

平成30年6月13日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14738

研究課題名(和文) エレクトロポレーションを活用したイメージングマウスの作製法

研究課題名(英文) Generation of reporter mice by electroporating genome editing system into mouse zygotes

研究代表者

竹本 龍也 (TAKEMOTO, Tatsuya)

徳島大学・先端酵素学研究所(オープンイノベ)・教授

研究者番号：30443899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者らが開発したエレクトロポレーションによる遺伝子破壊マウス作製法を基盤として、遺伝子発現やタンパク質を可視化したイメージングマウスをハイスループットに作製する手法の確立を行った。具体的には、第三世代のゲノム編集CRISPR/Cas9システムのコンポーネントである、Cas9タンパク、crRNA、tracrRNAを、外来遺伝子(蛍光タンパク質)ドナーである一本鎖DNAと共に受精卵に導入することで、標的遺伝子の発現を可視化するレポーターマウスを作製した。この手法を活用することで、より簡便かつ高効率に遺伝子発現レポーターマウスの作製を行えるようになった。

研究成果の概要(英文)：This research study established the electroporation method generating reporter mice with genome editing technology. We introduced the components of CRISPR/Cas9 system including Cas9 protein, crRNA and tracrRNA, together with donor DNA encoding the fluorescent protein such as EGFP or mCherry into mouse zygotes by electroporation. The resulting mouse embryos showed fluorescence where the endogenous target genes are expressed.

研究分野：発生生物学

キーワード：ゲノム編集 エレクトロポレーション

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現やタンパク質を可視化したマウス(イメージングマウス)は、細胞分化状態やタンパク質分子の役割を個体レベルで解析する上で重要なツールであり、発生生物学のみならず幅広く生命科学分野で活用されている。しかしながら、目的遺伝子座に蛍光タンパク質などの外来遺伝子を組み込んだマウスを作製するには、高度な技術と作製時間を必要としていた。

従来、遺伝子改変マウス(イメージングマウスや、外来遺伝子を組み込んだマウス、遺伝子欠損マウスなど)を作製するには、まず相同組換えによって外来遺伝子が組み込まれたES細胞(または、標的遺伝子欠損したES細胞)を樹立する。樹立したES細胞を胚盤胞に導入することでキメラマウスを作製し、キメラマウスを交配することで、遺伝子改変マウス(ヘテロマウス)が得られる。目的遺伝子組換えマウスが得られるかは、ES細胞の多分化能(特に、生殖細胞への寄与)が維持しながら、目的組換え体が得られるかによる。したがって、遺伝子組換えマウスの作製は、確立された技術を有する研究機関に限定されていた。

ゲノム編集技術、特にCRISPR/Cas9システムが確立して以来、ES細胞ではなく受精卵での改変によって遺伝子組換えマウスを作製するようになりつつある。標的遺伝子を欠損させたマウスの作製は比較的容易で、受精卵内にCas9とgRNAとを導入することで効率良く達成できる。一方で、外来遺伝子の挿入は受精卵内での組換えを必要し、組換え効率が低いため困難である。

研究代表者らが行なった先行研究で、受精卵にゲノム編集システムを効率良く導入できる方法を確立した。従来、行われていたマイクロインジェクション法では、高度な技術が必要とされ、作業に多くの時間を必要としていた。研究代表者らは、エレクトロポレーションによって受精卵に導入する方法を確立した。この方法では、高度な技術を必要とせず、多数の受精卵を一度に処理できる。この方法を用いることで、これまでに多数の遺伝子欠損マウス、遺伝子変異(点変異)マウスを作製してきた。

しかしながら、エレクトロポレーション法では、外来遺伝子の導入に成功しておらず、イメージングマウスを作製は達成されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが開発したエレクトロポレーションによる遺伝子破壊マウス作製法を基盤として、遺伝子発現やタンパク質を可視化したイメージングマウスをハイスループットに作製する手法の確立を行った。

3. 研究の方法

(1) 受精卵の調整

受精卵は、人工授精(In vitro fertilization: IVF)によって調整している。B6D2F1ハイブリッド系統(またはC57BL/6系統)のメスマウスにPMSGおよびhCGを腹腔内に注射することで過排卵させる。オスマウスの精巢上体から取り出した精子と混ぜ合わせることで、受精卵を得る。媒精時間は3時間とし、媒精後は受精卵のみを精製して、KSOM培地でエレクトロポレーションまで培養しておく。

(2) 受精卵エレクトロポレーション

受精卵をOpti-Memドロップへ移し、なじませる。Cas9タンパク質、crRNA、tracrRNA、ドナーDNAを混ぜ合わせ(ゲノム編集溶液)、電極間を満たす。受精卵を電極間へと移動させ、ゲノム編集溶液になじませる。通電させ、受精卵にゲノム編集因子を導入させる。通電条件は、いろいろな電気条件を検討した。通電後の受精卵をKSOM培地で数回洗浄して、KSOM培地で翌日まで培養する。

翌日に2細胞期へと発生した胚を、偽妊娠マウスの卵管へ移植する。移植後19日目にF0マウスが出生する。自然分娩されない場合、帝王切開を行う。

(3) 遺伝子改変の確認、および、蛍光タンパク質発現の観察

マウスへの目的遺伝子の挿入、あるいは次世代への遺伝は、マウス耳片(あるいはマウス胚盤胞)から調整したゲノムDNAを解析することで評価した。ドナーDNA内の配列と、ドナーDNA外の配列とのPCRで行なった。

マウス胚の解析は、妊娠8日目の胚を用いて行なった。蛍光タンパク質の観察は実体顕微鏡(胚の観察)と正立顕微鏡(切片の観察)とを用いて行なった。内在遺伝子の発現は、In situ hybridization法で行なった。

4. 研究成果

第三世代のゲノム編集CRISPR/Cas9システムのコンポーネントである、Cas9タンパク、crRNA、tracrRNAを、外来遺伝子(蛍光タンパク質)ドナーである一本鎖DNAと共に受精卵に導入することで、標的遺伝子の発現を可視化するレポーターマウスを作製した

通電条件の検討は、マウス個体を作製することなく、胚盤胞での解析で行なった。Cas9タンパク、crRNA、tracrRNA、ドナーDNAを導入した受精卵を4日間培養して、胚盤胞へと発生させる。胚盤胞からゲノムDNAを調整して、外来遺伝子の導入の成否を解析した。様々な電気条件を検討し、もっとも効率良く導入され、且つ、胚盤胞への発生率がよい条件を決定した。

この方法によって、Brachyury遺伝子にEGFP遺伝子を組み込んだマウス(Brachyury-T2A-EGFP)を作製した。

Brachyury-T2A-EGFP アレルの次世代への遺伝を確認するため、また、系統化を行うため、F0 世代では EGFP 発現を確認せず、ジェノタイプングによって、Brachyury-T2A-EGFP の挿入を確認した。

得られた F0 マウスを、野生型マウスと交配させ F1 世代の胚を単離して、EGFP の発現を解析した。得られた 34 胚のうち、21 胚で蛍光が確認された (図 1)。

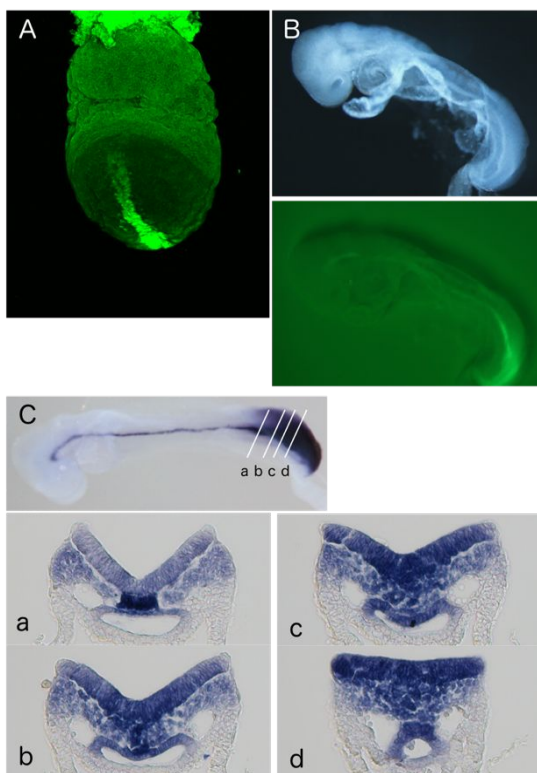


図1: Brachyury-T2A-EGFPマウス胚におけるEGFP発現
A: E7.5胚。B: E8.5胚。C: In situ hybridizationによりEGFP発現を解析。a-d: Cで示した領域のcross section。

従って、作製された F0 マウスは Brachyury-T2A-EGFP をヘテロ、もしくは高いモザイク率で有していると予想される。EGFP の発現は、すでに報告されている Brachyury の発現と一致していた (図 2)。

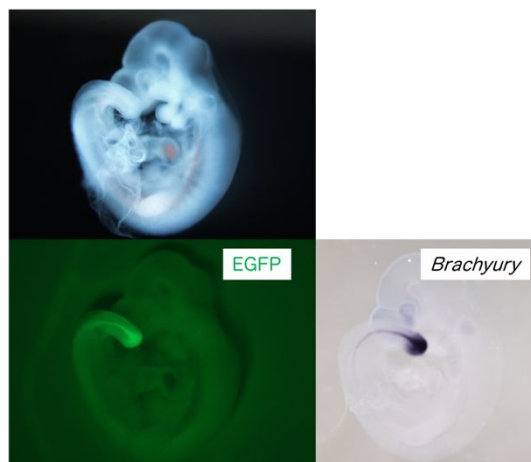


図2: Brachyury-T2A-EGFPマウス胚におけるEGFP発現とBrachyury遺伝子との発現比較。

F0 マウスと交配させた野生型マウスの一部は出産させ、F1 世代に Brachyury-T2A-EGFP アレルが遺伝することを確認した。これまでに出生した 11 匹のうち、5 匹で Brachyury-T2A-EGFP アレルをもつ F1 世代が得られている。

また、Sox2 遺伝子への mCherry 遺伝子を組み込んだマウス (Sox2-T2A-mCherry) を作製した。エレクトロポレーションによって、受精卵に Cas9 タンパク、crRNA、tracrRNA、ドナーDNA を導入して、翌日 2 細胞期へと発生した胚を、偽妊娠メスマウスへと移植した。得られた F0 マウス 10 匹のうち、4 匹で Sox2 遺伝子座に mCherry 遺伝子が挿入されたマウスが得られた。現在、これらのマウスについて、F1 胚での mCherry 発現を解析するとともに、F1 ヘテロマウス作製 (系統化) を進めている。

これらの実験は、ハイブリッド系統 (B6D2F1) を用いて行なっているが、C57BL/6 系統においても、同様の結果が得られている。ただし、この場合は多少の条件変更を行なっている。

まとめ: 受精卵エレクトロポレーション法によって、EGFP 遺伝子または mCherry 遺伝子が目的遺伝子座に導入されたイメージングマウスが作製できた。これらのマウス胚では、内在の遺伝子発現と同様の蛍光タンパク質発現が観察された。

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 2 件)

Harada A, Maehara K, Ono Y, Taguchi H, Yoshioka K, Kitajima Y, Xie Y, Sato Y, Iwasaki T, Nogami J, Okada S, Komatsu T, Semba Y, Takemoto T, Kimura H, Kurumizaka H, Ohkawa Y. Histone H3.3 sub-variant H3mm7 is required for normal skeletal muscle regeneration. *Nat Commun.* 9(1): 1400. (2018) 査読有
doi: 10.1038/s41467-018-03845-1.

Uddin MM, Ohigashi I, Motosugi R, Nakayama T, Sakata M, Hamazaki J, Nishito Y, Rode I, Tanaka K, Takemoto T, Murata S, Takahama Y. Foxn1- β 5t transcriptional axis controls CD8+ T-cell production in the thymus. *Nat Commun.* 8: 14419. (2017) 査読有
doi: 10.1038/ncomms14419

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.fujii.tokushima-u.ac.jp/embryology/>

6．研究組織

(1)研究代表者

竹本 龍也 (TAKEMOTO, Tatsuya)
徳島大学・先端酵素学研究所・教授
研究者番号：30443899