

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02388

研究課題名(和文)げっ歯類から中型動物までを対象とする高汎用性トランスジェニック作製技術の開発

研究課題名(英文) Developing a versatile technique to create transgenic rodents and medium sized animals

研究代表者

依馬 正次 (Ema, Masatsugu)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授

研究者番号：60359578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：外来DNA断片をゲノムに挿入するTg作製技術は、前核形成期の受精卵に線状化DNAを顕微注入する方法が世界的に使用されているものの、その効率は数%-数十%と低いことが課題であった。piggyBacトランスポザターゼとトランスポゾンシステムを用いてトランスジェニックマウスの作製に取り組み、モザイク性を評価したところ、2細胞期以降に組み込まれたトランスジーンを確認した。また、マウスゲノムに組み込まれたトランスジーン的位置を次世代シーケンサーで決定したところ、遺伝子が存在するgene body領域だけでなく、遺伝子間領域にも分布していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モザイク性の低い高品質なトランスジェニック動物の作出方法が開発されれば、研究の効率化が促進されることや、トランスジェニックが挿入されていないいわゆる“ハズレ個体”の安楽死の回避などに繋がるものと期待される。さらにブタやサルなどの中型動物では、トランスジーンを期待通りに発現しないモザイク個体が問題となっているが、本研究の技術開発により、動物実験の基準理念である「3Rの原則」に則った個体作出に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The pronucleus injection is widely used for generation of transgenic animals, but the efficiency is very low (2-30%). We attempted to establish a novel technology to generate transgenic animals with piggyBac transposase and transposon, and found that the efficiency is quite high (nearly 100%), but there is substantial genetic mosaicism. We also investigated the location of integration of transgenes and found that the transposons are integrated into intergenic and gene body regions.

研究分野：発生工学

キーワード：トランスポゾンベクター トランスジェニック トランスポザターゼ

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歴史的に発生工学技術の開発により、多くの有用なヒト疾患モデル動物が作出され、医学・生物学の発展に貢献してきた。特に 2013 年に報告された CRISPR/Cas9 による受精卵ゲノムの遺伝子操作によってノックアウト個体を簡便に作出することが可能となり (Wang et al., *Cell*, 2013)、外来 DNA をノックインすることも低効率ながらも可能になってきたものの、中型動物では依然として外来遺伝子の発現のためにはトランスジェニック (Tg) 作製技術が主流となっている。しかし、外来 DNA 断片をゲノムに挿入する Tg 作製技術は、1980 年に開発された受精卵の前核に線状化 DNA を顕微注入する方法が 40 年以上に渡って世界的に使用されているものの、その効率は数%~数十%と低いことが課題であった。さらに、100kb を超える長大な DNA (BAC (Bacterial artificial chromosome) Tg など) になると作出効率がさらに低下してしまうことも課題であった。このようにげっ歯類から中型動物までの Tg 作製技術の課題を広く俯瞰し、全く新しい Tg 作製手法の開発が必要と考えられた。

トランスポザゼは DNA 転移酵素であり、動く遺伝子であるトランスポゾン DNA をゲノムの各所に組み込むとともに切り出す活性も有している。20 年程前から Sleeping beauty, PiggyBac, Tol2 などのトランスポザゼが発見され、ゲノムに DNA を組み込む活性に着目して、Tg 動物の作製に用いられてきたが (Yant et al., *Nat. Genet.*, 2000; Ding et al., *Cell*, 2005)、次に述べる課題があるため、Tg 作製の現場では殆ど使用されていない。例えば、PiggyBac トランスポザゼ (PBase)・トランスポゾン系を用いて説明する。PBase によってトランスポゾン中の ITR 配列に挟まれた Tg がゲノム中に組み込まれるが、現行の PBase はタンパクレベルで安定であるため、2 細胞期以降の割球においても活性が持続し、組み込まれた Tg がゲノムから切り出されてしまう確率が高まってしまう。結果として、Tg を持つ細胞と持たない細胞から成るモザイク個体が得られてしまうことが大きな問題であった。特に世代時間が長いサルなどの中型動物では次世代まで待つことは難しく F0 世代で解析する必要性が高いため、個体を構成する全ての細胞で均一に Tg を有する Tg 動物作製技術の開発が課題となっていた (Scita et al., *Sci., Rep.* 2016, *Biol. Reprod.* 2019)。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、活性制御型 PBase を新たに開発することで、トランスポゾンベクターを受精卵の 1 細胞期に局限してゲノムに組み込ませるよう制御し、モザイク性の無い高品質なトランスジェニック動物を 100%の効率で作製する技術を確立することである。

### 3. 研究の方法

#### 薬剤誘導型 PBase

薬剤でトランスポザゼ活性を制御可能な PBase を新たに開発するために、変異型 FKBP ドメインあるいは変異型エストロゲン受容体ドメインを PBase の N 末や C 末側に連結した様々な発現ベクターを構築し、マウス ES 細胞に導入、薬剤依存的なゲノムへの組み込み活性を評価する。

#### BAC トランスジーン構築

PBase によるゲノムへの組み込みに必要な ITR 配列を、BAC Tg DNA (研究代表者が構築した血管内皮細胞に GFP が発現する Flk1-GFP BAC Tg を用いる)のベクター骨格部分に導入する。

#### Tg マウス・ラットの作製

PBase mRNA を合成、体外受精卵にエレクトロポレーションもしくはマイクロインジェクションで導入する。その後トランスポザゼ活性を誘導するため、Shield1 (変異型 FKBP (DD)) に結合し、タンパクの安定化を誘導) および Tamoxifen を添加する。前核形成期に Tg DNA (5kb) をマイクロインジェクションで導入する。

#### Tg カニクイザルの作製

当施設の常法により、カニクイザル卵を雌カニクイザルから採卵し、顕微授精により受精卵を調製する (Yamasaki et al., *Theriogenology*, 2011)。Tg マウス (5kb のインサートを持つ Tg) を作製するための条件下で、PBase mRNA をエレクトロポレーションもしくは顕微注入によりカニクイザル受精卵に導入する。次に蛍光タンパク質をコードする Tg DNA を前核期のカニクイザル受精卵にマイクロインジェクションで導入する。移植後 30 日目に超音波検査を行い、子宮で正常に着床・発生が進行しているかどうか確認する。実際に Tg DNA がカニクイザルゲノムに組み込まれたかどうか判断するために、大部分の組織が発生している胎児を解剖し、各組織における

GFP の発現を調べる。

コピー数の評価

サザン解析、デジタル droplet PCR および次世代シーケンサーを用いることにより、Tg コピー数とゲノムの挿入箇所の同定を行う。

#### 4. 研究成果

薬剤誘導型トランスポザーゼの開発

先ずトランスポザーゼ活性を薬剤で制御可能な PBase を新たに開発した。具体的には、変異型 FKBP ドメインあるいは変異型エストロゲン受容体ドメインを PBase に連結した様々な発現ベクターを構築し、マウス ES 細胞に導入してコロニー数を評価して transposition 活性を評価した。結果として、薬剤なしでは殆ど活性がなく、薬剤添加により高い活性を呈する PBase を新たに開発した。

Tg マウス・ラットの作成

PBase mRNA を合成、体外受精卵にエレクトロポレーションで dose を振って導入後、Tg DNA を前核期の受精卵にマイクロインジェクションで導入したところ、100%の胚が Tg となる条件をマウスとラットで見出すことが出来た。次に、心筋細胞で GFP、全身性に tdTomato を発現する Tg を導入したところ、100%の胚で全身が tdTomato を発現する一方、心筋細胞が GFP を発現することが分かった (以下の [bioRxiv preprint](#))。染色体への組み込まれた位置を決定したところ、30%程度が遺伝子領域、残りが遺伝子間領域で会った。

Tg カニクイザルの作成

前核期のカニクイザル受精卵に Tg をマイクロインジェクションで導入後、胚盤胞を仮親へ移植した。30 日目に超音波検査を行い、子宮で正常に着床・発生が進行しているかどうか確認した。1 頭が妊娠したことを確認したが、妊娠後期で流産した。その流産個体は、PCR により、Tg であることを確認した。

今回得られた知見は、マウスからサルまでの幅広い実験動物に適用可能な Tg 作製技術基盤の構築に繋がるものと期待される。今後、高品質な実験動物を供給するバイオリソース供給体制基盤の構築にも寄与できることから、我が国の医科学研究の底上げに貢献することが期待される。

Okamura E, Mizuno S, Matsumoto S, Murata K, Tanimoto Y, Huong DT, Suzuki H., Kang W, Ema T, Morimoto K, Kato K, Matsumoto T, Masuyama N, Kijima Y, Morimura T, Sugiyama F, Takahashi S, Mizutani E, Woltjen K, Yachie N, **Ema M\***. Highly efficient transgenic mouse production using piggyBac and its application to rapid phenotyping at the founder generation. *bioRxiv* [preprint] 10.1101/2023.12.10.570953, 2023

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okamura E, Mizuno S, Matsumoto S, Murata K, Tanimoto Y, Huong DT, Suzuki H., Kang W, Ema T, Morimoto K, Kato K, Matsumoto T, Masuyama N, Kijima Y, Morimura T, Sugiyama F, Takahashi S, Mizutani E, Woltjen K, Yachie N, Ema M	4. 巻 10
2. 論文標題 Highly efficient transgenic mouse production using piggyBac and its application to rapid phenotyping at the founder generation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 570953
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.12.10.570953	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 依馬 正次
2. 発表標題 PKD1ノックアウトカニクイザルの作製・解析と今後の展開
3. 学会等名 日本毒性学会（招待講演）
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 依馬 正次
2. 発表標題 遺伝子改変カニクイザルを用いた ヒト疾患モデリング
3. 学会等名 再生医療学会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Masatsugu Ema
2. 発表標題 Modeling Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease with Genome-Edited Cynomolgus Monkeys
3. 学会等名 ゲノム編集学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

## 〔図書〕 計3件

1. 著者名 松本 翔馬, 依馬 正次	4. 発行年 2023年
2. 出版社 生体の科学	5. 総ページ数 2
3. 書名 マカクにおける遺伝子改変技術と疾患モデルの作製	

1. 著者名 岡村 永一, 依馬 正次	4. 発行年 2022年
2. 出版社 遺伝子医学	5. 総ページ数 6
3. 書名 カニクイザルを用いた生命科学研究の最新動向	

1. 著者名 武藤 真長, 依馬 正次	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学のあゆみ	5. 総ページ数 6
3. 書名 カニクイザル ヒト橋渡し研究の大本命	

## 〔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	本多 新  (Honda Arata)  (10373367)	自治医科大学・医学部・教授   (32202)	

6. 研究組織（つづき）

	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	水野 聖哉  (Seiya Mizuno)  (10633141)	筑波大学・医学医療系・准教授    (12102)	
研究分担者	ウォルツェン クヌート  (Knut Woltjen)  (50589489)	京都大学・iPS細胞研究所・准教授    (14301)	
研究分担者	守田 昂太郎  (Kohtaro Morita)  (80826545)	京都大学・医学研究科・特定助教    (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関