

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号： 1 1 4 0 1
研究種目： 奨励研究
研究期間： 2020 ~ 2020
課題番号： 2 0 H 0 0 9 8 3
研究課題名 CRISPR/Casを用いた低温培養法によるノックイン動物の作製

研究代表者

場崎 恵太 (Basaki, Keita)

秋田大学・医学系研究科・技術専門職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 360,000 円

研究成果の概要： ゲノム編集技術によりノックアウト動物を容易に作出できるようになった一方で、相同組み換え修復（HR）を介してドナーDNAをゲノムに導入するノックイン（KI）動物の作出効率は極端に低い。そこで、本研究ではコンストラクトを注入した胚について低温培養で発生遅延を誘起してHRが起こるS期後半からG2期までを延長することで、KI効率が向上するか調査した。gRNA、Cas9、ドナーDNAを顕微注入した前核期胚を低温で培養したところ、37℃で培養した胚に比べてドナーDNAの導入効率が3倍程度向上した。このことから、低温培養によって胚の発生遅延が生じてHRが起こる機会が促進されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPR/Casシステムでは、HRにより長鎖DNAをゲノム上に導入するノックイン動物の作出は難しい。本研究では、低温培養によりS/G2期を延長してHRに十分な時間を確保することで、効率的にドナーDNAを導入した。本法は、特別な試薬を必要とせず、操作も簡易であり、ゲノム編集技術の新たな手法として有用であると考えられる。

研究分野： 実験動物、生殖工学

キーワード： ゲノム編集 CRISPR/Cas9 ノックイン マウス

1. 研究の目的

CRISPR/Cas の開発により、ノックアウト動物を容易に作出できるようになった一方で、相同組み換え修復 (HR) によりドナー DNA をゲノム上に導入するノックイン (KI) 動物の作出は難しい。とくにドナーとして長鎖 DNA を用いた場合には低い導入効率が問題となる。そこで、コンストラクト注入後の胚について、HR が起こる S 期後半から G2 期を人為的に延長することができれば、ドナー DNA の導入機会が増えるのではないかと考えた。本研究では、発生遅延を誘起することが知られている低温で胚を培養することで、S 期後半から G2 期を延長して KI 効率の向上を試みた。

2. 研究成果

本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いてコンストラクトを注入した胚を低温で培養することによる切断効率への影響およびドナー DNA の KI 効率をそれぞれ調査した。

(1) 低温培養法による KO 効率の評価

低温培養下における CRISPR/Cas9 の切断効率をマウスの毛色表現型で評価した。Tyrosinase (Tyr) 遺伝子は顕性遺伝しメラニン合成に関与するため、C57BL/6J (B6) 系統で黒毛の表現型を示すが、KO ホモ接合体ではアルビノで白毛となる。Tyr 遺伝子を標的とした gRNA および Cas9 蛋白をエレクトロポレーション (EL) 法で B6 の前核期胚に導入した。その後、胚の培養温度を 37、34、32 でそれぞれ 18 時間以上培養して、発生した 2 細胞期胚をレシピエントに移植した。F0 マウスの毛色表現型を確認したところ、34 で低温培養した胚は、37 で培養した胚に比べて 2 細胞期への発生率が低かった一方で、CRISPR/Cas9 の切断効率に差異は認められなかった (表 1.)。また、32 で培養した場合ではほとんど発生しなかった。このことから、コンストラクト注入後の胚について、34 で培養した場合では胚の発生効率は低くなる傾向にあった一方で、CRISPR/Cas9 の切断効率には影響を与えないことが明らかとなった。

EL後の 培養温度	注入胚	2細胞期への 発生率	移植数	産仔数 (発生率)	アルビノ	KO効率
37℃	40	33 (83%)	31	12 (39%)	11	92%
34℃	80	51 (64%)	51	12 (24%)	12	100%
32℃	80	1 (1%)				

表1. 低温培養下におけるノックアウト効率

(2) 低温培養法による KI 効率の評価

一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN) を用いた場合

MCH (ICR) 系統は Tyr 遺伝子のコード領域上 308 番の塩基に単一変異を有するためアルビノである。ドナーに野生型配列を有する ssODN (33bp) を用いて F0 マウスの毛色表現型で KI 効率を評価した。EL 法にて gRNA および Cas9 蛋白、ドナー DNA を MCH の胚に導入して、培養温度 37、36、34 でそれぞれ 18 時間以上培養した。

ドナー DNA 導入後の低温培養した胚について、34 の培養では 2 細胞期胚に発生しなかった一方で、36 の培養は発生遅延を生じて 2 細胞期胚を獲得できた (表 2.)。さらに、発生した 2 細胞期胚をレシピエントに移植して得た F0 マウスの毛色を確認したところ、37 と 36 で培養した場合では KI 効率に有意な差は認められなかった。これらは、ssODN が高率な修復経路である一本鎖アニーリング (SSA) によって、標的遺伝子に挿入されるため、KI 効率に影響を与えなかったと考えられる。

EL後の 培養温度	注入胚	2細胞期への 発生数	移植数	産仔数 (発生率)	アグーチ	モザイク	KI効率
37°C	169	130 (77%)	130	37 (28%)	9	8	46%
36°C	412	298 (72%)	169	52 (30%)	14	11	48%
34°C	84	0 (0%)					

表2. ssODNを用いた低温培養下におけるノックイン効率

ドナープラスミドを用いた場合

ドナーDNAとして、ROSA26 遺伝子座を標的としたホモロジーアーム（約 1.5kbp）と H2B - EGFP（約 1.7kbp）を含むドナープラスミドを用いた。ROSA26 を標的とした gRNA と Cas9 蛋白、ドナーDNA を、B6 の前核期胚に顕微注入した。注入胚を 36 で 18 時間以上培養した後に 37 で桑実胚まで培養して蛍光顕微鏡で EGFP 発現を確認した。結果、36 で低温培養した胚は発生遅延を生じたが、その後 37 で培養することで桑実胚まで発生した（表 3.）。また 36 で培養した胚は 37 で培養した胚に比べて 3 倍以上の EGFP 発現を示した。

注入後の 培養温度	注入数	桑実胚への 発生数	EGFP発現 を示す胚数
37°C	112	70 (63%)	8 (11%)
36°C	239	139 (58%)	52 (37%)

表3. ドナープラスミドを用いた低温培養下におけるノックイン効率

本研究から、胚を低温培養することで、発生遅延を誘起して HR が生じる S 期後半から G2 期が十分に確保されて、効率的にドナーDNA のゲノム挿入が促進されたと考えられる。今後、EGFP 遺伝子が標的遺伝子上に正確にノックインされたか解析を進めていく。本法は、特別な試薬を必要とせず、簡易な操作で、いままで導入が困難であったサイズの大きいドナーDNA の導入効率を向上させることができることから、ゲノム編集技術の新たな手法として活用が期待される。

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