

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：奨励研究

研究期間：2023～2023

課題番号：23H05244

研究課題名 ツメガエルにおける精子核移植CRISPR法に基づく高効率ノックイン技術の開発

研究代表者

鈴木 菜花 (Suzuki, Nanoka)

広島大学・技術センター・技術員

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 480,000円

研究成果の概要：分子生物学研究に汎用されるアフリカツメガエルとネッタイツメガエルの両種において、外来遺伝子を含むCRISPR反応液と精子核を同時に未受精卵に注入することにより、ゲノムDNAに対する外来遺伝子の挿入、いわゆるノックインを高効率に成功させる技術を確立した。挿入された外来遺伝子はその上流端で標的遺伝子とインフレーム融合させることができるが、下流端では部分欠失を伴い標的遺伝子にフレームシフト変異を生じさせることを発見した。そのため標的遺伝子のヌル変異を避けるには挿入部位の選択が重要なことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ツメガエルにおいて、欠損変異の導入はCRISPR法により既に確立されている。しかしノックインは個体の一部の細胞でしか起きず実用の域に達していなかった。このノックイン効率の低さは、CRISPR反応に染色体が感受性を示す時期が受精直後に限られるためであり、発生中の胚に反応液を注入する従来法では改善できない。本研究では、外来遺伝子を含むCRISPR反応液と精子核を同時に未受精卵に注入をすることによってノックイン効率を大きく向上させることに成功した。ツメガエルはヒトの疾患関連遺伝子の79%以上を持つが、本研究の成果により、ツメガエルを用いた遺伝病研究が更に発展すると期待される。

研究分野：発生生物学

キーワード：ゲノム ツメガエル エンハンサー 遺伝子発現調節 ゲノム編集

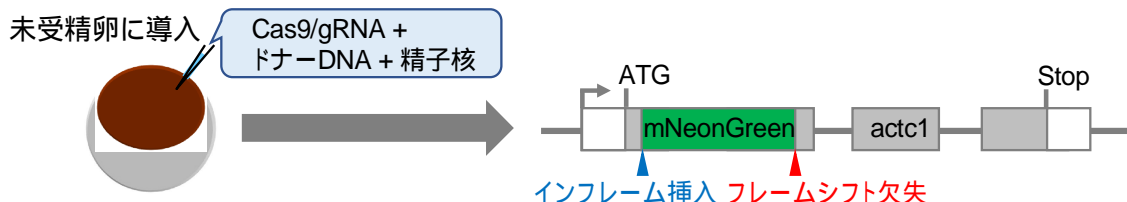
1. 研究の目的

アフリカツメガエルは分子生物学研究の主要な実験モデル生物の一つである。ネッタイツメガエルはアフリカツメガエルの近縁種であり、ゲノムサイズが小さく世代時間が半年未満と短いため、遺伝病の発症機序の解明に大きく貢献している。これまで両種において、遺伝子への欠損変異の導入については CRISPR/Cas9 法により確立されてきた。しかし標的遺伝子に対する外来遺伝子の挿入、いわゆる「ノックイン」に関しては、従来法では個体の一部の細胞にしか起きず、未だ実用の域に達していなかった。このノックイン効率の低さは、CRISPR 反応に対して染色体が感受性を示す時期が受精直後に限られるためであり、発生中の胚に反応液を顕微注入する従来の方法では改善することができない。本研究では、研究代表者らが開発してきた精子核移植法を応用し、外来遺伝子を含む CRISPR 反応液と精子核を同時に未受精卵に注入をすることによってノックイン効率を飛躍的に向上させ、技術革新をもたらすことを目的とした。

2. 研究成果

(1) ノックイン反応条件の最適化

外来遺伝子としては緑色蛍光蛋白質を発現する mNeonGreen を、挿入先遺伝子には筋肉で発現する *actc1* を選び、*actc1* の開始コドンの直下流を切断する Cas9/gRNA を調製した。*actc1* に mNeonGreen が挿入されたとき、両遺伝子産物が融合蛋白質として発現するように、mNeonGreen の上流と下流に、*actc1* の切断部位の上流側と下流側と相同な配列をインフレームで配置した 1 本鎖 DNA (ドナーDNA) を調製した。このドナーDNA を Cas9/gRNA 及び精巣から界面活性剤処理で調製した精子核と共に、アフリカツメガエルの未受精卵に顕微注入した。ドナーDNA や Cas9/gRNA の量をそれぞれ変化させて、条件を最適化したところ、得られた幼生の約 5% が筋肉全体に緑色蛍光を発した。この結果とは対照的に、発生中の胚にドナーDNA と CRISPR 反応液を顕微注入する従来法を用いて同様な実験をおこなうと、筋肉全体ではなくその一部の細胞でのみ緑色蛍光が見られた。この緑色蛍光蛋白質の発現の広さの違いは、実験処理をした個体におけるノックイン反応のモザイク率を反映しており、本研究で開発した新法では個体を構成する細胞の大部分でノックイン反応が起きたことが示唆された。次に、本研究の新法で得られた各ファウンダー幼生のゲノム DNA から挿入標的部位を PCR 法により増幅し、その PCR 断片をシーケンス解析したところ、いずれの個体においても、片方の *actc1* アレルには mNeonGreen が上流端はインフレームで、下流端はフレームシフト欠失を起こして挿入されており、もう片方のアレルには mNeonGreen の挿入は無く、標的部位にフレームシフト欠失のみが生じていることがわかった(下図)。



(2) ノックイン遺伝子座の次世代への継承の確認

交配によって *actc1* に挿入された mNeonGreen の次世代への継承を確認するため、(1)により得たファウンダー幼生の飼育を継続したが、いずれも変態に至らず致死となった。これは筋肉形成に必須な *actc1* の両アレルにおいて、mNeonGreen の挿入の有無に関わらずフレームシフト欠失によりヌル変異が生じてしまったためと考えられる。

(3) 最適化した反応条件の普遍性の検討

アフリカツメガエルの代わりにネッタイツメガエルを用いて、*actc1* の代わりに神経幹細胞で発現する *sox2* 遺伝子を標的として、ノックイン実験をおこなった。この際、ネッタイツメガエルの卵の体積はアフリカツメガエルに比べて約 1/3 であるので、ドナーDNA や CRISPR 反応液も卵あたり 1/3 量を用いた。その結果、期待通り神経系で緑色蛍光を発するファウンダーが得られたが、アフリカツメガエルにおける *actc1* の場合と同様に、それらの個体も致死となった。これも神経形成に必須な *sox2* の両アレルにおいて、フレームシフト欠失によりヌル変異が生じてしまったためである可能性が高い。

(4) まとめと展望

本研究により、ツメガエルにおいて標的遺伝子に高効率で外来遺伝子を挿入できるようになった。しかし挿入の有無に関わらず、標的遺伝子の両アレルにフレームシフト欠失が生じるために、標的遺伝子上で選んだ予定挿入部位によっては、両アレルがヌル変異になり完全に機能を失うことも明らかになった。それゆえ、ヌル変異によるファウンダーの致死を避けるには、挿入部位にストップコドンの直上流を選ぶなどの方法が考えられる。そのようにすれば、挿入が起きたアレルからは標的遺伝子産物が外来遺伝子産物を C 末端側に融合させた形で発現し、挿入が起きなかったアレルからも C 末端側のアミノ酸をわずかに欠失した標的遺伝子産物が発現すると

期待され、共に機能を失わない可能性が高い。その場合は、両アレルともにその遺伝子機能を破壊することはできなくなるが、蛍光蛋白質の発現で特定の細胞系譜を標識した組換え系統の作製には十分であり、今後はそれらリソースの開発が発展するであろう。一方、遺伝学的には、ファウンダーは致死にならず、次世代以降において遺伝子機能を失わせてその表現型を解析できることが理想であり、今後はそれを可能にする技術の開発が期待される。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hossain Nusrat, Igawa Takeshi, Suzuki Makoto, Tazawa Ichiro, Nakao Yuta, Hayashi Toshinori, Suzuki Nanoka, Ogino Hajime	4. 巻 65
2. 論文標題 Phenotype-genotype relationships in <i>Xenopus sox9</i> crispants provide insights into campomelic dysplasia and vertebrate jaw evolution	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 481 ~ 497
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12884	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 -

〔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 林 利憲, 鈴木 誠, 井川 武, 田澤 一朗, 中島 圭介, 古野 伸明, 岡本 和子, 鈴木菜花, 越智 陽城, 小俣 和輝, 小川 斐女, 加藤 尚志, 鈴木 賢一, 荻野 肇
2. 発表標題 両生リソースが切り開くクロスプラットフォーム研究
3. 学会等名 第94回 日本動物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nusrat Hossain, 井川 武, 鈴木 誠, 田澤 一朗, 中尾 勇太, 林 利憲, 鈴木 菜花, 荻野 肇
2. 発表標題 ツメガエル <i>sox9</i> ゲノム編集個体の表現型と遺伝子型の関係性がカンポメリック 異形成症と脊椎動物の顎の進化を紐解く
3. 学会等名 第94回 日本動物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田 真菜, 川崎 詩織, 坂口 裕介, 鈴木 菜花, 鈴木 誠, 荻野 肇
2. 発表標題 ツメガエルにおけるTet-Onシステムの改良と新たなベクターの構築
3. 学会等名 第94回 日本動物学会大会
4. 発表年 2023年

〔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
荻野 肇	(Ogino Hajime)
鈴木 誠	(Suzuki Makoto)
井川 武	(Igawa Takeshi)