

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：14202

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05763

研究課題名(和文) ファウンダー(F0)世代からの解析を可能にする受精卵の遺伝子改変技術基盤の構築

研究課題名(英文) Establishment of a technology platform for genetic modification of fertilized eggs that enables analysis from the F0 generation

研究代表者

築山 智之(Tsukiyama, Tomoyuki)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・特任准教授

研究者番号：60612132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 29,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、トランスジェニック動物におけモザイク性の解消という目標の達成のために、トランスポゾンベクター法の改良を行った。独自に構築したpiggyBac(PB)トランスポゾンによるトランスジェニック動物の作出法をカニクイザルに適用し、全身で複数の蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックカニクイザルの作出に成功した。また、このサルについての詳細な表現型解析を行い、各組織におけるトランスジーン発現状態を明らかにしたとともに、トランスジーンゲノムへの挿入位置の同定も行った。さらに、発現時期を制御可能な改変PBaseベクターを用い、非モザイク動物を高率で作出できる条件を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実験動物の遺伝子改変技術は、遺伝子機能の解明、有用動物の作出、ヒト疾患の病態解明など、生物学、医学の発展に多大な貢献をしてきた一方、小動物モデルでヒトの現象を再現するには限界もある。ヒトにおける遺伝子改変は倫理的問題について議論が尽くされておらず、ヒト胚を用いることは難しい。そこで、非ヒト霊長類胚を用いた遺伝子改変技術の確立は今後より重要度が増すと考えられる。なお、本研究で開発したトランスポゾン転移酵素の活性制御技術は、カニクイザルへの応用のみならず、ブタやウシなどの他の大動物モデルへの応用も期待でき、生殖サイクルの長い動物種でも効率的にF0解析を行うための基盤技術となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we improved the transposon vector method to achieve the goal of eliminating mosaicism in transgenic animals. We applied our originally developed piggyBac(PB) transposon-based transgenic animal generation method to cynomolgus monkeys, and succeeded in generating transgenic monkeys that express multiple fluorescent proteins throughout the body. Detailed phenotypic analysis of the monkeys revealed the expression status of the transgene in each tissue, and the position of the transgene insertion into the genome. Furthermore, using a modified PBase vector with controllable expression timing, we found the conditions under which non-mosaic animals can be produced at a high rate.

研究分野：発生工学

キーワード：遺伝子改変 カニクイザル

1. 研究開始当初の背景

実験動物の遺伝子改変技術は、遺伝子機能の解明、有用動物の作出、ヒト疾患の病態解明など、生物学、医学の発展に多大な貢献をしてきた。本研究領域は、現状ブラックボックスであるヒトの着床後発生の解明のための基盤構築を目指しているが、ヒトにおける遺伝子改変は倫理的問題について議論が尽くされておらず、ヒト胚を用いることは難しい。よって、この目的達成のためには非ヒト霊長類胚を用いた効率的な遺伝子改変技術の確立が必要不可欠である。

我々はこれまでに、レンチウイルスベクター法、CRISPR/Cas9法をカニクイザルにおける遺伝子改変に応用し、複数の遺伝子改変サルを作製してきたが、それに伴い、いくつかの欠点が露呈してきた。

特に、レンチウイルス法では、インサート長が長いと遺伝子導入効率が顕著に落ちること、受精卵に適用する場合、1細胞期中に遺伝子導入が終了した場合にのみ、全ての細胞への均一な遺伝子導入が可能であるが、実際には難しく、遺伝子改変胚の全例において胚の一部のみに遺伝子導入が起こるモザイク性が生じることが欠点として挙げられた。元々のレンチウイルスではLTRに挟まれた部分の長さは約8.5 kbであり、インサートのサイズが大きくなるに従い、ウイルスベクターの力価が下がってしまうこと、逆転写によりDNAを合成し宿主細胞のゲノムへの挿入を行うため、ゲノム挿入までに一定の時間を要することから、これらは、原理的に克服が難しいと考えられた。

F1(次世代)以降に解析を行うことでモザイク性の問題は解決できる。しかし、本研究領域提案の一つの柱である試験管内胚発生モデルによるEx vivo解析を行う場合、モザイク性は致命的な問題となる。また、In vivo遺伝子改変でF1以降を用いる場合でも、マウスの場合、多数のラインを得て選抜すれば良いのに対し、サルなどの大動物では、時間・費用・労力の関係上極めて難しく、ファウンダー(F0)世代で解析できるようにすることが望ましい。F0で解析を行う場合、作出された遺伝子改変動物にモザイク性が見られると、表現型の表出が妨げられたり、表現型の解析に支障をきたす可能性があり、モザイク性の回避はカニクイザルでの遺伝子改変において非常に重要な課題であった。

2. 研究の目的

単純なトランスジェニックカニクイザルやノックアウトサルが作出された今、より高度なベクター設計を必要とする遺伝子改変技術の開発が次の焦点である。例えば、人為的な発現制御が可能な薬剤制御性promoterを用いた遺伝子発現系や、複数の遺伝子の同時発現、ノックイン技術を利用した複数遺伝子の同時改変などでは、現行法では効率が悪く、新規の手法の開発が望まれている。また、これらの複雑な多重遺伝子改変技術は、試験管内胚発生モデルとの親和性が高く、それらを融合させることで、増殖因子や小分子化合物の添加実験による詳細な機能解析が可能となる。

本研究では、従来の欠点を克服した次世代型の霊長類遺伝子改変技術の基盤を構築することで、領域で構築する試験管内胚発生モデルにおける機能実験を可能にすることを長期的な目的とした。そのため、まず、トランスジェニック動物におけるモザイク性の解消を短期目標として掲げ、それを達成するために、トランスポゾン転移酵素の改変による発現時期の特異化を計画した。

本技術開発は、他の研究者が本技術を容易に応用できることも大きなメリットであり、様々な活用が期待できる。よって、本提案はカニクイザルへの応用のみならず、ブタやウシなどの他の大動物モデルへの応用も期待でき、生殖サイクルの長い動物種でも効率的にF0解析を行うための基盤技術となることが期待される。

3. 研究の方法

研究領域が掲げる霊長類発生学という新たな研究分野の創造のためには、ヒト胚では不可能な遺伝子改変を、非ヒト霊長類において遺伝子機能解明に応用することが必要不可欠であると考えられる。

本研究班では、他班へのカニクイザル胚の供給を担当するとともに、まず、トランスジェニック動物におけるモザイク性の解消という短期目標の達成のために、piggyBac(PB)トランスポゾンの転移酵素であるPBaseの改変を行い、その発現時期を制御可能にした。

トランスポゾンベクターは非ウイルス性であり、初心者でも容易に扱うことができる。また、挿入できる遺伝子のサイズに制限がないと言われており、過去には BAC の導入も報告されている。しかし、受精卵に应用した場合、2細胞期以降にも PBase の活性が残っていると、挿入遺伝子のゲノムからの切り出しならびに転移が起こり、割球によって遺伝子型が異なるモザイクとなってしまう。そこで、本研究では、PBase の活性を1細胞期のみ限定させるために、不安定化ドメインならびに薬剤誘導性タンパク質を PBase と融合させ、その活性を人為的に制御できるようにした (図1)。

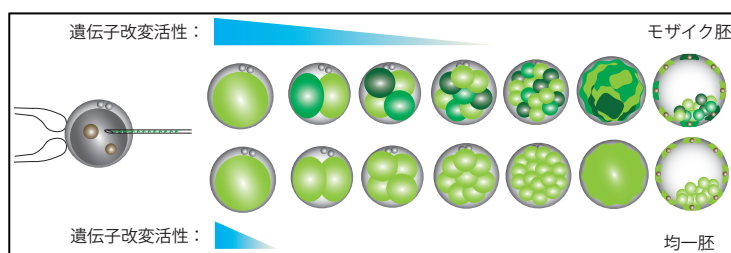


図1. 2細胞期以降への PBase 活性の残存によるモザイク化と PBase の活性制御による均一胚の作製

一方、PB トランスポゾン法によりトランスジェニックサルを作成した報告例はなかったため、まずは独自に開発した PB トランスポゾン法によりトランスジェニックサルを作成できるか検証した。

4. 研究成果

トランスジェニック動物におけるモザイク性の解消という短期目標の達成のために、トランスポゾンベクター法の改良を行った。PB トランスポゾンの転移酵素である PBase の改変を行い、その発現時期を制御可能なベクターを構築し、各種改変 PBase の活性および Background レベルを評価した。さらに、PBase の残存を視覚的に評価するために、蛍光タンパク質と改変 PBase との融合タンパク質を搭載したベクターを作製し、受精卵へのインジェクションを行い、条件の最適化を行い、1細胞期に PBase 活性が限局するような条件を同定した。

並行して、独自に開発した PB トランスポゾン法によりトランスジェニックサルを作成できるか検証し、全身で複数の蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックカニクイザルの作出に世界で初めて成功した。

今後の研究に活かすために、このサルについての詳細な表現型解析を行い、各組織におけるトランスジェニックの発現状態を明らかにしたとともに、トランスジェニックのゲノムへの挿入位置の同定も行った。

さらに、発現時期を制御可能な改変 PBase ベクターおよび、PBase の残存を視覚的に評価するための、蛍光タンパク質と改変 PBase との融合タンパク質を搭載したベクターを用い、各種改変 PBase の活性と受精卵におけるその活性動態を評価、条件の最適化を進め、非モザイク動物を高率で作出できる条件を見出した (図2)。

これらの成果は、いずれも論文として報告するために投稿準備中である。

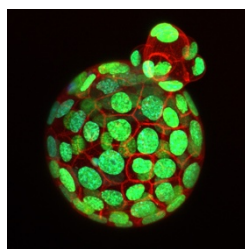


図2. 改変型 PB により作製した 100%レポーター陽性マウス胚

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Gyobu Motani Sayuri, Yabuta Yukihiko, Mizuta Ken, Katou Yoshitaka, Okamoto Ikuhiro, Kawasaki Masanori, Kitamura Ayaka, Tsukiyama Tomoyuki, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Tsujimura Taro, Yamamoto Takuya, Nakamura Tomonori, Saitou Mitinori	4. 巻 -
2. 論文標題 Induction of fetal meiotic oocytes from embryonic stem cells in cynomolgus monkeys	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2022112962	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 Watanabe Chisato, Shibuya Hiroto, Ichiyama Yusuke, Okamura Eiichi, Tsukiyama-Fujii Setsuko, Tsukiyama Tomoyuki, Matsumoto Shoma, Matsushita Jun, Azami Takuya, Kubota Yoshiaki, Ohji Masahito, Sugiyama Fumihiko, Takahashi Satoru, Mizuno Seiya, Tamura Masaru, Mizutani Ken-ichi, Ema Masatsugu	4. 巻 12
2. 論文標題 Essential Roles of Exocyst Complex Component 3-like 2 on Cardiovascular Development in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 1730 ~ 1730
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/life12111730	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 Hikami Ryota, Morimura Toshifumi, Ayaki Takashi, Tsukiyama Tomoyuki, Morimura Naoko, Kusui Makiko, Wada Hideki, Minamiyama Sumio, Shodai Akemi, Asada-Utsugi Megumi, Muramatsu Shin-ichi, Ueki Takatoshi, Takahashi Ryosuke, Urushitani Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Conformational change of RNA-helicase DHX30 by ALS/FTD-linked FUS induces mitochondrial dysfunction and cytosolic aggregates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-20405-2	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 Mizuta Ken, Katou Yoshitaka, Nakakita Baku, Kishine Aoi, Nosaka Yoshiaki, Saito Saki, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Kawamoto Ikuo, Nakaya Masataka, Tsukiyama Tomoyuki, Nagano Masahiro, Kojima Yoji, Nakamura Tomonori, Yabuta Yukihiro, Horie Akihito, Mandai Masaki, Ohta Hiroshi, Saitou Mitinori	4. 巻 41
2. 論文標題 Ex vivo reconstitution of fetal oocyte development in humans and cynomolgus monkeys	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022110815	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 Nakamura Tomonori, Fujiwara Kohei, Saitou Mitinori, Tsukiyama Tomoyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Non-human primates as a model for human development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1093 ~ 1103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.03.021	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 Jayakumar Vasanthan, Nishimura Osamu, Kadota Mitsutaka, Hirose Naoki, Sano Hiromi, Murakawa Yasuhiro, Yamamoto Yumiko, Nakaya Masataka, Tsukiyama Tomoyuki, Seita Yasunari, Nakamura Shinichiro, Kawai Jun, Sasaki Erika, Ema Masatsugu, Kuraku Shigehiro, Kawaji Hideya, Sakakibara Yasubumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Chromosomal-scale de novo genome assemblies of Cynomolgus Macaque and Common Marmoset	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Data	6. 最初と最後の頁 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41597-021-00935-6	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 Kojima Yoji, Yamashiro Chika, Murase Yusuke, Yabuta Yukihiro, Okamoto Ikuhiro, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Nakaya Masataka, Tsukiyama Tomoyuki, Nakamura Tomonori, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 4
2. 論文標題 GATA transcription factors, SOX17 and TFAP2C, drive the human germ-cell specification program	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202000974	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 Seita Yasunari, Morimura Toshifumi, Watanabe Naoki, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Nakamura Shinichiro, Suzuki Toshiharu, Yanagisawa Daijiro, Tsukiyama Tomoyuki, Nakaya Masataka, Okamura Eiichi, Muto Masanaga, Ema Masatsugu, Nishimura Masaki, Tooyama Ikuo	4. 巻 75
2. 論文標題 Generation of Transgenic Cynomolgus Monkeys Overexpressing the Gene for Amyloid- Precursor Protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 45 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-191081	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 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中家 雅隆, 築山 智之
2. 発表標題 piggyBacトランスポゾンシステムを利用したトランスジェニックカニクイザルの作出
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsukiyama T.
2. 発表標題 Generation of transgenic cynomolgus monkeys using piggyBac transposition.
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsukiyama T.
2. 発表標題 Disease modeling in cynomolgus monkeys using CRISPR/Cas9.
3. 学会等名 日本発生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2020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
---------	---------