

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15114

研究課題名(和文)ゲノム改変による冬眠レポーターハムスターの作出

研究課題名(英文)An attempt to generate transgenic hamsters for hibernation research

研究代表者

山口 良文(Yamaguchi, Yoshifumi)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授

研究者番号：10447443

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、未だその分子機構が不明な哺乳類の冬眠の謎の解明のため、近年進展著しいゲノム改変技術を冬眠動物シリアンハムスターに適用し冬眠研究に有用なシリアンハムスターを作出することを目指した。シリアンハムスターの受精卵が光に脆弱である点を克服するため、近年マウスにおいて開発された、輸卵管内での受精卵に対し遺伝子導入を行うGONAD法の適用を試みた。その結果、受精卵への核酸導入自体には成功した。しかし、遺伝子改変個体は得られなかった。その要因として、マウスの条件がシリアンハムスターには適さない点や飼育環境が挙げられる。冬眠研究に有用な遺伝子改変ハムスター作成のため、今後これらの点を改善したい。

研究成果の概要(英文):To elucidate the mysteries of hibernation of mammals whose molecular mechanism is still unknown, we aimed to produce transgenic Syrian hamsters useful for hibernation research by applying recently developed genome editing technology to a mammalian hibernator, Syrian hamsters. Because it is known that oocyte of Syrian hamsters is vulnerable to light, we attempted to apply the GONAD method, a recently developed method which introduces Cas9 complexes into oviducts by electroporation. We succeeded in introducing the nucleic acid itself into the fertilized egg, but failed to obtain genetically modified animals. The reasons for this is unclear. GONAD conditions for mouse or our breeding environments in the same room with mice might not be suitable for Syrian hamsters. We will improve these points in future.

研究分野：冬眠

キーワード：冬眠

1. 研究開始当初の背景

冬眠は、全身性の代謝抑制により飢餓・低温・乾燥といった極限状態下での長期生存を可能とするメカニズムである。恒温動物である哺乳類の中にも、10°C以下まで体温を下げ冬眠する哺乳類(以後、冬眠動物と呼ぶ)がいる。通常の哺乳類はそのような低体温下では臓器機能を保持できず死に至ることを考えると、冬眠動物の備える冬眠耐性能は驚異的である。興味深いことに、こうした冬眠耐性は夏期の冬眠動物では観察されず、前冬眠期から冬眠期にかけて誘導されることが報告されている。しかし、冬眠耐性の分子機構およびその誘導機構は、未だ殆ど不明である。リスやクマなど義務的冬眠動物とも呼ばれる冬眠動物は、野生由来のため生育環境や遺伝的背景のコントロールが困難であり、かつ年周リズム依存的に冬眠を行なうため、研究自体が困難であることがその一因としてあげられる。一方、これらリスやクマとは異なり、人為的刺激(長期間の短日・寒冷曝露)により冬眠誘導が1年を通じて可能である、冬眠動物シリアンハムスター(*Mesocricetus auratus*)は、冬眠の分子機構解明のための優れたモデル生物となりうる。実際、シリアンハムスターは動物飼育業者のクローズドコロニーからの供給が可能であり、ゲノム情報もドラフトではあるが明らかにされつつあり、また何よりも、遺伝子改変個体の作出が過去になされている点があげられる(PLoS One, 2014; Cell Research 2014)。

我々は、これらシリアンハムスターの利点に着目し、冬眠時の遺伝子発現変動の記載を行ってきた。これまでの解析から、長期間の寒冷・短日条件下での飼育により冬眠する状態になったシリアンハムスターで、有意に発現する遺伝子を複数同定していた。そこで、これらの遺伝子の発現をGFPやルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子を用いてモニターすることで、冬眠耐性を有する個体とそうでない個体とを、生きたまま非侵襲的に見分けることが可能となると考えられた。

2. 研究の目的

哺乳類の冬眠は、低温・乾燥・飢餓等の極限状態を全身性の代謝抑制と低体温により乗り切る驚異的な現象である。ヒトをはじめ多くの哺乳類は冬眠できないが、クマやリスなどの哺乳類は冬眠を行う冬眠動物である。冬眠動物は虚血耐性・肥満耐性・筋廃用萎縮耐性等の性質を備えており、冬眠の分子機構解明は、科学的興味を満たすだけでなく応用可能性も高く、21世紀の生物学に残されたフロンティアである。しかし、その分子機構は未だ殆ど不明である。その一因として、遺伝子操作による実験的検証が容易な冬眠動物が存在しないことが挙げられる。そこで本研究

では、冬眠動物シリアンハムスターにゲノム改変技術を適用し、GFPやルシフェラーゼ遺伝子等、冬眠研究に有用なレポーターを発現するシリアンハムスターを作出することを目指す。現在までに冬眠に関わる遺伝子機能を遺伝学的に解析した報告は存在しない。本研究では、新たに冬眠レポーターハムスターを作出して冬眠耐性の分子機構に迫ることにより、冬眠研究に新しい展開をもたらし、冬眠医学・冬眠創薬分野の創生の足がかりとすることを目指す。

3. 研究の方法

シリアンハムスターの受精卵は光に脆弱であり発生工学的手法の適用が困難なことが知られており、この点が遺伝子解析時代におけるシリアンハムスターの実験動物としての普及を阻んできた。本研究ではそこで、顕微鏡下での受精卵インジェクションによらず遺伝子改変をシリアンハムスターにおいて簡便に行う手法として、エレクトロポレーション法の適用を試みた。

まず、摘出したシリアンハムスターの受精卵に対して、マウスで成功が報告されているエレクトロポレーション法とゲノム編集技術とを組み合わせた手法(Hashimoto and Takemoto, Sci Rep. 2015)の適用を検討した。開発者の竹本博士に手技を伝授いただき、マウスでの手技が上手く行くことは確認した。しかし、実際に研究をはじめてみると、シリアンハムスター特有のいくつかの難点の存在が明らかになった。既に報告されていた受精卵が光に脆弱である点以外にも、マウス等と異なり、性周期判定にスメアチェックが必要とされる点、このチェックが動物にストレスを与えてしまう点、交配用の雌雄の維持にマウスよりはるかにスペースを要する点、等である。胚操作を迅速に行っていくには、限られたスペースで効率よく受精卵を得る必要がある。そこでまず、安定した受精卵の供給を目指して、簡便な性周期判定法の確立を試みた。スメアチェック、膣のインピーダンスチェッカーに加え、輪回し行動のモニタリングによる性周期判定を検討した。しかし、いずれの方法においても、シリアンハムスターの性周期は安定せず結果は芳しいものではなかった。その原因は明らかではないが、飼育室にシリアンハムスター以外の実験動物(マウス、ラット)が同居していること、複数の研究室の人物が出入りする飼育室であり人間の出入りが一定の時間に行われないこと、また温度制御は可能だが湿度の制御が困難であり季節の影響をかなり受けること、等々があげられた。これらの問題により、受精卵の継続的安定供給が我々の限られた飼育スペースにおいては困難であることが判明した。

そこで次に、大量の受精卵を要さない遺伝子導入方法を検討する方針へと舵を切った。そのために、輸卵管内へ Cas9 および gRNA を導入しエレクトロポレーションを行うことで、受精卵に直接核酸導入を行う GONAD 法を採用した。GONAD 法は、受精卵採取用の大量の雌個体および交配が不要となる画期的な手法であり、近年マウスにおいて報告された (Takahashi, et al., Sci Rep. 2015)。まずこの手技を開発者の東海大学の太塚博士、ならびにラットで GONAD に成功している重井医学研究所の松山博士から伝授して頂き、当研究室でもマウスにおいてゲノム編集が成功することを確認した。そのうえで、シリアンハムスター個体での適用を試みた。破壊する遺伝子としてはまず、毛色の変化が観察される遺伝子を選択して行った。

4. 研究成果

まず、シリアンハムスターにおいても GONAD 法により受精卵へと遺伝子導入ができることを、蛍光デキストランの導入実験により確認した。しかし残念ながら、研究期間の間に行えた 10 個体を越えるシリアンハムスター個体への GONAD 法による遺伝子導入では、目的の遺伝子変異個体を得ることはできなかった。これらの結果は、シリアンハムスター輸卵管内の受精卵への遺伝子導入後のイベントに、現在の手法では何らかの欠陥がある可能性が高い。一方で、そもそも我々の飼育室では、GONAD 法の処置をしない個体でも食殺率がマウス等と比較し極めて高かった。すなわち、シリアンハムスターの繁殖に適さない条件であった可能性がある。その一因として、マウスと同じ飼育室での飼育が挙げられる。シリアンハムスターは音に敏感であるとされる。今後は、シリアンハムスター専用の飼育室またはマウス個体と同居の場合は防音室等により隔離する、等の工夫が必要であろう。また、用いた gRNA の配列が適切でなかった可能性も想定される。

このように、本研究は研究期間内には当初期待していた成果を得ることはできなかった。しかし、本研究から見えてきた複数の課題を今後ひとつずつ改善しクリアしていくことにより、シリアンハムスターにおける遺伝子改変技術を確立させられると期待している。それにより、冬眠研究に新しい展開を持ち込んでいきたい。

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 1 件)

(1) Chayama, Y., Ando, L., Tamura, Y., Miura, M., Yamaguchi, Y. Decreases in body temperature and body mass constitute pre-hibernation remodelling in the Syrian golden hamster, a facultative mammalian hibernator. *Royal Society Open Science*, 3, 160002, 2016. DOI: 10.1098/rsos.160002.

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 山口良文、藤本貴之、佐藤友哉、安藤理沙、茶山由一、姉川大輔、泰井宙輝、重信秀治、三浦正幸 冬眠する哺乳類シリアンハムスターの冬眠期における骨格筋繊維タイプシフト 第 95 回日本生理学会年会 2018.3.28 (高松)
- (2) 姉川大輔、茶山由一、安藤理沙、泰井宙輝、重信秀治、三浦正幸、山口良文 哺乳類冬眠動物が有する低体温耐性機構の解明に向けて 環境生理プレコンGRESS 2018.3.27 (高松)
- (3) Yoshifumi Yamaguchi : Understanding seasonal body remodeling in mammalian hibernation KEY-FORUM: The 3rd International Symposium on Stem Cell Traits and Developmental Systems 2018.1.12 (Kumamoto)
- (4) 山口良文 哺乳類の冬眠を可能とする全身性代謝変化の分子基盤 ConBio 2017 日本分子生物学会合同年会 2017.12.9 (神戸)
- (5) 山口良文 冬眠可能な生体状態とは? シリアンハムスターを用いたアプローチ 第一回冬眠休眠研究会 2017.7.22 (湯河原)
- (6) 山口良文 哺乳類の代謝が全身性に変わる二つの局面~「胚発生」と「冬眠」がんと代謝研究会 2017.7.14 (札幌)
- (7) 山口良文 冬眠する哺乳類シリアンハムスターに学ぶ、冬眠可能な生体状態とは? 第 73 回岡山実験動物研究会例会 2017.7.7 (岡山)
- (8) 山口良文、藤本貴之、茶山由一、安藤理沙、姉川大輔、泰井宙輝、重信秀治、三浦正幸 シリアンハムスターが冬眠期に示す骨格筋変化の解明 第 94 回日本生理学会年会 2017.3.27 (浜松)
- (9) 藤本貴之、安藤理沙、茶山由一、姉川大輔、泰井宙輝、重信秀治、三浦正幸、山口良文 シリアンハムスターの骨

格筋における冬眠変動遺伝子の探索
日本分子生物学会年会 2016.11.30 (横浜)

- (10) Yoshifumi Yamaguchi, Yuichi Chayama, Lisa Ando, Daisuke Anegawa, Shuji Shigenobu, Takayuki Fujimoto, Hiroki Taii, Yutaka Tamura, Masayuki Miura. : Evidence for systemic remodeling prior to hibernation in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). 15th International Hibernation Symposium, 2016.8.1-5 (Las Vegas, USA)

[その他]

- (1) 山口良文 : 冬眠する哺乳類に学ぶ代謝制御～冬眠するための準備とは？
薬事日報 医療と薬剤 2016.10.03 2016年 秋号

ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/hibernation/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 良文 (YAMAGUCHI, Yoshifumi)
東京大学・大学院薬学系研究科・准教授
研究者番号 : 10447443