

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：奨励研究

研究期間：2023～2023

課題番号：23H05235

研究課題名 エレクトロポレーション法と胚の高温培養によるヘテロ変異体作出法の開発

研究代表者

場崎 恵太 (Basaki, Keita)

名古屋大学・全学技術センター(医学)・副技師

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 400,000円

研究成果の概要：本研究では、エレクトロポレーション法を用いてCRISPRを導入した胚を高温培養して、モザイク体を効率的に作製する方法を検討した。胚の高温培養は胚の発生速度を促進することが知られており、ゲノム編集過程における細胞周期上の変異の導入機会を減少できると考えた。研究の結果、コンストラクトを導入した胚を38.0℃で高温培養すると、胚の分割速度が有意に促進された。まだ解析数は少ないが、その胚盤胞を仮親に移植したところ高温培養によりモザイク体を獲得することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホモ接合KOで致死となる潜性致死遺伝子を標的とする場合は、低頻度で出現するヘテロ接合体が必要となる。本研究では安価で操作も簡便なエレクトロポレーターを使用してモザイク体を作成する技術の開発を試みた。エレクトロポレーション法によりCRISPRを導入した胚を高温培養したところ、例数は少ないがモザイク体を得られた一方で、コンストラクトの濃度やエレクトロポレーションの条件には更なる検討が必要であると考えられた。本法は、潜性致死遺伝子を標的とした新たなゲノム編集ツールとして活用される可能性がある。

研究分野：発生工学

キーワード：エレクトロポレーション 高温培養 潜性致死

1. 研究の目的

近年、マイクロマニピレーターに比べて安価で操作も簡便なエレクトロポレーターが普及してきた。我々がエレクトロポレーション法を用いて前核期胚に CRISPR/Cas9 を導入したところ、ファウンダー (F0) マウスは高確率でホモ接合ノックアウト (KO) 変異を生じた一方で、ホモ KO 接合で致死となる潜性致死遺伝子を標的とする場合は、低頻度で出現するヘテロ接合体が必要となる。ゲノム編集活性は 4 細胞期よりも 8 細胞期で高く、卵割後もゲノム編集活性が継続していることが報告されている^[1]。申請者はコンストラクト導入後の胚を高温培養で卵割速度を加速できれば、細胞周期上のゲノム編集の機会が減少し、F0 世代で編集を受けなかった野生型細胞と変異細胞が混在するモザイク体の出現確率が向上して、次世代 F1 でヘテロ接合体を獲得できると考えた。本研究では、エレクトロポレーション法でゲノム編集した胚を前核期から胚盤胞期まで高温培養することでモザイク体を効率的に作製する技術の開発を目的とした。

2. 研究成果

本実験では、C57BL/6J 系統由来の前核期胚を使用した。従来の体外受精法を用いて成熟した雄より採材した精子と、過剰排卵処置を施した 3-4 週令の雌から採材した卵を HTF 培地で媒精した。媒精後 6 時間で KSOM 培地に置換して培養温度を対象群 37.0 と高温培養群 38.0 でそれぞれ培養し、前核期から桑実期までの卵割速度を経時的に計測した。胚の発生ステージを媒精用 HTF 培地から KSOM 培地に置換した時点を培養 0 時間として、18 時間、42 時間、66 時間で観察し、85 時間で胚盤胞期に到達した胚を偽妊娠マウス (プラグ陽性 2.5 日目) に子宮内移植した。移植後 17.5 日で産仔を帝王切開して里親に預けた。なお、培養温度 39 以上では、胚の変性や分割速度の遅延が生じて胚盤胞まで発生しないことが報告されており^{[2],[3]}、本実験では 38.0 で高温培養した。

モザイク体の作製効率を確認するために、メラニン形成に寄与する Tyrosinase (Tyr) 遺伝子を標的に gRNA を設計した。TAKE 法^[4]を用いて、前核期胚に CRISPR/Cas9 を導入して 85 時間培養した。発生した胚盤胞を偽妊娠マウスに移植し、獲得した産仔の毛色表現型からモザイク体の出現割合を算出した。なお、本実験では、異なる培養温度における胚の卵割速度を解析するために母比率の差の検定を用いた。

(1) 高温培養下の卵割速度と産仔率の比較

媒精後 6 時間の胚を用いて高温培養群と対照群でそれぞれ 85 時間培養した。高温培養群は、対照群に比べて培養 42 時間で 5-6 細胞期、培養 66 時間で胚盤胞期への胚発生の割合がそれぞれ有意 ($P<0.05$) に高かった (表 1.)。培養 85 時間で発生した胚盤胞を偽妊娠マウスに移植したところ、対照群の移植胚 40 個から産仔 5 匹、高温培養群で胚 38 個から産仔 5 匹をそれぞれ獲得した。移植胚から産仔までの発生割合は両群ともに 13% で有意差は認められなかった。このことから、38.0 での胚培養は、卵割速度を有意に促進させる一方で、それら胚を移植して得られた産子割合に有意差はなく、胚の高温培養が産子数に与える影響は低いことが示唆された。

(2) ゲノム編集処理後、高温培養下での卵割速度と産仔率の比較

TAKE 法を用いて媒精後 6 時間の前核期胚に CRISPR/Cas9 を導入して、対照群と高温培養群で 85 時間培養した。高温培養群は、卵割速度が培養 42 時間と 66 時間で有意 ($P<0.05$) に上昇した (表 2.)。それら胚から得られた産仔の毛色表現型を確認したところ、対照群の移植胚 51 個から得られた全産仔 7 匹がアルビノであった一方で、高温培養群の胚 78 個からえた産仔はアルビノ 7 匹とモザイク体 1 匹であった (図 1.)。移植胚から産仔までの発生割合は、対照群 14% に対して、高温培養群 10% であり、高温培養群から得られる産仔は少ない傾向にあった。

38.0 での胚培養は、ゲノム編集の有無にかかわらず卵割速度を促進する一方で、ゲノム編集処理後の胚は、未処理に比べて卵割速度が遅く、その個体化率も低下する傾向にあることが明らかとなった。それらゲノム編集した全マウスは、標的の遺伝子に変異が導入された変異体であり、高温培養群ではモザイク体を獲得できた。他方で、本研究は解析可能な例数に達していないため継続して実験を行っていく必要がある。今後は、エレクトロポレーションの導入時のコンストラクト濃度および電圧等の条件検討を行う必要があると考えられた。

	0 h		18 h		42 h		66 h	
	37.0°C	38.0°C	37.0°C	38.0°C	37.0°C	38.0°C	37.0°C	38.0°C
1cell	82	78	17 (21%)	12 (15%)	15 (18%)	9 (12%)	11 (13%)	9 (12%)
2cell			56 (68%)	64 (82%) [※]	9 (11%)	5 (6%)	9 (11%)	5 (6%)
3-4cell					48 (59%)	47 (60%)		
5-6cell						9 (12%) ^{※※}		
7-8cell						4 (5%)		
morula							47 (57%)	48 (62%)
blastocyst								12 (15%) ^{※※}
degenerated			9 (11%)	2 (3%)	10 (12%)	4 (5%)	15 (18%)	4 (5%) [※]

表 1. 各培養温度下で経時的にみた胚の発生ステージ

媒精後 6 時間で 37.0 もしくは 38.0 でそれぞれ胚を培養し、18 時間、42 時間、66 時間で胚の発生ステージを計測した。

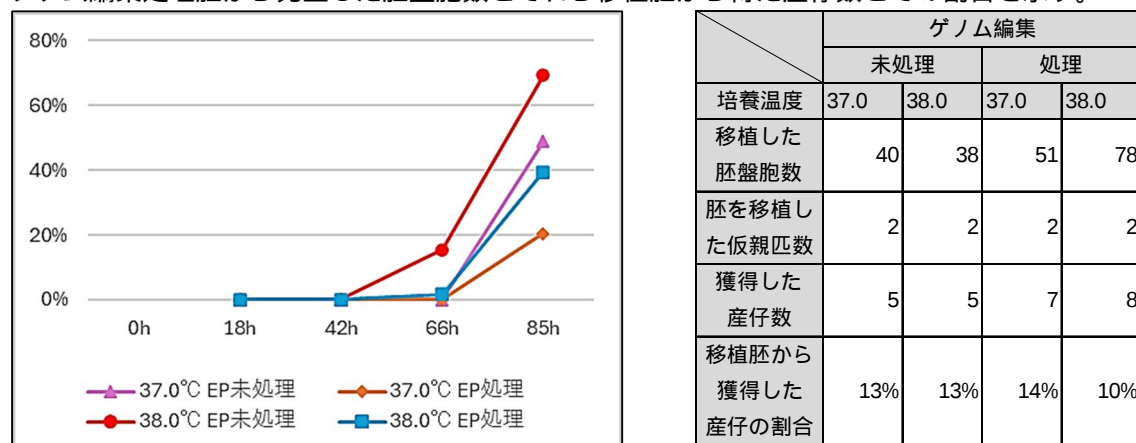
	0h		18h		42h		66h	
	37.0°C	38.0°C	37.0°C	38.0°C	37.0°C	38.0°C	37.0°C	38.0°C
1cell	215	178	46 (21%)	14 (8%) ^{※※}	34 (16%)	13 (7%)	17 (8%)	11 (6%)
2cell			158 (73%)	161 (90%) ^{※※}	67 (31%)	53 (30%)	37 (17%)	35 (20%)
3-4cell					102 (47%)	106 (60%) [※]	42 (20%)	17 (10%) ^{※※}
5-6cell						1 (1%)		2 (1%)
7-8cell								
morula							90 (42%)	101 (57%) ^{※※}
blastocyst								3 (2%) [※]
degenerated			11 (5%)	3 (2%)	12 (6%)	5 (3%)	29 (13%)	9 (5%)

表 2. ゲノム編集処理後の胚について各培養温度下で経時的にみた発生ステージ

媒精後 6 時間で TAKE 法により CRISPR/Cas9 を胚に導入して、37.0 もしくは 38.0 でそれぞれ培養し、18 時間、42 時間、66 時間で胚の発生ステージを計測した。

図 1. ゲノム編集処理後、高温培養下で経時的にみた胚盤胞の割合（左）と、それら胚盤胞から得た産仔数と発生割合（右）

左図は、ゲノム編集(EP)処理後に各培養温度で経時的に計測した胚盤胞の割合を示す。右図は、ゲノム編集処理胚から発生した胚盤胞数とそれら移植胚から得た産仔数とその割合を示す。



引用文献

- [1] Jeehyun J., Jung S.P., Byungkuk M., Sun-Ku.C., Min K.K., and Yong-Kook K. (2019) Retroelement Insertion in a CRISPR/Cas9 Editing Site in the Early Embryo Intensifies Genetic Mosaicism., Nov 8:7:273
- [2] Gad L., Michael P.D., Antonio P., William K.V., and Alan H.D. (1988) The effect of the incubation temperature on the cleavage rate of mouse embryos in vitro., June 5, 167-170
- [3] F.C.Gwazdauskas, C.McCaffrey, T.G.McEvoy and J.M.Sreenan.(1992) In vitro preimplantation mouse embryo development with incubation temperatures of 37 and 39 ., April 9, 149-154
- [4] Takehito K. and Tomoji M. (2015) Simple Genome Editing of Rodent Intact Embryos by Electroporation., PLoS One, Nov.10., e0142755

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------