

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650233

研究課題名(和文) 食虫目スンクスを用いた新規な遺伝子改変モデル動物の開発

研究課題名(英文) Establishment of transgenic musk shrews (*Suncus murinus*)

研究代表者

前多 敬一郎 (Maeda, Kei-ichiro)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30181580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトのモデルとして有用な実験動物であるスンクスでは、これまで初期胚操作技術が確立されていなかった。本研究において、スンクスの受精卵採取、偽妊娠誘起ならびに胚移植の確立に成功し、マイクロインジェクション法によりVenus遺伝子をスンクス前核期胚に導入したところ産子を得ることに成功した。Venus遺伝子を発現する個体は未だ得られていないが、今後例数を重ねることにより遺伝子改変スンクスの作出が期待できる。また哺乳類では、霊長類とスンクスでのみ存在が確認されているGnRH2遺伝子を標的とした遺伝子改変スンクスの作出を目指し、スンクスGnRH2遺伝子のプロモーター領域を同定した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have established embryo manipulation techniques, such as fertilized egg collection, induction of pseudopregnancy and embryo transfer in the musk shrew. Furthermore, we successfully produced a pup from transgenic embryos in the musk shrew. So far, we have not yet produced the transgenic musk shrew expressing Venus reporter gene, but those methods established in the present study lead to generate transgenic musk shrews in the near future. In addition, we have identified promoter sequence of musk shrew GnRH2 gene, which is deficient in other rodent animal models, so that we generate GnRH2-Venus transgenic musk shrew to uncover the physiological role of GnRH2 in primates including humans.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：スンクス 遺伝子改変動物 GnRH2

## 1. 研究開始当初の背景

スルクスは食虫目に属する小型実験動物である。スルクスはマウスやラットと異なる生理学的特徴を多く有し、例えば、薬物や動揺刺激により嘔吐するため(マウス・ラットは嘔吐しない)、薬物動態試験に用いられたり、腸の蠕動運動に関わるペプチドであるモチリンを有しているため、ヒトやイヌでのみ確認されている腸の収縮作用を研究するモデル動物として利用されている。また生殖系において、スルクスはヒトと同じく GnRH1、GnRH2 の 2 種類の性腺刺激ホルモン放出ホルモンを有していることが明らかになっている。GnRH2 は性行動や食欲に関与すると考えられているものの、詳細な機能は明らかにされていない。GnRH2 遺伝子はマウスやラットだけでなくほとんどの哺乳類で欠失や偽遺伝子化しているため機能的でなく、現在 GnRH2 が機能的に働いていることが報告されているのは、霊長類以外ではスルクスのみである。スルクスにおいて遺伝子改変技術が確立されれば、これらの生理学的メカニズムの解明に必須である生理機能解析が遺伝子改変スルクスを用いて容易に可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究では、1)スルクス初期胚の操作技術を確立し、緑色蛍光タンパク (GFP) よりも強い発光強度を持つ Venus 遺伝子を全身性に発現する遺伝子改変スルクスを作成すること、2)スルクス GnRH2 遺伝子のプロモーター領域の同定を行い、GnRH2 遺伝子特異的に Venus を発現した遺伝子改変スルクスを作成することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) スルクス初期胚操作法の確立

遺伝子改変スルクスを作成するにあたり、マウス、ラットおよびスルクスと同じ交尾排卵動物であるウサギなどにおいてすでに確立されている初期胚操作技術を参考にし、スルクスにおける初期胚操作技術の確立を試みた。

実験には 8 週齢以上の雌および 12 週齢以上の雄 KAT 系統スルクスを用いた。KAT 系統は 1991 年にネパールのカトマンズで捕獲され、クローズドコロニーで維持された系統である。

### 過剰排卵誘起

マウスやラットで確立されている妊馬血清性腺刺激ホルモン (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) およびヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin, hCG) を用い、72 時間間隔で PMSG および hCG を雌スルクスに投与し、hCG 投与後雄と交配した。

### 体外受精

PMSG および hCG 投与による過剰排卵誘起に

よって得られた未受精卵と精巣上体尾部から採取した精子を用い、マウスやラットにおける体外受精用培地である TYH、m-KRB 培地にて体外受精を行った。

### 初期胚体外培養

マウス、ラットおよびブタなどで体外培養培地として用いられている KSOM、TYH、DMEM + RPMI1640、m-KRB、m-PZM 培地を用いて前核期胚の培養を行い、スルクス初期胚に適した培地の検討を行った。

### 胚移植

マウスの偽妊娠誘起法やウサギの偽妊娠誘起法(鈴木 他、2000)を参考に、雌スルクスに偽妊娠誘起を行った。レシピエントスルクスに hCG (10 IU) を投与、あるいは hCG (10 IU) 投与後すぐに精管結紮した雄と交配させ偽妊娠を誘起させた。自然交配したドナースルクスから 2-4 細胞期胚または胚盤胞を採取し、偽妊娠を誘起したレシピエントに移植した。2-4 細胞期胚は卵管内に、胚盤胞は子宮内に移植を行った。

## (2) 全身性に Venus 遺伝子を発現するスルクスの作出

### コンストラクトの作製

サイトメガロウイルス由来の CMV エンハンサーに、chicken beta actin プロモーター、Venus 遺伝子を組み込んだコンストラクトを作製した。

### 前核期胚への遺伝子導入

自然交配したドナースルクスから前核期胚を採取し、卵丘細胞を取り除いて使用した。マイクロインジェクション法により Venus 遺伝子を胚に導入した。遺伝子導入した胚はレシピエントスルクスに移植し、産子を確認した。

## (3) GnRH2 特異的 Venus 遺伝子発現スルクスの作出

雌スルクス脳の中脳から RNA を単離し、RACE 法によりスルクスの GnRH2 遺伝子のクローニングを行った。また、Genome Walker™ Universal Kit (TaKaRa) を用いて GnRH2 ゲノム DNA の塩基配列を同定し、GnRH2 プロモーター領域および、エクソン、イントロン領域を決定した。

## 4. 研究成果

### (1) スルクス初期胚操作法の確立

#### 過剰排卵誘起

PMSG および hCG 投与による過剰排卵誘起による平均排卵数は、 $5.8 \pm 8.1$  個 (5.0 IU、 $n=5$ )、 $17.4 \pm 8.4$  個 (7.5 IU、 $n=5$ )、 $20.2 \pm 9.7$  個 (10 IU、 $n=5$ ) であった。7.5 IU および 10 IU 投与では自然交配における排卵数 ( $3.4 \pm 1.6$  個、 $n=7$ ) の約 6 倍の排卵数が得られた。また卵丘細胞に覆われた卵の割合はそ

れぞれ 84.1% (5 IU), 77.0% (7.5 IU), 64.4% (10 IU) であった。前核がみとめられたものを受精卵と判断し、受精卵数 (受精率) を計測したところ、5.0、7.5、10 IU それぞれ  $0.2 \pm 0.4$  個 (3.4%)、0 個 (0%)、 $1.2 \pm 1.9$  個 (5.9%) であった。自然交配による受精卵数は  $2.9 \pm 1.2$  個であり、受精率は 83.3% であった。

自然交配では、排卵されたほとんどの卵に第二極体および前核がみとめられたが、過剰排卵誘起においては第二極体および前核がみとめられない卵が多数観察された。マウスでは、PMSG と hCG 投与により過剰排卵誘起された卵子の中に、形態異常や未成熟といった質の悪い卵子が存在することが知られており、そのような卵子は必ず卵丘細胞を欠失している (Allen J and McLaren A 1971, Beaumont HM and Smith AF 1975, Lehtonen E and Kankondi R 1987)。unks に PMSG と hCG を 7.5 または 10 IU 投与した群は自然交配に比べ排卵数が増加し、多くの卵は卵丘細胞を有していたが、受精率はいずれも 6% 以下と低い値を示した。unks は PMSG 単回投与においても排卵が誘起されることが報告されており (Matsuzaki T et al., 1997)、今回の PMSG と hCG 投与における排卵においても、最初の PMSG 投与によって排卵が生じ、その後 72 時間の間に発育した未成熟な卵母細胞が hCG により多数排卵したことで、受精が成功しなかった可能性が考えられた。

#### 体外受精による受精卵の採取

PMSG と hCG 投与によって過剰排卵させた未受精卵を用いて体外受精を行ったところ、TYH では受精卵が得られたが、m-KRB では得られなかった。しかしながら m-KRB にハタネズミなどで受精率を向上させると報告されている hypotaurine (H) (Wakayama T et al., 1996) を添加すると受精卵が得られた。しかしながらいずれの培地においても体外受精率は平均 30% 以下と非常に低かった。

#### 初期胚体外培養

TYH、DMEM + RPMI1640 では前核期胚が 4 細胞期胚に発生した胚が観察されたが、KSOM、m-KRB (+H)、m-PZM では胚発生は観察されなかった。TYH と DMEM + RPMI1640 において発生した胚の形態を観察したところ、TYH 培地の 4 細胞期胚の方が均等に分割していた。しかしながらどちらの培地でも、胚発生率は非常に低かった。

#### 胚移植

偽妊娠誘起および胚移植では、hCG 投与または hCG 投与+交尾刺激によって偽妊娠誘起したunks のいずれの卵巣においても黄体がみとめられ、胚移植によって産子が得られた。

から の結果から、偽妊娠誘起および胚

移植による産子の獲得までの技術は確立できたが、過剰排卵誘起による受精卵の獲得方法および初期胚体外培養に関しては条件を再検討する必要がある。このため、遺伝子改変unks 作製には、1 個体から採取できる受精卵は非常に少ないが、自然交配により受精卵を採取することにし、一時的なunks 胚の培養には TYH 培地を使用することにした。

#### (2) 全身性に Venus 遺伝子を発現するunks の作出

マイクロインジェクション法によりunks 前核期胚へ Venus 遺伝子を導入したところ、前核に DNA を注入後正常に発生して移植できた胚は 36 個中 14 個であった。レシピエント 1 匹あたり 2~5 個の胚を卵管内に移植したところ、4 匹のレシピエントのうち 1 匹から産子 1 が得られた。しかし、得られた子は生後すぐに親に食殺されてしまったため、Venus 遺伝子が導入されていたかどうかは確認できなかった (表 1)。今後、例数を増やし、前核注入には CRISPR/Cas システムなどの効率の良い遺伝子導入を行うことにより、遺伝子改変unks の作出が期待される。

表1. マイクロインジェクションによる外来遺伝子導入の結果

インジェクションした卵数 (個)	移植した卵数 (個)	レシピエント数 (匹)	出生したレシピエント数 (匹)	産子数 (匹)
36	14	4	1	1

#### (3) GnRH2 特異的 Venus 遺伝子発現unks の作出

unks の中脳から単離した RNA を用いた 5' RACE 法および、3' RACE 法にてunks GnRH2 mRNA 塩基配列 399 bp を同定し、転写開始点を決定した。ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) を用いてヒトおよびアカゲザルの GnRH2 アミノ酸配列を比較したところ、相同性はそれぞれ 50% (ヒト variant1)、50% (ヒト variant2)、50% (ヒト variant3)、54% (アカゲザル) と低い値を示した。しかしながら、GnRH2 の機能活性を有する成熟ペプチド部位に相当する 13 個のアミノ酸配列は、unks においてもヒトやアカゲザルと全く同じ配列を示し、高く保存されていた。

unks の肝臓から抽出したゲノム DNA を用いた Genome Walking にて、unks GnRH2 遺伝子の転写開始点から GnRH2 遺伝子の隣に位置するunks PTPRA 遺伝子までのunks GnRH2 遺伝子上流領域ゲノム DNA 配列 4767 bp を同定し、TATA ボックス (-31) と CAAT ボックス (-216) の存在を確認した。ヒトおよびアカゲザルの同領域はそれぞれ 4952 bp、5202 bp であり、ClustalW を用いた相同性はそれぞれ 51% と 55% であった。

現在、GnRH2 遺伝子プロモーターと Venus 遺伝子を組み込んだコンストラクトを作製しており、今後 GnRH2 遺伝子を標的とした遺伝子改変スキスの作出が期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

. Tomikawa J, Uenoyama Y, Ozawa M, Fukanuma T, Takase K, Goto T, Abe H, Ieda N, Minabe S, Deura C, Inoue N, Sanbo M, Tomita K, Hirabayashi M, Tanaka S, Imamura T, Okamura H, Maeda K, Tsukamura H. Epigenetic regulation of Kiss1 gene expression mediating estrogen-positive feedback action in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: E1294-1301, (2012). 査読有

. 井上直子, 束村博子, 前多敬一郎. キスペプチンと生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌, *Clinical Neuroscience*, 30 巻: 220-222 頁, (2012). 査読無

. 井上直子, 上野山賀久, 大蔵聡, 束村博子, 前多敬一郎. 卵胞発育の中枢制御機構, *Hormone Frontier in Gynecology*, 18 巻: 391-394 頁, (2011). 査読無

. Inoue N, Sasagawa K, Ikai K, Sasaki Y, Tomikawa J, Oishi S, Fujii N, Uenoyama Y, Ohmori Y, Yamamoto N, Hondo E, Maeda K, Tsukamura H. Kisspeptin neurons mediate reflex ovulation in the musk shrew (*Suncus murinus*). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 17527-17532, (2011). 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

. 井上直子, スンクスにおける交尾排卵制御機構、第 8 回スンクス研究会、自治医科大学、2014.3.26

. 堀田章徳、山本彩子、後藤哲平、平林真澄、前多敬一郎、大森保成、本道栄一、井上直子、遺伝子改変スンクス作製に向けた胚移植法の確立、日本繁殖生物学会第 106 回大会、東京農工大学、2013.9.12-14

. 大久保紫織、大森保成、山本直之、本道栄一、井上直子、交尾刺激を伝達する神経回路の解明、日本繁殖生物学会第 106 回大会、東京農工大学、2013.9.12-14

. 井上直子、スンクスにおける生殖制御機構、スンクスを用いた脳-末梢連関研究、埼玉大学、2013.2.16

. Hotta A, Hondo E, Ohmori Y, Inoue N. Analysis of promoter region of

gonadotropin-releasing hormone 2 gene in the musk shrew (*Suncus murinus*), The 4th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists, Thailand, Phuket, 2012.10.24-26

. Ohkubo S, Hondo E, Ohmori Y, Inoue N. Elucidation of neuronal circuits that transmit the mating stimulus in the musk shrew (*Suncus murinus*), The 4th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists, Thailand, Phuket, 2012.10.24-26

. Inoue N, Sasagawa K, Uenoyama Y, Hondo E, Maeda K, Tsukamura H. Involvement of kisspeptin neurons in reflex ovulation in the musk shrew (*Suncus murinus*), The 2nd World Congress on Reproductive Biology (WCRB), Australia, Cairns, 2011.10.11

. 猪飼耕太郎、長谷川喜久、山本直之、大森保成、本道栄一、井上直子、スンクスにおける GnRH2 ニューロンの免疫組織化学的解析、日本繁殖生物学会第 104 回大会、盛岡、2011.9.15-17

. 笹川佳倫、猪飼耕太郎、上野山賀久、本道栄一、前多敬一郎、束村博子、井上直子、スンクスの交尾排卵制御機構におけるキスペプチンニューロンの関与、日本繁殖生物学会第 104 回大会、盛岡、2011.9.15-17

. 猪飼耕太郎、大森保成、本道栄一、井上直子、スンクスの脳における GnRH2 ニューロンの局在、東海実験動物研究会、名古屋市立大学、2011.7.23

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

前多 敬一郎 (MAEDA, Keiichiro)  
東京大学・大学院獣医学研究科・教授  
研究者番号：30181580

(2) 研究分担者

平林 真澄 (HIRABAYASHI, Masumi)  
生理学研究所・行動・代謝分子解析センター・准教授  
研究者番号：20353435

井上 直子 (INOUE, Naoko)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教  
研究者番号：90377789