

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660256

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9システムを利用したほ乳動物の産み分けに関する研究

研究課題名(英文) Study on birth separation of mammals using CRISPR / Cas 9 system

研究代表者

南 直治郎 (Minami, Naojiro)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：30212236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近年開発されたゲノム編集技術であるCrispr/Cas9システムを用いて、受精を阻害できる遺伝子を性染色体にノックインし、この遺伝子をもつ精子の受精を阻害することで雌雄の産み分けを可能にする技術の開発を目的とした。今回は、目的の遺伝子をX染色体にノックインし、X染色体を持つ精子が受精できない、つまり雄のみを産む個体の作出を計画した。その結果、3系統の雄において遺伝子が挿入されていたが、雄のみを産む個体は得られなかった。他の雄系統においても交配実験を継続中であり、雌系統の組換えマスにおいては野生型雄との交配により雄の組換えマウスの系統確立を行っている。

研究成果の概要(英文)：In this study, using the Crispr / Cas 9 system, which is a genome editing technique developed in recent years, we knock-in genes that inhibit fertilization on sex chromosomes and inhibit fertilization of sperm having this gene, and aimed to develop technologies that enable birth separation. For this time, we planned the creation of male individuals having the desired gene in the X chromosome and not being able to fertilize sperm with X chromosome, that is, producing only male. As a result, genes were inserted in 3 lineage males, but male individuals bearing only males could not be obtained. Mating experiments are continuing also in other male lines, and in the recombinant female lines, a lineage of male recombinant mice is going to be established by crossing with wild type males.

研究分野：生殖生物学

キーワード：産み分け CRISPR/Cas9

### 1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の精子形成過程では、減数分裂時に隣接する細胞が細胞間架橋と呼ばれる構造によって数珠繋ぎの状態になり、物質の通過が可能になっている。これは X および Y 染色体にコードされた遺伝子の種類や数が異なっており、X あるいは Y 染色体を持つ精子がその形成過程でお互いの遺伝子産物を利用し合うことが理由であると考えられている。しかしながら、自然界ではマウスにおいて t-ハプロタイプの伝達比のゆがみ (t-Haplotype Transmission Ratio Distortion) という現象が知られており、17 番染色体に t-ハプロタイプと呼ばれる大規模な変異を持つマウスの雄から生まれる産仔には非常に高い比率でこの変異が伝えられる (最大で 99%) ことが報告されている (Schimenti ら、2000)。この原因は、t-ハプロタイプをもつ精子が優位に受精することによるものであることが分かっており、この変異領域に存在する Ter という遺伝子の 5' および 3' 非翻訳領域によって、mRNA が細胞間架橋を通過できない機構が関与していることが示された (Veron ら、2009)。

申請者は上記の情報を利用して、半数体発現を示すプロタミン 1 プロモーターの下流に受精を阻害し、かつ細胞間架橋を通過しないと考えられる遺伝子 (ここでは遺伝子 A とする。) を持つ遺伝子組換えマウスを複数系統作出した。このうち遺伝子 A を発現している 1 系統の雄マウスから生まれた 24 匹の産仔の全てが組換え遺伝子を持っていなかった。このことは、組換え遺伝子 A を持つ精子が受精できなかったことを示しており、この遺伝子 A を X あるいは Y 染色体の発現領域に組込むことによって、

雌雄の産み分けを可能にする雄個体を作成できると考えた。

### 2. 研究の目的

ほ乳類においては生まれてくる子の性を決定するのは精子が持つ性染色体であり、性染色体が X であれば雌、Y であれば雄が生まれる。申請者は、ある特定の遺伝子を精子形成の特定の時期に強制発現することで、その遺伝子を持つ精子が受精できないという技術を開発した。そこで本研究では、申請者が構築した遺伝子を、近年開発されたゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを用いて X あるいは Y 染色体の特定の部位に組み込み、組み換え遺伝子を持つ精子の受精を阻害し、組換え遺伝子を持たない精子が受精することで、雌雄の産み分けを可能とする技術の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 とは、DNA 二本鎖を切断してゲノム配列に任意の場所を削除、置換あるいは目的の DNA 配列を挿入することができる新しい遺伝子改変技術である。まず

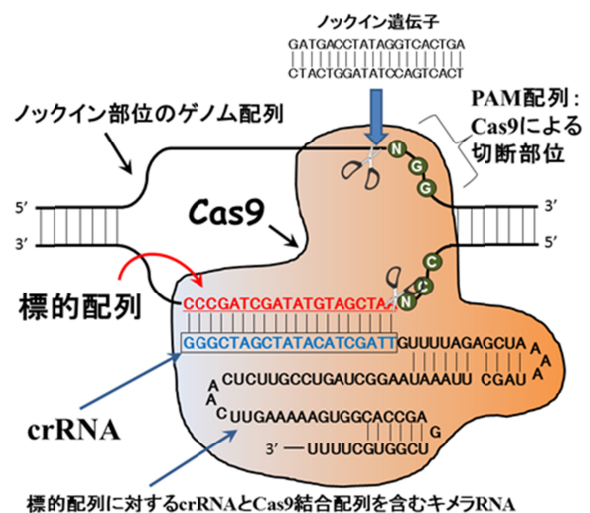


図1. CRISPR/Cas9システムによる標的配列の切断

DNA 切断酵素である Cas9 が PAM (Protospacer Adjacent Motif) 配列 (NGG) の 3 塩基を認識し、その上流で二本鎖 DNA を平滑末端になるように切断する。その後、切断された二本鎖 DNA が修復する時に非同相末端結合が起こることで、偶発的に塩基の挿入や欠失が誘導されることを利用して、目的の部位に変異を導入するシステムである (図 1)。本研究では、X 染色体のある部分を切断肢、目的の遺伝子を挿入することで、X 染色体特異的に目的の遺伝子が発現するような個体の作製を行った。特定の部位を切断するために、切断したいゲノム DNA と相補的な 20 塩基の RNA を設計した。また、プロタミン 1 プロモーター下流で遺伝子 A を発現するように構築した目的のプラスミドを切断する部位についても同様の設計を行った。これらの 2 本の RNA には Cas9 認識配列を持つ 69 塩基の tracrRNA (AAACAGCAUAGCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU) が相補的に結合できる配列 (GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG) を付加し、全長 42 塩基の crRNA (crispr RNA) として合成した。Cas9 によって切断される

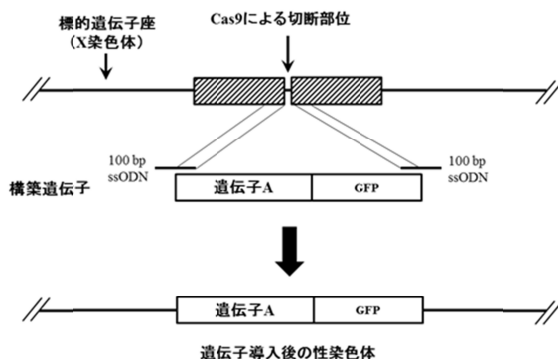


図2. 相同組換えを利用したノックイン

性染色体の上流 50bp とプラスミド状の導入遺伝子の上流 50bp、また CAS9 による切断後の導入遺伝子の下流 50bp と切断される性染色体の下流 50bp をそれぞれ接続した計 100 bp のオリゴ DNA (ssODN) を 2 本作製した (図 2)。以上のように作製した導入遺伝子 A、crRNA、tracrRNA、Cas9 mRNA、ssODN を同時にマウス受精卵の細胞質に顕微注射し、遺伝子組換えマウスを作出した。遺伝子組換えマウスの雄については、交配実験を行い産子の性別を確認し、雌については野生型マウスと交配させ雄の遺伝子組換えマウスの作出を行った。

#### 4. 研究成果

ゲノム編集を行った受精卵を移植した結果、27 匹 (♂13 匹、♀14 匹) の産子が得られた。これらの産子について、遺伝子解析を行った結果 3 系統の雄においてノックインができていと考えられる系統が得られ、交配実験を行ったが、雄のみを産む雄個体は得られなかった。しかしながら、交配を数回繰り返していると、ある交配時に雄のみの産仔が生まれたこともあり (産子 9 匹全てが雄であった。) 精子形成の過程で、受精を阻害する遺伝子産物の細胞間移動が抑制される場合もあるのではないかと考えられた。これについては、どのような機構が働いているかは不明であるため、他の系統も含めて複数回の交配実験を行い、産子の性比を確認する必要がある。また、雌系統の組換えマスにおいては野生型の雄との交配により雄の組換えマウスの系統確立を行っており、これらの系統においても複数回の交配実験を行い、性比の確認を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

南 直治郎 (MINAMI, NAOJIRO)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号: 30212236

(2)研究分担者

金子 武人 (KANEKO, TAKEHITO)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号: 30332878

(3)連携研究者

(4)研究協力者

( )