EGFP マーカー遺伝子発現ベクターとして pEGFP-N1 (Invitrogen) を用いた。これらベクターは、定法に従い、大腸菌 (DH5 α 株; TaKaRa Shuzo, Shiga, Japan) で増やし、最終的に Qiagen 社によるプラスミド精製キット (Plasmid DNA Isolation Midi Kit; Qiagen GmbH, Hilden, Germany) を用い、精製した。

3) MPEF への CRISPR/Cas9 系ベクターの導入と遺伝子導入株の単離

MPEF (10⁶ cells) を 3 種のプラスミド pCGsap1/LDLR、pgRNA#3、pEGFP-N1 を含む液に混ぜ、Lonza Nucleofector system による electroporation を行った。翌日、pEGFP-N1 による蛍光発現程度を確認した後、細胞を正常培地にて 3 日間培養した。その後、細胞を回収し、それを IB4SAP (80 μ g/mL) を含む溶液に懸濁させ、37 °C、2 h 処理した。細胞は全て 60-mm gelatin-coated dishes (正常培地を含む) に播種し、10-13 日間コロニーが出現するまで培養した。生じたコロニーは、トリプシン処理後、plastic tip で拾い上げ、48-well plate の well に投じ、step-by-step で細胞を拡大する。その過程で、一部の細胞を AF594-IB4 (2 μ g/mL) を含む液にて反応させ、AF594 由来の赤蛍光を観察。赤蛍光陰性コロニー (α -GalT 遺伝子がホモ KO 状態) のみを拡大培養後、一部は、ゲノム DNA 精製に回し、残りは核移植まで凍結保存する。

4) 遺伝子導入株の解析

細胞から定法に従い、ゲノム DNA を精製した。次に、標的遺伝子が変異を起こすと想定される領域を PCR にて増幅し、最終的にその産物を Sanger 法による direct sequencing に付した。

場合によっては、PCR 産物を TA cloning vector に挿入させ、それを sequencing に付した。

5) 体細胞核移植

体細胞核移植の詳細は、既報 (Miyoshi et al., Cloning Stem Cells 8, 159-165, 2006; Miyoshi et al., J. Reprod. Dev. 54, 42-45, 2008; Himaki et al., J. Reprod. Dev. 58, 398-403, 201) に依る。体細胞核移植胚は、一部は胚盤胞まで養し、分子生物学的解析、免疫細胞化学染色に付した。また、一部は、受容ブタ卵管に移植し、クローン個体作製を行った。

4. 研究成果

先ず、LDLR 遺伝子の ATG 近傍の DNA 配列を標的とした gRNA と Cas9 を同時に発現するベクター (pCGsap1/LDLR) を pgRNA#3 (α -GalT 遺伝子を標的とした gRNA 発現ベクター) と共に MPEF へ遺伝子導入した。LDLR は cholesterol-rich LDL の細胞内取り込みを仲介する膜結合型受容体で、血中内 LDL レベルの恒常性維持に絡む。LDLR 遺伝子の変異は、familial hypercholesterolemia 発症を誘発するとされる。ブタでも既に LDLR 完全欠損が達成されており、当該ブタは動脈硬化症を発症する (Davis et al., PLoS One 9, e93457, 2014)。図 2A に示されるように、遺伝子導入後、細胞は IB4SAP で短時間処理され、その後、コロニーが生じるまでの間、正常培地にて 10 日間以上培養に付された。生じたコロニーを拾い上げ、最終的に 7 個の clone (LA-1 ~7 と命名) を得た (Table 1)。AF594-IB4 を用いた細胞染色から、7 個の clone の内 5 clone はその染色が完全に陰性であった (図 2B)。これら clone からゲノム DNA を精製し、変異を有すると目される LDLR、 α -GalT 遺伝子部分を PCR で増幅 (図 2C)。この産物を direct sequencing に付した。その結果、 α -Gal epitope 陰性であった 5 clone は ATG と protospacer adjacent motif (PAM) の間に indels が認められ (代表例として、LA-2、-6 の結果を図 2D に提示) 明らかに野生型 α -GalT とは異なるタンパクが作られていることが判った (Table 1)。LA-2、-6 とともに sequencing の波形 (ideograms) に乱れがないことから、いずれも α -GalT 遺伝子については bi-allelic なホモ KO と判定された。一方、LDLR 遺伝子部分を PCR で増幅した産物を解析すると、5 個の α -Gal epitope 陰性 clone は全て LDLR 遺伝子について mono-allelic ヘテロ KO (LA-2、-5、-7) か bi-allelic ホモ KO (LA-4、-6) であった (図 2D; Table 1)。図 2D には、LA-2、-6 clone の direct sequencing の結果を示してある。LA-2 サンプルは ATG の下流側に波形の乱れが見られることから、複数の変異の存在が示唆された。しかし、LA-6 サンプルはそのような乱れがないことから、LDLR 遺伝子については bi-allelic ホモ KO と考えられた (Table 1)。実際、LA-6 サンプルについて得られた PCR 産物を TA cloning vector に挿入し、sequencing を行ったところ、調べた subclone 全てで同一部位での 1 塩基の挿入が認められた (図 2D)。これから推定されるアミノ酸配列は、MKFHGLGP-とな

り、本来のもの (MKSTGWL--)とは異なるタンパクが生成されることが予想された。実際、LDLR抗体で細胞を免疫染色すると、LA-6 cloneはその染色性が陰性であった (図 2E)。以上から、LA-6 clone では α -GalT 遺伝子、LDLR 遺伝子どちらも bi-allelic ホモ KO と判断され (Table 1)、これをドナーとする体細胞核移植を行った。発生した 2 細胞期胚を受容 プタ卵管に移植した (50~100/頭) 2 頭の の内、1 頭は超音波検査で胎仔の存在を示唆する陰影が取れたが、時間経過とともに消失。結局、産仔は得られなかった。体細胞核移植後、胚は胚盤胞までは発生

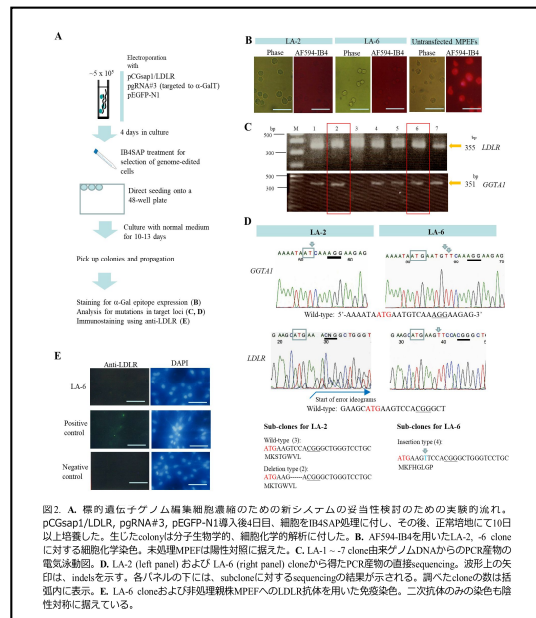


図2. 標的遺伝子ゲノム編集細胞選育のための新システムの妥当性検討のための実験的流れ。pCrisp1-LDLR、pGRM4#2、pGFP-N1を導入後4日目、細胞をIB45AP処理し、その後、正常増殖にて10日以上培養した。生じたcolonyは分子生物学的、細胞化学的解析に付した。B. AF594-IB4を用いたLA-2、6 cloneに対する細胞化学染色。未処理MPEFは陽性対照に扱った。C. LA-1 ~7 clone由来ゲノムDNAからのPCR産物の電気泳動図。D. LA-2 (left panel) および LA-6 (right panel) cloneから得たPCR産物の塩基配列。波形上の矢印は、indelsを示す。各パネルの下には、subcloneに対するsequencingの結果が表示される。調べたcloneの数は括弧内に示す。E. LA-6 cloneおよび非処理親細胞MPEFへのLDLR抗体を用いた免疫染色。二次抗体のみの染色も陽性対照に扱っている。

Table 1. Characterization of MPEF clones, LA-1 to 7, after transfection and subsequent selection with IB45AP.

Property	Loci targeted	Clones						
		LA-1	LA-2	LA-3	LA-4	LA-5	LA-6	LA-7
Direct sequencing of PCR products ¹	GGTAI	Normal	Bi-allelic	Normal	Bi-allelic	Bi-allelic	Bi-allelic	Bi-allelic
Expression of α -Gal epitope, as evaluated by cytochemical staining with AF594-IB4 ²	GGTAI	++	-	++	-	-	-	-
Expression of LDLR, as evaluated by immunocytochemical staining using anti-LDLR ²	LDLR	+	NT	NT	NT	NT	-	NT

¹Genotyping of clones was determined by direct sequencing of PCR products and sometimes by sequencing of inserts sub-cloned into TA cloning vector.
²Fluorescence intensity was expressed as ++ (strong), + (moderate), +/- (slight) or - (none).
 NT: not tested.

する。しかし、着床以降の発生が不全となる原因は不明で、現在検討中である。

以上から、targeted toxin-based selection を用いて標的遺伝子 (LDLR 遺伝子) が破壊されたブタ細胞の取得に成功したが、体細胞核移植後の胚発生は失敗に帰した。一般的に、遺伝子操作後の細胞は何らかのダメージを受けており、それがクローン個体取得に失敗した要因とも考えられる。遺伝子操作に抵抗性のある体細胞核移植 competent な細胞を今後探索する必要があると実感させられた。なお、以上の結果については、国際的ジャーナル(Sato et al., Int. J. Mol. Sci. 2017, 18, 2610, 2017)に掲載されている。

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 20 件)

1. Sakurai T, Shindo T, Sato M: Noninheritable Maternal Factors Useful for Genetic Manipulation in Mammals. In Oocytes: Maternal Information and Functions. Results and Problems in Cell Differentiation, 査読有, 63, 495-510, 2017, doi: 10.1007/978-3-319-60855-6_21.
2. Sato M, Saitoh I, Murakami T, Kubota N, Nakamura S, Watanabe S, Inada E: Intrapancreatic Parenchymal Injection of Cells as a Useful Tool for Allowing a Small Number of Proliferative Cells to Grow In Vivo. International Journal of Molecular Sciences, 査読有, 18, 1678, 2017, doi:10.3390/ijms18081678
3. Ohtsuka M, Miura H, Arifin N, Nakamura S, Wada K, Gurumurthy CB, Sato M: In situ genome editing method suitable for routine generation of germline modified animal models. bioRxiv, 査読有, August 04, 2017, doi: https://doi.org/10.1101/172718
4. Sato M, Miyoshi M, Nakamura S, Ohtsuka M, Sakurai T, Watanabe S, Kawaguchi H, Tanimoto A: Efficient generation of somatic cell nuclear transfer-competent porcine cells with mutated alleles at multiple target loci by using CRISPR/Cas9 combined with targeted toxin-based selection system. International Journal of Molecular Sciences, 査読有, 18, 2610, 2017, doi:10.3390/ijms18122610
5. Inada E, Saitoh I, Kubota N, Murakami T, Soda M, Sawami T, Yamasaki Y, Sato M: Alkaline phosphatase and OCT-3/4 as useful markers for predicting susceptibility of human deciduous teeth-derived dental pulp cells to reprogramming factor-induced iPS cells. Journal of Investigative and Clinical Dentistry, 査読有, 8(4), 2017, doi: 10.1111/jicd.12236
6. Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Mori C, Watanabe S, Tanaka M, Uetake R, Sato M, Shindo T. A non-inheritable maternal Cas9-based multiple-gene editing system in mice. Scientific Reports, 査読有, 6, 20011, 2016, doi: 10.1038/srep20011.
7. Gurumurthy CB, Takahashi G, Wada K, Miura H, Sato M, Ohtsuka M: GONAD: A novel CRISPR/Cas9 genome editing method that does not require *ex vivo* handling of embryos. Current Protocols in Human Genetics, 査読有, 88, 15.8.1-15.8.12, 2016, doi: 10.1002/0471142905
8. Sato M, Ohtsuka M, Watanabe W, Gurumurthy CB: Nucleic acids delivery methods for genome editing in zygotes and embryos: The old, the new, and the old-new. Biology Direct, 査読有, 11, 16, 2016, doi: 10.1186/s13062-016-0115-8
9. Sato M, Maeda K, Koriyama M, Inada E, Saitoh I, Miura H, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S, Miyoshi K: The *piggyBac*-based gene delivery system can confer successful

- production of cloned porcine blastocysts with multigene constructs. *International Journal of Molecular Sciences*, 査読有, 17, pii: E1424, 2016, doi: 10.3390/ijms17091424
10. Miyoshi K, Maeda K, Akioka K, Sato M, Kawaguchi H, Tanimoto A: Birth of Cloned Microminipigs Derived from Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos that have been Transiently Treated with Valproic Acid. *Cellular Reprogramming*, 査読有, 18, 390-400, 2016, doi: 10.1089/cell.2016.0025
 11. Saitoh I, Sato M, Soda M, Inada E, Iwase Y, Murakami T, Ohshima H, Hayasaki H, Noguchi H: Tissue-Specific Stem Cells Obtained by Reprogramming of Non-Obese Diabetic (NOD) Mouse-Derived Pancreatic Cells Confer Insulin Production in Response to Glucose. *Pro ONE*, 査読有, 11, e0163580, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0163580.
 12. Sato M, Saitoh I, Inada E: Efficient CRISP/Cas9-based gene correction in human induced pluripotent stem cells established from patients with sickle cell disease. *Stem Cell Investigation (Editorial)*, 査読有, 3, 7, 2016 doi: 10.21037/sci.2016.11.05
 13. Sato M, Inada E, Saitoh I, Matsumoto Y, Ohtsuka M, Miura H, Nakamura S, Sakurai T and Watanabe S: A combination of targeted toxin technology and the piggyBac-mediated gene transfer system enables efficient isolation of stable transfectants in nonhuman mammalian cells. *Biotechnology Journal*, 査読有, 10, 143-153, 2015, doi: 10.1002/biot.201400283. 2014/10/23
 14. Nakamura S, Sato M, Hattori H, Shimizu M, Fujita M, Maehara T, Ishihara M: Therapeutic angiogenesis for limb ischemia by using angiogenic growth factors and carriers. *Current Tissue Engineering*, 査読有, 4, 57-63, 2015, doi: 10.2174/2211542004666150605000901
 15. Ohtsuka M, Miura H, Mochida K, Hirose M, Hasegawa A, Ogura A, Mizutani R, Kimura M, Isotani A, Ikawa M, Sato M, Gurumurthy CB: One-step generation of multiple transgenic mouse lines using an improved Pronuclear Injection-based Targeted Transgenesis (i-PITT). *BMC Genomics*, 査読有, 16, 274, 2015, doi:10.1186/s12864-015-1432-5
 16. Inada E, Saito I, Watanabe S, Aoki R, Miura H, Ohtsuka M, Murakami T, Sawami T, Yamasaki Y, Sato M: PiggyBac transposon-mediated gene delivery efficiently generates stable transfectants derived from cultured primary human deciduous tooth dental pulp cells (HDDPCs) and HDDPC-derived iPS cells. *International Journal of Oral Science*, 査読有, 7, 144-154, 2015, doi: 10.1038/ijos.2015.18.
 17. Sato M, Kagoshima A, Saitoh I, Inada E, Miyoshi K, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: Generation of α -1,3-galactosyltransferase-deficient porcine embryonic fibroblasts by CRISPR/Cas9-mediated knock-in of a small mutated sequence and a targeted toxin-based selection system. *Domestic Animal Reproduction*, 査読有, 50, 872-880, 2015, doi: 10.1111/rda.12565.
 18. Takahashi G, Gurumurthy CB, Wada K, Miura H, Sato M, Ohtsuka M: GONAD: Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery system: a novel microinjection independent genome engineering method in mice. *Scientific Reports*, 査読有, 5, 11406, 2015, doi: 10.1038/srep11406
 19. Boulling A, Sato M, Masson E, Génin E, Chen JM, Férec C: Identification of a functional PRSS1 promoter variant in linkage disequilibrium with the chronic pancreatitis-protecting rs10273639. *Gut*, 査読有, 64, 1837-1838, 2015, doi: 10.1136/gutjnl-2015-310254.
 20. Sato M, Koriyama M, Watanabe S, Ohtsuka M, Sakurai T, Inada E, Saitoh I, Nakamura S, Miyoshi K: Direct injection of CRISPR/Cas9-related mRNA into cytoplasm of parthenogenetically activated porcine oocytes causes frequent mosaicism for indel mutations. *International Journal of Molecular Sciences*, 査読有, 16, 17838-17856, 2015, doi:10.3390/ijms160817838
- [学会発表](計 18 件)
1. 佐藤正宏、齋藤一誠、村上智哉、窪田直子、中村伸吾、渡部聡、稲田絵美: 少数個の増殖性細胞の体内増殖を可能とする新規マウス臍臓内細胞移植法. 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年
 2. 小林朋絵、難波真澄、古家野孝行、佐藤正宏、大塚正人、松山誠: 新たなゲノム編集技術 GONAD 法を用いた遺伝子改変ラットの作製法. 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年
 3. 三浦浩美、稲垣豊、佐藤正宏、大塚正人: In vivo ゲノム編集効率評価系モデルマウスの開発. 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年
 4. 高林秀次、青島拓也、佐藤正宏、大塚正人: 簡便なゲノム編集マウス作製法 GONAD 法を用いたアルビノマウスのレスキュー実験. 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年
 5. 大塚正人、中村伸吾、Channabasavaiah B. Gurumurthy, Naomi Arifin, Md Atiqul Islam, 三浦浩美、佐藤正宏: 卵管内受精卵を標的とした生体内ゲノム編集法 (GONAD) 習得のための 2 日間プロトコル. 第 51 回日本実験動物技術者協会総会, 2017 年
 6. Ohtsuka M, Miura H, Gurumurthy CB, Sato M: Improved GONAD (i-GONAD) (I) as ex vivo manipulation-free genome-editing system allowing efficient knock-out, large deletion, and knock-in. 14th Transgenic Technology Meeting (TT2017), 2017.
 7. Sato M, Nakamura S, Gurumurthy CB, Watanabe

- S, Ohtsuka M: Improved GONAD (i-GONAD) (II): usefulness of rhodamine-dextran for monitoring the success of the GONAD and of gonadotrophin-based regulation of the timing for the GONAD. 14th Transgenic Technology Meeting (TT2017), 2017.
8. Miura H, Inagaki Y, Gurumurthy CB, Sato M, Ohtsuka M: Development of a mouse model suitable for in vivo genome editing efficiency studies. 14th Transgenic Technology Meeting (TT2017), 2017.
 9. 大塚正人, 高橋剛, 三浦浩美, 和田健太, 佐藤正宏: GONAD 法: 採卵、顕微注入、胚移植のステップが不要なゲノム編集マウス作製法. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
 10. 渡部聡, 中村伸吾, 桜井敬之, 大塚正人, 佐藤正宏: piggyBac ベクターシステムと in vivo gene transfer を用いた新たな肝細胞株樹立の試み. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
 11. 佐藤正宏, 稲田絵美, 齋藤一誠, 三浦浩美, 大塚正人, 中村伸吾, 桜井敬之, 渡部聡: マウス臍臓内への piggyBac 系を介した直接生体内遺伝子導入は外来遺伝子の長期発現を可能とする. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
 12. 三浦浩美, Gurumurthy CB, 相田知海, 稲垣豊, 佐藤正宏, 佐藤健人, 大塚正人: Easi-CRISPR: 高効率なノックインマウス作製法. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
 13. 佐藤正宏, 渡部聡, 大塚正人: 医用ブタにおける遺伝子組換え動物作製の実際とその可能性について. 第 50 回日本実験動物技術者協会総会, 2016 年
 14. 佐藤正宏, 前田昂亮, 郡山実優, 稲田絵美, 齋藤一誠, 大塚正人, 中村伸吾, 桜井敬之, 渡部聡, 三好和睦: piggyBac 遺伝子導入系により複数遺伝子が同時導入されたブタ細胞は核移植後のクローン胚の発生を保證する. 第 109 回日本繁殖生物学会, 2016 年
 15. 大塚正人, 高橋剛, 和田健太, 三浦浩美, Channabasavaiah GURUMURTHY, 佐藤正宏: 採卵、顕微注入、胚移植を要しないゲノム編集マウス作製法 GONAD によるノックアウトマウス作製. 第 63 回日本実験動物学会総会, 2016 年
 16. Sato M, Gurumurthy CB, Watanabe S, Ohtsuka M: Improvement of GONAD (genome-editing via oviductal nucleic acids delivery), one of the zygote injection-free genome editing systems targeted to preimplantation embryos. 13th Transgenic Technology Meeting, 2016.
 17. Miura H, Gurumurthy CB, Quadros R, Sato M, Ohtsuka M: Generation of knockdown mice by CRISPR/Cas9-based targeted insertion

- of artificial miRNA sequence. 13th Transgenic Technology Meeting, 2016.
18. Murakami T, Saitoh I, Inada E, Soda M, Suzuki A, Sawami T, Kagoshima A, Iwase Y, Terao Y, Ohshima H, Hayasaki H, Sato M: The genetic engineering-based isolation of lymphoid enhancer-binding factor-1 (LEF1) positive stem-like cells from human deciduous tooth cell-derived iPSCs. 45th Annual Meeting & Exhibition of the AADR 40th Annual Meeting of the CADR, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
佐藤正宏 (SATO, Masahiro)
鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・教授
研究者番号: 30287099
- (2) 研究分担者
三好和睦 (MIYOSHI, Kzuchika)
鹿児島大学・農水産獣医学域農学部・教授
研究者番号: 70363611
- (3) 連携研究者
なし
- (4) 研究協力者
なし