

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14562

研究課題名（和文）ゲノム編集技術と核移植を併用した短期間での遺伝子改変クローン集団の作出

研究課題名（英文）Production of animal population having identical modified gene in a short period by genome editing and nuclear transplantation techniques in *Xenopus laevis*.

研究代表者

高宗 和史（Takamune, Kazufumi）

熊本大学・大学院先端科学研究部（理）・教授

研究者番号：20206882

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術は遺伝子機能解析に有効である。しかし、同じ操作を行っても変異の入り方が個体により異なることから、解析のために必要な同一変異個体集団を得るためには、その子孫を得る必要がある。そのため、性成熟期間が長い動物では、実際に解析可能な個体数を確保するために長い時間を要するという欠点があった。そのことを克服ため、無尾両生類アフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）を用いて、核移植により同一遺伝子変異を持つクローン個体集団の作出を行った。また、凍結した細胞の核を用いた核移植胚が正常に発生したことから、有用変異個体の凍結による長期保存が可能になった。

研究成果の概要（英文）：Genome editing techniques such as CRISPR/Cas9 system enable us to analyze the gene function. However, production of F1 (sometimes F2) generation is necessary for confirming the gene function by repetitive analyses because the state of mutations is different among the genome-edited individuals even if they are produced by the same procedure. In animals that need long periods for becoming sexually mature, we have to take long time to get population having the same mutation in the target gene. To overcome this disadvantage, I produced clonal population of genome-edited *Xenopus laevis* by transplantation of nucleus from embryo genome-edited by CRISPR/Cas9 system into enucleated egg. In addition, I succeeded in transplantation of nucleus from embryo which had been cryopreserved by vitrification. This technique allows us not only to ensure a sufficient time for selection of embryo having the desired mutation in the target gene but also to keep the useful animal in the narrow space.

研究分野：基礎生物学

キーワード：ゲノム編集 核移植 クローン 凍結保存 *Xenopus laevis*

1. 研究開始当初の背景

生物の形態や機能を司る遺伝子の具体的な役割について明らかにする際、当該遺伝子に変異を入れた時の形態・機能の変化を観察することが有効な手段である。近年、様々な動物種において、原核生物の獲得免疫システムを応用した CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) / Cas (CRISPR associated proteins) システム等の人工ヌクレアーゼを受精卵に顕微注入するだけで目的とする遺伝子に変異を入れることが可能になった。このことにより、目的に応じた動物種の遺伝子を改変し、遺伝子の機能や医薬品に対する影響等を調べる道が開かれた。このシステムによる変異導入の原理は、特定の遺伝子配列の部分人工ヌクレアーゼにより切断した後、細胞がもつ修復機構により修復される際、余分な塩基の付加や削除が任意に起こることにより遺伝子の読み枠が代わり、機能的なタンパク質が合成できなくなるというものである。そのため、同じ操作を行っても、それぞれの受精卵で同じ変異が入るとは限らないという問題がある。また、人工ヌクレアーゼが標的遺伝子に作用する時期が必ずしも受精直後の1細胞期でないため、同一個体でありながら、細胞によって変異の入り方が異なったモザイク胚になるという問題点が残っている。この問題は、その子孫である F1 個体や F2 個体を作成することにより解決でき、マウスやショウジョウバエ、メダカといった性成熟期間が短く、子孫を短期間で得ることができる動物種で盛んに用いられている。しかし、サルなど性成熟期間が長い動物種では、解析できるまでに長い期間を要するという問題が残り、より短期間で同一の遺伝子変異を有する集団を作成する方法の構築が望まれていた。

2. 研究の目的

同一遺伝子変異個体集団を得るために F1 個体群や F2 個体群を作成する従来の方法では、性成熟期間が長い動物種ではどうしても解析できるまでに長い時間を要する。そこで、標的遺伝子に目的の変異が入った個体のクローン集団を作成することで、短期間で同一遺伝子変異個体集団を作成することを考案した。一般に、クローン個体作成は、核移植を行うことで作成可能であることが多くの動物種でわかっているが、成功率が低い。世界で初めてクローン個体作出に成功した無尾両生類 *Xenopus laevis* でも、機能分化した小腸上皮細胞の核を用いた場合、成功率は 1.5% と低かったが、胞胚や原腸胚の未分化な細胞の核を用いることにより 36% の成功率を納めている (①)。加えて、*X. laevis* は、宿主である未受精卵を数多く得ることが容易であり、繰り返し結果を検証することが可能であること、および CRISPR/Cas9 システムにより容易に標的遺伝子に変異を入れることができることから、*X. laevis* を用いて目

的であるゲノム編集と核移植を併用した同一遺伝子変異個体集団の短期間での作出の可能性について検証することにした。また、標的遺伝子に目的とする変異が入っている個体を核供与個体として用いることになるが、その個体を遺伝子解析により選別するための時間を確保するために原腸胚の凍結保存条件についても検討することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 未受精卵の雌性核の不活性化

Elsdale ら (②) の方法に習い、紫外線を照射することにより宿主卵として用いる未受精卵の雌性核を不活性化した。照射装置として UV Crosslinker (CL-1000, 254nm; UVP) を用い、0 から 200mJ/cm² の強度で未受精卵の動物極に照射した。雌性核の不活性化の確認を行うため、紫外線照射未受精卵に *X. borealis* の精子核を用いて顕微授精し、発生を開始させた。胞胚期に達したところでゲノム DNA を抽出し、Yamaguchi ら (③) の方法を参考に、XDEADSouth mRNA の 3' 非翻訳領域に対応する DNA 領域を PCR で増幅した。この領域には、*X. laevis* と *X. borealis* で長さが異なっている領域があるため、PCR 産物を電気泳動することで、ゲノム DNA が *X. laevis* 由来か *X. borealis* 由来か判断できる。そこで、未受精卵 (*X. laevis*) 由来の PCR 産物が存在しないことを雌性核の不活性化の指標とした。

(2) ゲノム編集

CRISPR/Cas9 システムでゲノム編集を行った。Tyrosinase 遺伝子を標的遺伝子とし、その領域に 2ヶ所 CRISPR RNA (crRNA) を設計した。2つの crRNA が同時に作用した場合、その間の領域が抜け落ちることで、ゲノム DNA を鋳型とした PCR で容易に変異の有無が判定できるように考案した。1個の受精卵に 2種類の crRNA をそれぞれ 0 から 3300pg と 500pg の tracrRNA および 500pg の Cas9 タンパク質を顕微注入し、正常発生率、および体色の变化とゲノム DNA を鋳型とした PCR により変異率を判定した。

(3) 核移植

crRNA、tracrRNA、および Cas9 タンパク質を顕微注入した受精卵が初期原腸胚まで発生したところで胚を 2分割し、片方からゲノム DNA を抽出し、PCR を行うことで、変異が入った細胞を有する個体を選別した。もう片方を培養しておき、選別された個体の断片の細胞を解離して核移植に用いた。ゼリー層を除去した未受精卵を動物極が上に来るように配置したところで紫外線を照射し、6% Ficoll が入った 0.4x MMR (40mM NaCl, 0.8 mM KCl, 0.8 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂, 0.04 mM EDTA, 2 mM HEPES; pH 7.5) に移した。ガラス針を用いて刺すことにより卵賦活を誘導し、卵表

層の変化が始まったところで核移植を開始した。解離した細胞を外径が約 30 μ m の微小ピペットで吸引することで細胞を破壊した。この吸引し破壊した細胞をそのまま賦活した卵に顕微注入した。第一卵割が確認できたところで核移植胚を x1/10 MMR に移し、16 $^{\circ}$ C で培養した。翌日、この胚が初期原腸胚に達したところで再度 2 分割し、前日と同じ操作で片方からゲノム DNA を抽出して PCR を行い、目的とする変異が入った胚を選別した。その後培養していた片方の断片の細胞を解離して前日と同じ操作により核移植を行った。

(4) 凍結保存

Eto ら (4) の方法に従い、ガラス化法により胚断片の凍結・融解を行った。ただし、Eto らが用いた凍結剤 (PEPeS : 10 % propylene glycol, 30% ethylene glycol, 0.3M sucrose, 20% Percoll in PB1) は齧歯類用に基本生理食塩水として PB1 が用いられていたため、それを MMR に置換し、sucrose 濃度を 0.2M に変えたもの (MMR based PEPeS) を使用した。また、融解用溶液として 250mM sucrose を含んだ MMR を用いた。

4. 研究成果

(1) 未受精卵の雌性核の不活性化

ゼリー層を除去した *X. laevis* の未受精卵に紫外線を 0、50、100、150、もしくは 200 mJ/cm² の強度で照射した後、細胞膜を除去した *X. borealis* の精子核を用いて顕微授精した。胞胚まで発生したところで、各条件において 3 個体からゲノム DNA を抽出し、XDEADSouth mRNA の 3' 非翻訳領域に対応するゲノム DNA 領域を PCR により増幅し、電気泳動を行った (図 1)。

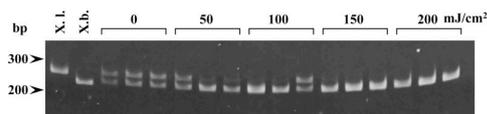


図1: XDEADSouth mRNAの3'非翻訳領域に対応するゲノムDNAのPCR産物の電気泳動像。右端の数字は、DNA断片の大きさ(bp:塩基数)を示している。*X. l.*と*X. b.*は、それぞれ*X. laevis*および*X. borealis*のゲノムDNAを鋳型にした時の増幅産物を示している。0、50、100、150、200mJ/cm²の強度の紫外線照射した未受精卵に*X. borealis*の精子核で顕微授精したもの3個体ずつからゲノムDNAを調整し、PCRを行った。

X. laevis 胚および *X. borealis* 胚から抽出したゲノム DNA を鋳型とした時の PCR 産物の大きさが異なっていることを指標に (図 1、*X. l.* と *X. b.* を参照)、胞胚期細胞の DNA に *X. laevis* 由来の DNA が検出できなくなる条件を調べた。その結果、150mJ/cm² 以上の紫外線を照射した時、全ての個体で *X. laevis* 由来の増幅産物が検出されなくなっていた。この結果は、150mJ/cm² 以上の紫外線照射により雌性核が確実に不活性化し、卵割時の DNA 複製に関与しなくなったことを示している。この方法を用いることにより、簡便かつ正確に雌性核を不活性化する条件を見いだ

すことができるようになった。

(2) ゲノム編集

Tyrosinase 遺伝子に対する 2 種の crRNA の認識領域とゲノム DNA に変異が入ったことを確認するために行う PCR に用いる primer の認識場所を図 2 に示している。tracrRNA、Cas9

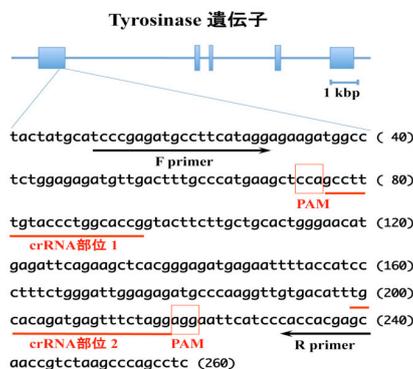


図2: crRNAが認識する領域とPCRのために作成したのプライマーの認識場所

タンパク質と共に 2 種の crRNA をそれぞれ 0、132、660、3300pg 受精卵に顕微注入したところ、図 3 に示すように Tyrosinase 遺伝子に変異が入ったことを示す体表の色素欠損が観察された。個体によっては、身体全体の色

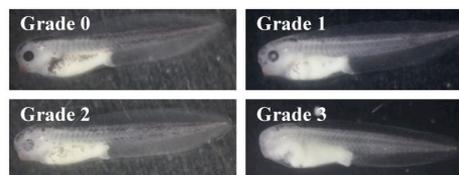


図3: Tyrosinase遺伝子に対するCRISPR/Cas9タンパク質を顕微注入したことにより体表の色素が欠失した変異個体。変異の入り方からGrade 0(正常)、Grade 1(弱い)、Grade 2(中間)、Grade 3(強い)の4段階に分類した。

素が欠損しているわけではなく、部分的に色素が発現していることから、細胞によって変異の入り方が異なっていることが明らかになった。個体により色素欠損の度合いが異なることから、色素欠損が観察されない Grade 0 から、ほとんどの細胞で色素が欠損している Grade 3 の 4 段階に分類した (図 3)。この中で Grade 3 の 9 個体と Grade 2 の 7 個体からゲノム DNA を抽出し、図 2 に示した primer を用いて PCR を行ったところ、Grade 3 の個体のほとんどにおいて、約 100 塩基対 (bp) の大きさの DNA 断片が観察された (図 4)。この結果は、2ヶ所の crRNA 認識部位で変異が入り、その間の DNA が抜け落ちたことを示している。Grade 3 の出現と crRNA 顕微注入量との関係を調べてみたところ、2 種の crRNA をそれぞれ 3300pg 顕微注入した時のみ観察された (図 5)。奇形個体の発生率も高くなっていったが、ゲノム編集個体の細胞核を移植した個体の細胞核が移植核由来であることを容易に確認できることから、まずは 3300pg

の crRNA を顕微注入した原腸胚の細胞核を用いて核移植を行うことにした。

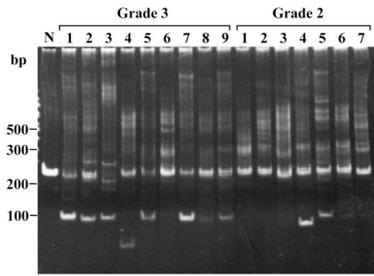


図4: Grade 3の9個体(1-9)とGrade 2の7個体(1-7)のゲノムDNAを鋳型に図2に示したF primerとR primerを用いてPCRを行って得られた増幅産物の電気泳動像。Nは正常胚での結果を示している。2ヶ所のcrRNA認識部位で同時に変異が入ると約100bpのDNA断片が検出されると予想される。

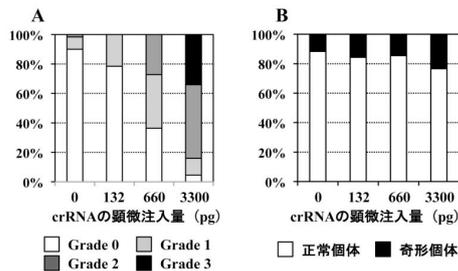


図5: crRNAの注入量と変異の割合(A)および奇形発生率(B)

(3) 核移植

2種の crRNA をそれぞれ 3300pg と tracrRNA および Cas9 タンパク質を受精卵に顕微注入し初期原腸胚まで発生したところで 10 個体を選別し、胚を 2 分割した。半分を培養し、残りの半分からゲノム DNA を抽出して PCR を行った (図 6、A)。4 番の個体において、2ヶ所で変異が入っていることを示す約 100 塩基対の DNA 断片が明確に観察されたので、培養していたこの個体の残り半分を細胞解離し、核移植に用いた。初期原腸胚まで発生した核移植胚 4 個体をそれぞれ 2 分割し、半分を培養し、残り半分からゲノム DNA を抽出して PCR を行った (図 6、B)。その結果、2 番の個体において、約 100 塩基対の DNA 断片のみが観察されたので、培養していた残り半分を細胞解離し、核移植に用いた。初期原腸胚まで発生した 5 個体から抽出したゲノム DNA を用いて PCR を行ったところ、全ての個体において核を提供した個体で増幅された DNA 断片 (図 6、B, 2 と C, ori) と同じであった。この結果では塩基配列まで確認していなかったが、別の同様に行った実験において、連続した 2 回の核移植により、全ての個体で同じ変異が入っていることを確認している。この実験で得られた核移植を数個体飼育したが、全て尾芽胚で死んだ。crRNA の顕微注入量が多かったため、副作用が出ている可能性が考えられたため、顕微注入量を 500pg まで少なくして行ったところ、正常に発生する遺伝子変異を有する核移植個体を得ることができた (図 7)。

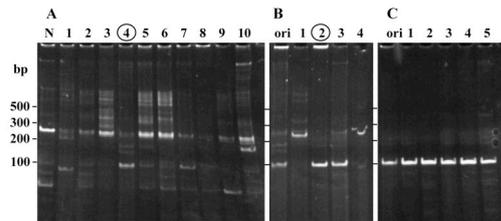


図6: 核移植によるクローン集団の作出。A: CRISPR/Cas9タンパク質を顕微注入した原腸胚10個体(1-10)のゲノムDNAを鋳型に行ったPCR産物の電気泳動像。Nは正常胚を示す。B: Aの4番の胚細胞を用いて核移植を行って得られた原腸胚4個体(1-4)のゲノムDNAを鋳型に行ったPCR産物の電気泳動像。oriはAの4番の試料を電気泳動したもの。C: Bの2番の胚細胞を用いて核移植を行って得られた原腸胚5個体(1-5)のゲノムDNAを鋳型に行ったPCR産物の電気泳動像。oriはBの2番の試料を電気泳動したもの。



図7: Tyrosinase遺伝子に対するCRISPR/Cas9タンパク質を顕微注入した原腸胚の細胞を用いて核移植を行って得られたアルビノ胚。

(4) 凍結保存

受精卵への CRISPR/Cas9 タンパク質の顕微注入によりゲノム編集を行った個体の細胞核を用いて、核移植によりクローン個体集団を作成することが可能であることが明らかになった。核移植では、胚の発生が進んだ細胞核を用いると成功率が落ちることが報告されている (⑤)。そのため、ゲノム編集を行った後、どの個体で目的の変異が入っているのか解析するための時間がほとんどないという問題が残っていた。そのことを克服する目的で、胚の凍結保存について検討した。MMR based PEPeS に浸した後、液体窒素で急速凍結した。これを sucrose を含む MMR の中で解凍したところ、細胞の形状は壊れることなく長時間保たれていたものの、分裂を開始する細胞を観察することはできなかった。しかし、この細胞の核を用いて紫外線照射卵に核移植を行ったところ、卵割を開始し、原腸陥入まで行う胚を多く観察することができた。現在のところ、成功率は非常に小さいが、オタマジャクシまで発生した胚を得ることに成功した (図 8)。この結果は、これまで成

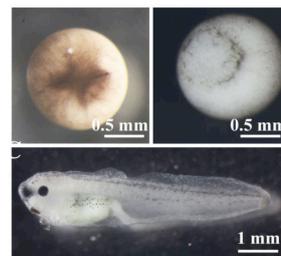


図8: 凍結細胞核を移植した胚の発生。A: 4細胞期胚。B: 中期原腸胚。植物極からの観察。C: オタマジャクシ (St. 41)。

功例がなかった両生類胚の凍結保存に道を開くものであり、目的とする変異が入ったゲノム編集個体を選別するための時間が確保できるだけでなく、有用な遺伝子変異個体の長期保存を可能にする重要な成果である。

<引用文献>

- ① Gurdon J.B., The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. J. Embryol. Exp. Morphol., 10, 1962, 622-640.
- ② Elsdale T.R., Gurdon J.B., Fischberg M., A description of the technique for nuclear transplantation in *Xenopus laevis*. J. Embryol. Exp. Morphol., 8, 1960, 437-444.
- ③ Yamaguchi T., Kataoka K., Watanabe K., Orii H., Restriction of the *Xenopus* DEADSouth mRNA to the primordial germ cells is ensured by multiple mechanisms. Mech. Dev., 131, 2014, 15-23.
- ④ Eto T., Takahashi R., Kamisako T., Hioki K., Sotomaru Y., A study on cryoprotectant solution suitable for vitrification of rat two-cell stage embryos. Cryobiology, 68, 2014, 147-151.
- ⑤ Gurdon JB., The developmental capacity of nuclei taken from differentiating endodermal cells of *Xenopus laevis*. J. Embryol. Exp. Morphol., 8, 1960, 505-526.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

高宗和史、北野健 他、ゲノム編集技術と核移植を併用した短期間での両生類遺伝子改変クローン集団の作出、日本動物学会、2017

[その他]

ホームページ等

https://www.fast.kumamoto-u.ac.jp/wp/wp-content/uploads/2018/04/kazufumi_takamune.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高宗 和史 (TAKAMUNE, Kazufumi)

熊本大学・大学院先端科学研究部・教授
研究者番号：20206882

(2) 研究分担者

北野 健 (KITANO, Takeshi)

熊本大学・大学院先端科学研究部・准教授
研究者番号：40336219