

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05890

研究課題名（和文）卵割期におけるESCRT複合体の機能解明を目指した遺伝子改変マウスの解析

研究課題名（英文）Analysis of genetically modified mice to elucidate the function of the ESCRT complex during the cleavage stage.

研究代表者

高林 秀次（Takabayashi, Shuji）

浜松医科大学・光医学総合研究所・准教授

研究者番号：70372521

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）様病態を自然発症する新規突然変異マウスの原因遺伝子として、ESCRT-IIIのサブユニットであるChmp2a遺伝子を発見した。本研究では、細胞分裂や膜のリモデリングに機能するESCRT-IIIの構成タンパクであるChmpファミリー遺伝子のKOマウスを作製した。これらKOマウスを用いた発生初期時に卵割期における表現型解析を行い、受精卵の卵割期におけるESCRT-IIIの機能を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ESCRT-IIIはMVB形成や細胞質分裂等の膜のリモデリングに関係している。細胞などを用いた研究で機能解析が行われてきたが、マウスを用いた解析がほとんどされていなかった。本研究において、ESCRT-IIIの構成成分であるChmpファミリー遺伝子のKOマウスを作製に成功した。卵割期自体には影響がないことが分かったので、今後さらなる解析が期待される。

KOマウスの作製はi-GONAD法を用いて行った。そのために効率的なi-GONAD法の開発研究を行った。

研究成果の概要（英文）：The Chmp2a gene, a subunit of ESCRT-III, was discovered as the causative gene for a novel mutant mice that spontaneously develops amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like pathology. In this study, we generated KO mice for the Chmp family gene, a component protein of ESCRT-III that functions in cell division and membrane remodeling. Phenotypic analysis of these KO mice during early development at the cleavage stage was performed to clarify the function of ESCRT-III during the cleavage stage of fertilized eggs.

研究分野：発生学

キーワード：ESCRT-III Chmp2 Chmp3 Chmp4 i-GONAD

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化 (ALS) は脊髄中の運動ニューロンが選択的に侵され、重篤な筋肉の萎縮をきたす神経変性疾患である。申請者は ALS 様病態を自然発症する新規劣性突然変異マウスを発見し、その原因遺伝子が *Chmp2A* (charged multivesicular body protein 2A) 遺伝子のミスセンス点突然変異であることを見つけた。*Chmp2A* タンパク質は ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) -III サブユニットの一つである。

ESCRT-III は ウイルスの出芽、多腔性エンドソーム (MVB) の形成、細胞分裂時の膜の切り出しに関係している (図 1)。特に、MVB を形成し、ユビキチン化を受けた不要な膜タンパク質を分解する働きがある。ESCRT-III サブユニットの機能不全は不要な膜タンパク質の MVB への移行を阻害する事が知られている。申請者は 2016 2018 年度の基盤研究(C)の科研費を得て、*Chmp2A* の KO マウス (*Chmp2A*^{-/-} KO) および変異 KI マウス (*Chmp2AKI*) を申請者らが開発した新規ゲノム編集マウス作製法 (*i*-GONAD 法) により作製した。その結果、*Chmp2AKI* マウスは生後 1 か月程度生存し、神経変性による後肢麻痺が確認された。一方、*Chmp2A*^{-/-} KO マウスは胎生致死となることを明らかにした。

ESCRT-III は *Chmp* (charged multivesicular body protein) ファミリーである *Chmp2*(A,B), *Chmp3*, *Chmp4*(B,C) および *Chmp6* の必須サブユニットが渦巻き状の構造をとる。*Chmp3* および *Chmp6* KO マウスは胎生致死となることが報告されている。*Chmp4B* のジーントラップマウスも胎生致死となる。これらのことから、ESCRT-III は胚発生のごく初期にも機能している可能性が考えられた。マウス発生期における ESCRT-III の機能ははまだ明らかとなっていない。ESCRT-III が細胞分裂の際の膜の切り離しに関わっていることから、ESCRT-III が受精卵の卵割期の膜の分離にも機能しているのかを明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが開発した *i*-GONAD 法を駆使して *Chmp* ファミリー KO マウス および *Chmp* ファミリー蛍光標識 KI マウスを短時間に作製し、これらマウスを用いた表現型解析により受精卵の卵割期における ESCRT-III の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

i-GONAD法を用いた*Chmp*ファミリーKOマウスの作製および表現型解析

ESCRT-III の必須ドメインである *Chmp2A*, *Chmp3*, *Chmp4B*, *Chmp6* の KO マウスを *i*-GONAD 法により作製する。

i-GONAD 法は妊娠確定日の 0.7 日齢の卵管膨大部へ Cas9 タンパク質および遺伝子特

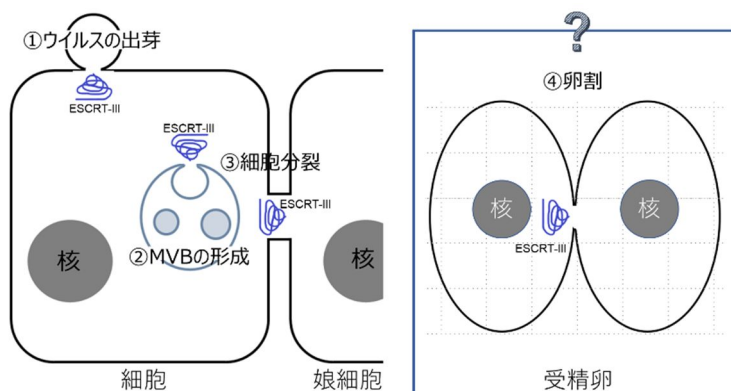


図1:ESCRT-IIIの機能 : ①ウイルスの出芽、②MVBの形成、③細胞分裂の際の膜の切り離しなどの膜のリモデリングに関与している。④卵割での機能は不明

異的なガイド RNA の RNP 溶液を注入し、エレクトロポレーターを用いて電気穿孔を行い、卵管膨大部内の受精卵に直接ゲノム編集を行う方法であり、最短で1か月程度でノックアウトマウスの作製が可能である。*i*-GONAD 法を施行したメスから生まれた Founder マウスのサンガーシーケンスを行い、目的の変異を有するマウスを選別する。次世代以降のマウスの遺伝子型判定は、領域特異的な PCR で行う。

作製した合計4系統の KO マウスの表現型解析を行う。ヘテロ同士で交配を行い、胎齢を追って胎子を回収し、異常の有無を観察する。

体外受精を行い卵割の有無を確認する。

Chmp KI マウス作製のための *i*-GONAD 法の改良

i-GONAD 法により *Chmp2a*、*Chmp3* および *Chmp4b* の各遺伝子に対して Flag タグおよび蛍光遺伝子の導入を試みた。その際に、少量の single strand oligo-DNA (ssODN) しか入手ができなかったために、少量の ssODN でも KI が可能かを調べる必要があり、効率の良い KI 法を改良した。

i-GONAD 法を用いた *Chmp* ファミリー KI マウスの作製

Chmp2a、*Chmp3* および *Chmp4b* を可視化する目的で、*Chmp2a*、*Chmp3* および *Chmp4b* 遺伝子上流に Flag タグ配列を導入した Flag KI マウスと下流に蛍光遺伝子を導入した蛍光 KI マウスの作製を試みた。

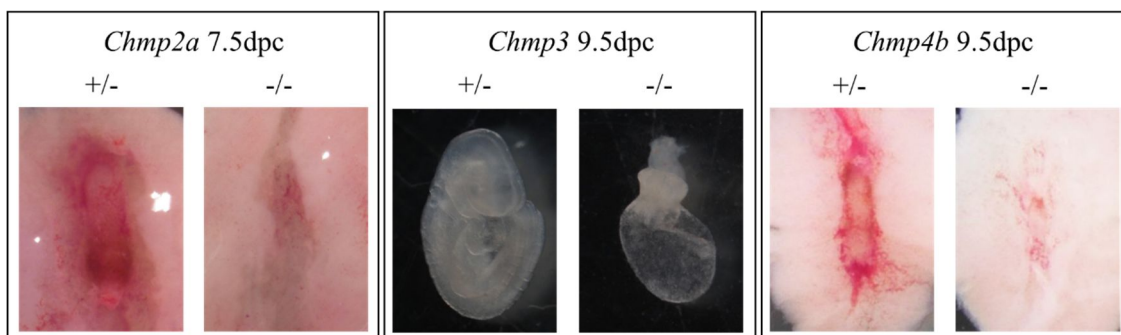
4. 研究成果

Chmp ファミリー KO マウスの作製と表現解析

Chmp2a、*Chmp3*、*Chmp4b* および *Chmp6* の遺伝子に対する KO マウスをそれぞれ作製した。*Chmp6* についてはファウンダーマウスが得られたが系統が絶えてしまったため、解析ができなかった。*Chmp2a* の Exon2、*Chmp3* の Exon4 および *Chmp4b* の Exon2 にそれぞれ変異が入った KO マウスが作製できた。

それぞれのヘテロ同士を交配した結果、どの系統においても、生まれた仔にはホモ個体は認められなかった。

更にヘテロ同士を交配して、7.5 日齢 (7.5dpc) から 9.5 日齢 (9.5dpc) の胎子を確認した結果、*Chmp2a* KO および *Chmp4b* KO ホモ個体は 7.5dpc 胚には認められなかった。*Chmp3*



KO ホモ個体は 9.5dpc 胚で異常が認められた (図 2)。

図 2 各種 KO アウトマウスの胎仔期の表現型

体外受精により卵割を調べた結果、ホモ個体も卵割は正常であった。着床の形跡もあることから Chmp ファミリー遺伝子の KO ホモ個体の卵割は正常に行われていることが示唆された。

KI 効率を上げるために i-GONAD 法の改良

各 Chmp 遺伝子上流に Flag タグをつけた KI マウスと下流に蛍光遺伝子を導入したマウスを作製するために、i-GONAD 法の KI 効率を上げる方法を検討した。

検討項目として、ssODN の濃度および KI を行う時間について検討した結果、KI の時間は 16 時よりの 22 時近くに行う方が KI 効率の改善が認められた (表 1)。

表 1 施行時間による KI 効率の検討

実験開始時間	ゲノム編集液	放置時間	胎仔数	ノックイン胎仔数 (%)	ゲノム編集された胎仔数	
					indels数 (%)	mosaic数 (%)
11:00	RNP+ HAase	3分	13	4(31%)	10 (77%)	4 (38%)
13:00	RNP+ HAase	3分	15	5 (33%)	13 (87%)	6 (40%)
16:00	RNP	0分	93	29 (31%)	53 (57%)	14 (15%)
18:00	RNP	0分	16	6 (38%)	10 (63%)	2 (13%)
20:00	RNP	0分	61	25 (41%)	21 (35%)	8 (13%)
22:00	RNP	0分	47	22 (47%)	20 (43%)	5 (11%)

更に蛍光遺伝子の配列 1Kb を専門の業者に外部注文すると ssODN の濃度は 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度にしかない、この濃度は通常の濃度 (2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) の 20 分の 1 である。この濃度においても KI が可能であることを確認するために ssODN 濃度を検討した結果、0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ でも i-GONAD において KI が可能であることが明らかとなった (表 2)。

表 2 ssODN 濃度による KI 効率の検討

ssODN 濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	実験 回数	妊娠数	胎仔数	平均 胎仔数	Modified mice	KI mice
0.1	6	4	34	8.5	20 (59%)	4 (12%)
0.2	6	4	21	5.3	13 (62%)	4 (19%)
0.5	6	5	30	6.0	21 (70%)	11 (37%)
1.0	6	2	12	6.0	11 (92%)	5 (42%)
2.0	6	3	10	3.3	10 (100%)	3 (30%)

i-GONAD 法を用いた *Chmp* ファミリー KI マウスの作製

i-GONAD 法の改良を受け、*Chmp2a*、*Chmp3* および *Chmp4b* 遺伝子上流に Flag タグ配列を導入した Flag KI マウスの作製を試みた。その結果、*Chmp2a*-Flag KI および *Chmp4b*-Flag KI が作製できた。しかしながら、それぞれのホモマウスの作製には至っていない。さらに、下流に蛍光遺伝子を導入した蛍光 KI マウスの作製を試みた結果、*Chmp2a* および *Chmp3* 遺伝子の蛍光遺伝子 KI マウスができたが、シーケンスの結果それぞれ一部の遺伝子欠損しているために蛍光を発するマウスの作製には至っていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shuji Takabayashi, Kenta Iijima, Masumi Tsujimura, Takuya Aoshima, Hisayoshi Takagi, Kazushi Aoto and Masahiro Sato	4. 巻 23(18)
2. 論文標題 Successful i-GONAD in Mice at Early Zygote Stage through In Vivo Electroporation Three Min after Intraoviductal Instillation of CRISPR-Ribonucleoprotein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 10678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms231810678	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Aoshima Takuya, Kobayashi Yukari, Takagi Hisayoshi, Iijima Kenta, Sato Masahiro, Takabayashi Shuji	4. 巻 21
2. 論文標題 Modification of improved-genome editing via oviductal nucleic acids delivery (i-GONAD)-mediated knock-in in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Biotechnology	6. 最初と最後の頁 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12896-021-00723-5	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Aoto Kazushi, Takabayashi Shuji, Mutoh Hiroki, Saito Hiroto	4. 巻 23
2. 論文標題 Generation of Flag/DYKDDDDK Epitope Tag Knock-In Mice Using i-GONAD Enables Detection of Endogenous CaMKII and Proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms231911915	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato Masahiro, Nakamura Shingo, Inada Emi, Takabayashi Shuji	4. 巻 23
2. 論文標題 Recent Advances in the Production of Genome-Edited Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2548 ~ 2548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23052548	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高林 秀次、飯島 健太、辻村 真澄、青島 拓也
2. 発表標題 i-GONAD法の開始時間を変える方法
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高林 秀次、青島 拓也、飯島 健太、辻村 真澄
2. 発表標題 i-GONAD 法でのノックインマウス作製におけるホモロジーアームの検討
3. 学会等名 第71回日本実験動物学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高林 秀次、飯島 健太、辻村 真澄、青島 拓也
2. 発表標題 第70回ノックインマウス作製のためのi-GONAD法の開始時間の最適化
3. 学会等名 日本実験動物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高林 秀次、飯島 健太、辻村 真澄、青島 拓也
2. 発表標題 ヒアルロニダーゼを用いたi-GONAD法の開始時間の検討
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------