

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08050

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いた細胞接着分子欠損ブタの精巣における精子産生能の解析

研究課題名(英文) Analysis of the spermatogenic ability in the testis of the cell adhesion molecules defective pigs using the genome editing technology

研究代表者

河原崎 達雄 (KAWARASAKI, Tatsuo)

東海大学・農学部・教授

研究者番号：70500247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集技術のブタへの応用条件、ブタ精巣組織における細胞接着分子CADM1発現について検討し、以下の成果を得た。1) ブタ単為発生胚を用いてゲノム編集のために必要なgRNAの効果を判定できる。2) 単為発生胚と体外受精胚ではゲノム編集効率に差はないが胚の発生率は異なる。3) 体外受精胚では、体外受精からEPまでの時間を長く、パルス幅を短縮、電圧を低下させる必要がある。4) ブタ精巣からCADM1を初めて検出した。CADM1は、中間型からB型精祖細胞、前細糸期から厚糸期の精母細胞と伸長精子細胞に発現し、円形精子細胞やセルトリ細胞には発現しない。ブタ精巣におけるCADM1の動態はマウスのものと類似する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、合成gRNAを用いたCRISPR/Cas9・エレクトロポレーション法によるブタのゲノム編集条件を明らかにした。この手法を用いれば、高度なテクニックを用いることなく、安価で、効率よくブタのゲノム編集が実施できる。また、細胞接着分子CADM1の精巣組織内での存在をマウス以外の実験動物において初めて検出し、その動態はマウスのものと類似していることを明らかにした。ブタは解剖や生理的な特徴がヒトと類似しており、ヒトの前臨床モデルとして注目されている。本研究の成果は、造精機能をはじめとしたヒトの疾病に関連する遺伝子の解析やモデルブタの開発に活用できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The conditions for the applying to pigs of the genome editing technique and the expression of cell adhesion molecule CADM1 in pig testis tissue were examined, and the following results were obtained. 1) The usefulness of gRNA used for genome editing can be determined using porcine parthenogenetic embryos. 2) There was no difference in the genome editing efficiency between parthenogenetic embryos and in vitro fertilized embryos, but embryonic development rates differed. 3) For in vitro fertilization, it was necessary to increase the time from in vitro fertilization to EP, shorten the pulse width, and lower the voltage. 4) CADM1 was first detected in pig testis. CADM1 is expressed in intermediate to B-type spermatogonia, spermatocytes, and elongated spermatids, from the pre-filament phase to thick thread phase, but not in round spermatids and Sertoli cells. Thus, the kinetics of CADM1 in pig testis was similar to that in mouse.

研究分野：動物生命科学

キーワード：豚 ゲノム編集 CRISPR/Cas9 CADM1 体外受精 単為発生 精巣 造精機能

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳動物の精子形成は、精巣の精細管内において性腺刺激ホルモン、男性ホルモンおよびサイトカインの作用を受け、造精細胞とセルトリ細胞の相互作用により生じる複雑な生命現象である。この相互作用に参与する細胞接着分子の一つとして、マウスの造精細胞に発現する細胞接着分子 **cell adhesion molecule 1 (CADM1)** が、研究分担者らにより同定された。マウス **CADM1** は精祖細胞、精母細胞および後期精子細胞で発現するが、セルトリ細胞には発現しない。**CADM1** のノックアウトマウスでは、個体の生存や発育には影響はなく、精子形成障害が唯一の所見である (若山と井関 2009)。しかし、ヒトを含めた大型哺乳類の精巣において、**CADM1** の発現や機能はあまりわかっていない。

(2) マウスでは胚性幹細胞 (**ES** 細胞) が樹立されており、**ES** 細胞を用いた遺伝子ノックアウトマウスを比較的容易に作製することができ、作製されたノックアウトマウスを用いた遺伝子機能解析が日常的に行われている。一方、ブタをはじめとする家畜動物では利用しやすい **ES** 細胞が樹立されておらず、遺伝子ノックアウト動物の作製は体細胞核移植により行われているが、その作製効率が非常に低いことが問題であった。最近になって開発された **CRISPR/Cas9** を用いたゲノム編集手法は、マウスの遺伝子ノックアウトやノックインの作製効率を飛躍的に高め (Mashiko et al. 2014)、遺伝子ノックアウトが困難であったブタでも使用が可能である (Kwon et al. 2015)。

## 2. 研究の目的

マウスの精子形成において、細胞接着分子が不可欠な働きをすることが明らかになった。しかし、ヒトを含めた大型哺乳動物の精巣における細胞接着分子の発現や精子形成における機能は分かっていない。

本研究では、まず、大型哺乳動物としてブタを用いて、ブタ精巣における細胞接着分子 **CADM1** の発現を明らかにする。次に、ゲノム編集技術を用いて **CADM1** 遺伝子のノックアウトブタを作出するための条件を明らかにする。さらに、研究で得られたゲノム編集技術により **CADM1** ノックアウトブタの作出を試み、細胞接着分子 **CADM1** が精子形成において精子の質と数を制御する不可欠の因子であるのかを明らかにする。

本研究成果は、マウス以外の大型哺乳動物の精子形成における細胞接着分子の役割を明らかにするとともに、ノックアウトブタは精子形成解析モデル動物として有用である可能性があり、大型哺乳動物の精子形成に関する新たな知見も提供することができる。

## 3. 研究の方法

### (1) 単為発生胚による gRNA の有効性の検証

肉豚の卵巣より卵母細胞を採取、成熟培養し、電気刺激により単為発生胚を作出 (Kawarasaki ら 2009) し、設計した gRNA のゲノム編集に対する有効性について検証した。

#### 単為発生胚の作製

肉豚の卵巣から卵母細胞を採取し、POM1st で 20 時間、POM2nd で 28 時間培養し、1.5KV/cm、99  $\mu$  sec の直流刺激を 1 回与え、単為発生胚を作製した。

#### crRNA の設計と gRNA/Cas9nuclease 複合体 (RNP) の調整

**CADM1** 遺伝子 (ACCESSION NC\_010451 REGION) をターゲットとした。crRNA は CRISPRdirect software (Naito ら 2015) を用い、Exon1 の開始コドンの直前および Exon 4 の中にあり、Pig (*Sus scrofa*) genome、SGSC Sscrofa10.2/susScr3 (Aug, 2011) よりオフターゲットの少ない配列を選抜し設計した。crRNA、tracrRNA および Cas9nuclease から gRNA /Cas9nuclease 複合体 (Alt-R® CRISPR-Cas9 System、Integrated DNA Technologies) を調整した。

#### エレクトロポレーション

活性化の 3、6 あるいは 9 時間後に、エレクトロポレーター (NEPA21、ネッパジーン株式会社) を用いて、マルチステップ・減衰システムにより、gRNA /Cas9nuclease 複合体を単為発生胚に導入した。

#### ゲノム編集効率の確認

エレクトロポレーション後の胚は、活性化 6~7 日後まで PZM 内で培養し、胚盤胞以上に発生した胚を微量の DDW とともに採取し、検査時まで -30℃ で凍結保存した。

98℃、10 分間の加熱処理により DNA を抽出、Nested PCR 法により PAM 配列付近の DNA を増幅し、ダイレクトシーケンス法によりシーケンスを解析した。

### (2) ゲノム編集胚の移植実験

体内受精胚に対して単為発生胚で確認した条件でエレクトロポレーション法によりゲノム編集胚を作成し、発情を同期化したレシピエントブタに移植した。

#### 受精ブタ胚の準備

未成熟ブタに対して、eCG1000IU と hCG750IU を 72 時間間隔で投与し、hCG 投与の 30 時間後に人工授精し、人工授精の翌日に胚を回収した。

### ゲノム編集

エレクトロポレーター (NEPA21、ネッパジーン株式会社) を用いて、マルチステップ・減衰システムにより、ブタ CADM1 遺伝子 Exon1 および Exon4 に対応する gRNA / Cas9 nuclease 複合体をブタ胚に導入した。

### レシピエントブタへの移植

偽妊娠処置を行った未経産ブタに、受精ブタ胚を採取したブタと同じタイミングでホルモン処置を行い発情を同期化し、ゲノム編集処理したブタ胚を開腹手術 (Kawarasaki ら 2009) により片側の卵管に移植した。

## (3) 体外受精ブタ胚のゲノム編集条件の検討

### 体外受精ブタ胚の準備

肉豚の卵巣から卵母細胞を採取し、POM1st で 20 時間、POM2nd で 24 時間培養後、体外受精を行った。

### エレクトロポレーション法

媒精 6~12 時間後に、マルチステップ・減衰システムによるエレクトロポレーション法によりゲノム編集処置を行い、EP までの時間、poring 時のパルス幅、Transfer 電圧が、その後の胚発生、ゲノム編集効率に及ぼす影響について検討した。

## (4) ブタ精巣からの CADM1 の検出

精巣サンプルをパラフォルムアルデヒド液で固定し、組織切片を作製した。組織切片に抗マウス CADM1 ウサギポリクローナル抗体 (Wakayama et al, 2003) を用いて免疫組織化学的染色を行い、光学顕微鏡および電子顕微鏡レベルで CADM1 蛋白質を検出した。

## 4. 研究成果

ゲノム編集技術のブタへの応用のための条件、およびブタ精巣における CADM1 の発現について検討した結果、以下の成果を得た。

### (1) 単為発生胚による gRNA 有効性の検証

体外受精と同じ方法により採取した卵母細胞を利用し、体外受精よりも安定的に生産できる単為発生胚 (Kawarasaki et al, 2009) を用いて gRNA の有効性検証が可能かどうかを検討した。

gRNA は、ブタ CADM1 遺伝子の Exon1 および Exon4 領域に各 1 個、その開始コドンあるいは Exon の開始部付近に設定した。

単為発生のための電気刺激から、3 時間、6 時間、あるいは 9 時間後に、Exon1 および Exon4 の gRNA / Cas9 Nuclease 複合体を、単為発生胚に導入した。

ゲノム編集効率は、Exon1 (80.0%; 16/20) において、Exon4 (60.0%; 15/25) に比べ高くなった ( $P < 0.05$ )。エレクトロポレーションの実施時間による差はなく、全体のゲノム編集率は 68.9% (31/45) であった (図 1)。また、胚の胚盤胞への発生率は、エレクトロポレーションの実施時間に影響されなかった ( $P > 0.05$ ) (図 2)

以上の結果から、単為発生胚により gRNA の有効性検証が可能であることが明らかとなった。

### (2) ゲノム編集胚の移植実験

単為発生ブタ胚によりゲノム編集効率を確認した CADM1 gRNA を用いて、化学合成の CRISPR/Cas9 システムおよびエレクトロポレーション法によりゲノム編集胚を作製し、その移植実験を行った。合計 92 個のゲノム編集胚を 3 頭のレシピエントブタに移植したが、産子は得られなかった。エレクトロポレーション刺激の後に、約半数の胚の細胞質に損傷が認められたことから、エレクトロポレーション条件の検討が必要と考えられた。

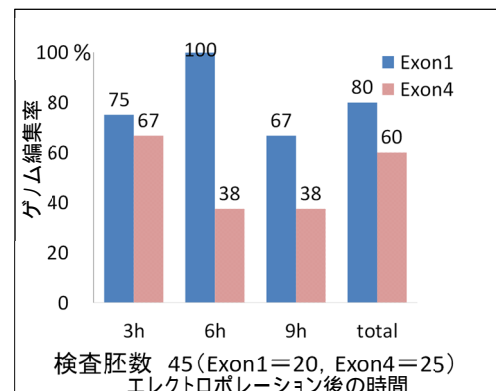


図 1 単為発生ブタ胚を用いたゲノム編集効率の確認

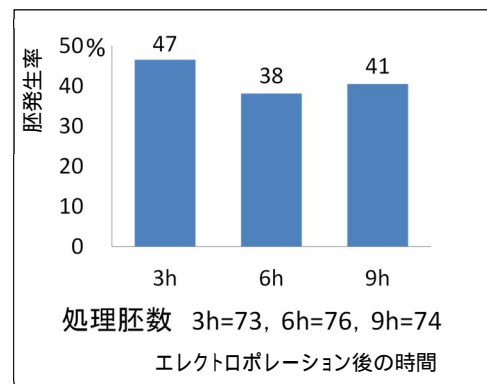


図 2 単為発生ゲノム編集胚の発生率

(3) 体外受精ブタ胚におけるゲノム編集条件の検討

媒精からエレクトロポレーションまでの時間が体外受精ブタ胚の発生率に及ぼす影響を検討したところ、6 時間では胚盤胞へ発生する胚は存在しなかったが、12 時間後では 10.3% が発生し、媒精からエレクトロポレーションまでの時間が発生率に影響を及ぼすことが明らかとなった ( $P < 0.01$ ) (図 3)。

Poring パルス幅が体外受精ブタ胚の発生に及ぼす影響について検討したところ、単為発生胚の発生に悪影響がなかった 1.5MS では胚盤胞への発生は認められなかった。Poring パルス幅は体外受精ブタ胚の発生率に影響 ( $P < 0.05$ ) し、0.5MS まで短縮して初めて胚盤胞への発生が認められた (図 4)。

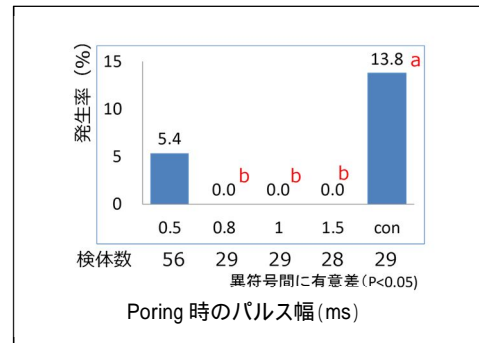
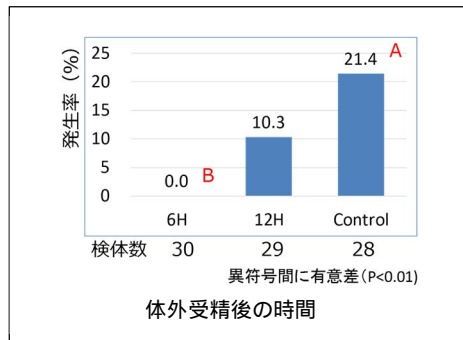


図 3 媒精からエレクトロポレーションまでの時間が体外受精ブタ胚発生に及ぼす影響 (Poring パルス 0.5ms)

図 4 Poring パルス幅が体外受精ブタ胚発生に及ぼす影響 (媒精後 12 時間)

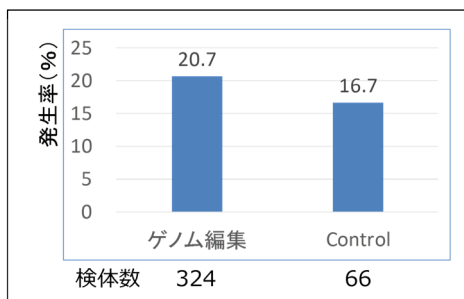


図 5 体外受精ブタ胚のゲノム編集効率

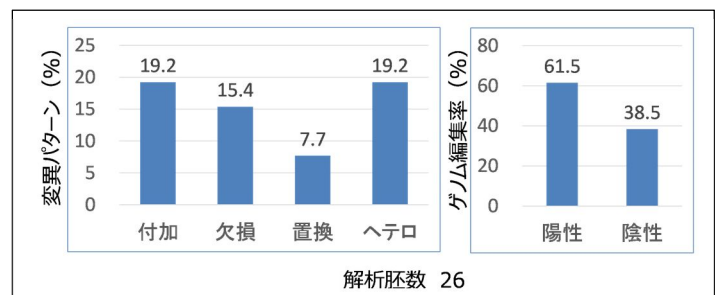


図 6 体外受精ブタ胚のゲノム編集効率

本研究の中で明らかとなった体外受精胚に適したエレクトロポレーション条件 (媒精後 12 時間、Poring パルス幅 0.5MS、Transfer 電圧 10V) で Exon1 配列のゲノム編集を実施したところ、ゲノム編集胚の胚盤胞への発生率はゲノム編集処理を行わなかった胚の発生率と変わらなかった (図 5)。

また、その時のゲノム編集効率は 61.5% と高かった (図 6)。一方、変異パターンには、付加、欠損、置換などがみられ (図 6)、欠損が多かった単為発生胚の変異パターンとはやや異なっていた。

(4) ブタ精巣からの CADM1 の検出

本研究では、ブタ精巣から細胞接着分子 CADM1 を初めて検出した。CADM1 は、中間型精原細胞から厚糸期の精母細胞と伸張精子細胞に発現したが、円形精子細胞と成熟精子には発現しなかった(図7)。この結果は、マウスの精巣における CADM1 の発現と概ね一致する(若山と井関、2009)。

ブタ組織において、マウスと同様の状態で CADM1 が検出されたことから、CADM1 はブタにおいてもマウスと同様に精子形成機能に重要な影響を及ぼしているものと推察される。今回明らかにしたブタ体外受精胚を用いた CRISPR / Cas9 / エレクトロポレーション法によりノックアウトブタを作製し解析することで、その機能を明らかにすることができる。

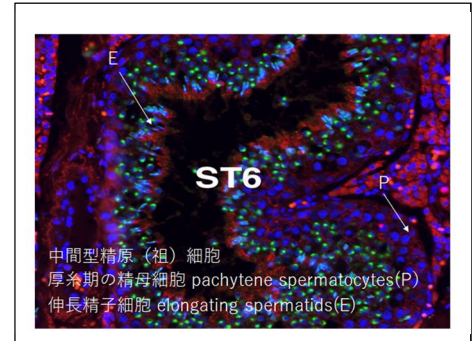


図7 体外受精ブタ胚のゲノム編集効率

<引用文献>

Kawarasaki T, Otake M, Tsuchiya S, Shibata M, Matsumoto K, Isobe N. Co-transfer of parthenogenotes and single porcine embryos leads to full-term development of the embryos. Anim Reprod Sci. 2009 May;112(1-2):8-21.

Kwon J, Namgoong S, Kim NH. CRISPR/Cas9 as Tool for Functional Study of Genes Involved in Preimplantation Embryo Development. PLoS One, 2015, 16, 10(3):e0120501.

Mashiko D, Young SAM, Muto M, Kato H, Nozawa K, Ogawa M, Noda T, Kim Y J, Y Satouh, Fujihara Y, Ikawa M. Feasibility for a Large Scale Mouse Mutagenesis by Injecting CRISPR/Cas Plasmid Into Zygotes. Dev Growth Differ, 2014, 56, 122-129.

Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K. CRISPRdirect: Software for Designing CRISPR/Cas Guide RNA With Reduced Off-Target Sites. Bioinformatics. 2015, 31, 1120-1123.

若山 友彦・井関 尚一. 精子形成に必須の細胞接着分子 CADM1/IGSF4A/SgIGSF. Reproductive, Immunology and Biology, 23 巻、2009, 1-10

Wakayama T, Koami H, Ariga H, Kobayashi D, Sai Y, Tsuji A, Yamamoto M, Iseki S. Expression and Functional Characterization of the Adhesion Molecule Spermatogenic Immunoglobulin Superfamily in the Mouse Testis. Biol Reprod, 2003, 68, 1755-1763.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 若山 友彦、野村 若菜、犬丸 諒子、佐藤さくら、Suthat Duangchit、野口 和浩、河原崎達雄
2. 発表標題 哺乳類の精子形成における細胞接着分子Cell adhesion molecule-1の発現と局在
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第37回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河原崎 達雄、森山 うらら、柿本 千夏、山本 麻由、松本 大和
2. 発表標題 単為発生胚を用いた CRISPR/Cas9・エレクトロポレーション法によるブタゲノム編集条件の検討
3. 学会等名 日本畜産学会第125回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 若山友彦、野村若菜、犬丸諒子、佐藤さくら、河原崎達雄、D Suthat、野口和浩
2. 発表標題 哺乳類の精巢の精子形成と細胞接着分子Cell adhesion molecule-1の発現と局在
3. 学会等名 第49回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	若山 友彦  (WAKAYAMA Tomohiko)  (70305100)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授    (17401)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	大竹 正剛  (OTAKE Masayoshi)  (90605677)	静岡県畜産技術研究所・中小家畜研究センター 養豚・養 鶏・上席研究員    (83810)	