令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：13802
研究種目：奨励研究
研究期間：2020～2020
課題番号：20H00982
研究課題名 胚操作を必要としないゲノム編集技術GONAD法を用いた遺伝子改変モルモットの作製

研究代表者

青島 拓也 (AOSHIMA, TAKUYA)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・技術職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 440,000円

研究成果の概要：胚操作を必要としないゲノム編集技術「genome-editing via oviductal nucleic acids delivery (GONAD)法」を用いて、モルモットのチロシナーゼ遺伝子をノックアウトするゲノム編集実験を行った。本研究では、14匹の雌モルモットを用いてGONAD法を実施したが、チロシナーゼ遺伝子をノックアウトすることはできなかった。モルモットはマウスやラットと異なり、卵管が細長く脂肪に包まれており、受精卵の存在する卵管膨大部が不明瞭であったことから、過排卵処置等により卵管膨大部を明確にする必要があることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モルモットは、マウスやラットと異なり、ビタミンCを体内合成できない、完全性周期を示す等、ヒトと多くの共通点を有し、栄養学や免疫学等の分野で広く利用されている実験動物であるにも関わらず、これまでに遺伝子改変動物は作製されていない。遺伝子改変モルモットの作製は、栄養学や免疫学の研究を大きく発展させ、新たな治療薬や治療法の開発に繋がる可能性を秘めた社会的意義の大きい研究である。今回遺伝子改変モルモットの作製には至らなかったが、作製を成功させるために必要な新たな知見を得ることができた。

研究分野：実験動物学

キーワード：ゲノム編集 GONAD法 モルモット

1. 研究の目的

近年、CRISPR/Cas9 システムの開発により、ゲノム編集技術は飛躍的な発展を遂げた。中でも、genome-editing via oviductal nucleic acids delivery (GONAD) 法は、卵管内の受精卵に直接ゲノム編集を施す極めて画期的なゲノム編集技術である。GONAD 法は、胚操作を必要としないため、胚操作法や培養法が確立されていないモルモットに対しても有効ではないかと考えた。

モルモットは、ビタミンCを体内合成できない、完全性周期を示す等、ヒトと多くの共通点を有し、栄養学や免疫学等の分野で広く利用されている実験動物であるにも関わらず、これまでに遺伝子改変動物は作製されていない。モルモットにおける遺伝子改変動物の作製は、これらの研究を大幅に進歩させるだけでなく、ゲノム編集技術の発展にも大きく貢献するもので、その意義は極めて大きい。

そこで本研究では、胚操作を必要としないゲノム編集技術 GONAD 法を用いてモルモットのゲノム編集を行い、世界初となる遺伝子改変モルモットの作製を目指すこととした。

2. 研究成果

本研究では、GONAD 法を用いてモルモットのチロシナーゼ遺伝子 (Tyr) をノックアウト (KO) し、アルビノ個体を作製することとした。

日本エスエルシー株式会社より、10 週齢の雌性有色モルモット Hos:Weiser-Maples またはアルビノモルモット Slc:Hartley を購入し、交配適期に雄性 Hos:Weiser-Maples と交配をかけた。交配が成立した夕刻、雌動物を GONAD 法に供した。その後、雌は妊娠 20 日以降に解剖して、胎仔の眼の色素沈着を確認後、手の一部を採取するか、あるいは出産まで飼育し、出産後、産仔の眼の色素沈着を確認した後、耳介の一部を採取した。採取した手または耳介の一部から DNA を抽出後、シーケンス解析を行い、塩基配列を決定した。

実験の結果を表 1 に示す。

本研究では、Hos:Weiser-Maples 及び Slc:Hartley を含め 14 匹の雌を GONAD 法に供した。そのうち剖検した動物は 3 匹、出産した動物は 3 例、不妊は 6 例、途中死亡は 2 例であった。

剖検により得られた胎仔は 19 匹、出産により得られた産仔は 12 匹で、計 31 匹であり、全ての胎仔・産仔において眼球の色素沈着が認められた。またシーケンス解析の結果、チロシナーゼ遺伝子に欠損や変異の認められた胎仔・産仔はいなかった。

表 1: GONAD 法を用いたモルモットのチロシナーゼ遺伝子のノックアウト実験のまとめ

GONAD 法に供した雌	剖検	出産	不妊	途中死亡	胎仔・産仔	眼球の色素沈着が認められた胎仔・産仔	変異が認められた胎仔・産仔
14	3	3	6	2	31	31	0

本年度内の研究において、GONAD 法を用いてモルモットのチロシナーゼ遺伝子を KO し、遺伝子改変モルモットを作製することはできなかった。その原因及び今後の方針を以下にまとめる。

(1) 卵管膨大部が不明瞭

モルモットはマウスやラットと異なり、卵管が長細く脂肪に包まれており、また排卵数も少なく、受精卵の存在する卵管膨大部が不明瞭であった。そのため、GONAD 法を実施する際、CRISPR/Cas9 関連試薬を注入する部位を特定できなかった。

本研究の目的を達成させるためには、卵管膨大部を明確にし、受精卵の存在する場所を特定することが最優先課題だと考えられる。そのために、モルモットに過排卵処理を実施し、卵管膨大部がより大きく明瞭になると予想される動物で GONAD 法を実施する。

(2) エレクトロポレーションの電流値の条件

GONAD 法を実施した雌 14 例中 6 例が不妊であった。今回、マウスやラットでの電流値を参考に 200 ~ 250mA でエレクトロポレーションを実施したが、電流値が強すぎて、受精卵が破壊あるいは受精卵の成長が阻害された可能性が考えられる。

従って、今後、マウスやラットよりも電流値の低い 100 ~ 150 mA を目安に電流値の検討を行う。

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
----	--------