

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14618

研究課題名(和文) 有袋類における胚操作基盤技術開発

研究課題名(英文) Development of embryo manipulation techniques in marsupials

研究代表者

清成 寛 (Kiyonari, Hiroshi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：40721048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：有袋類であるハイロジネズミオポッサム(以下、オポッサム)は、従来のモデル動物にはみられないユニークな特徴を有する。本研究において、オポッサムの生体内における遺伝子機能解析を可能とする遺伝子改変オポッサムの作出を目的とした生殖工学技術開発を実施した。結果、ホルモン投与による発情の誘導、受精卵の採取、偽妊娠オポッサムの作製、受精卵移植など、遺伝子改変オポッサム作製に必要な、一連の生殖工学技術開発に成功すると共に、CRISPR/Cas9システムによるオポッサム受精卵へのマイクロインジェクションにより、Tyrosinase 遺伝子をノックアウトした遺伝子改変オポッサムの作出にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有袋類は有胎盤類と最も近縁でありながら、有胎盤類にはない独特な特徴を有する。有袋類の中で系統的に最も古いとされるハイロジネズミオポッサムは、有袋類の中で主要な実験動物の1つである。今回の成果は、世界初となる遺伝子改変有袋類の作出であり、機能的な胎盤をもたない生体内での発生メカニズムや未熟仔の出生後の器官形成のメカニズム、がんやゲノムインプリンティングに至るまで、様々な有袋類特有の特徴に対して生体内における遺伝子機能解析による解明を可能とするものであり、他の哺乳類との遺伝子レベルでの比較研究を大きく加速するものであると考える。

研究成果の概要(英文)：Among marsupials, the gray short-tailed opossums (hereinafter called the opossum) have very unique characteristics not shared by other mammals. In this study, we aimed to develop reproductive technologies and embryo manipulation for generating genetically engineered opossums. As a result, we established a series of reproductive technologies such as estrus induction by hormone administration, zygote collection, production of pseudopregnant females, and embryo transfer. In addition, we successfully demonstrated the generation of gene gene knock-out opossums at the Tyrosinase locus by microinjection of pronuclear stage zygotes using CRISPR/Cas9 genome editing.

研究分野：生殖工学、発生工学

キーワード：ゲノム編集 有袋類 オポッサム

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生物多様性のメカニズムを理解する上で、従来のモデル動物以外の多様な動物種との比較研究の重要性が高まっている。その中でも有袋類であるハイロジネズミオポッサム(以下、オポッサム)は、発生学的に未熟のまま出生し、器官形成を含む様々な発生イベントが母体外で起こるなど、従来のモデル哺乳動物には見られない形態形成機構や環境適応のメカニズムを有する。この特徴に着目し、様々な発生段階および器官形成過程における鍵となる遺伝子群の生体内における遺伝子機能を従来のモデル哺乳動物と比較することで、各発生イベントをコントロールするメカニズムの解明が期待できる。しかしながら、オポッサムにおいては個体レベルでの遺伝子機能解析に必須な一連の胚操作技術は未だ確立されていない。

## 2. 研究の目的

オポッサムは哺乳類の多様性メカニズムを理解する上で、非常に興味深い動物種の1つと言えるが、発生分野での利用は遺伝子発現解析のみに限定される。本研究課題では、このような他の哺乳類に類を見ない特徴を活かし、発生、器官形成に関わる様々な遺伝子の機能解析を可能にする為、排卵誘導、移植等を含む一連の生殖工学技術開発と共に、ゲノム編集を中心とした遺伝子改変オポッサムの開発を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 排卵、交尾誘導および採卵

排卵誘導については、雌雄のケージを入れ替えるスイッチングと呼ばれる方法が一般的に利用されているが、交配時期は雌雄同居後、4~7日と安定していない。従って、マウス同様に、ホルモン投与による排卵および交尾誘導を検討する。オポッサムはマウスのように膣栓を確認できない為、ビデオ観察による交配時期特定のシステムを導入する。

### (2) 偽妊娠オポッサムの作製

偽妊娠オポッサムについては、オポッサムと同じ交尾排卵動物であるスunksやウサギ、或いはワラビーの偽妊娠動物作製方法を参考にし、ホルモン注射による偽妊娠誘導を行う。もしホルモンによる誘導が安定しない場合は、精管結紮オポッサムを使用して、ビデオ観察による交配時期特定を行う事で偽妊娠オポッサムを作製する。

### (3) 移植技術の確立

遺伝子改変オポッサムの作製を想定し、1細胞期、或いは2細胞期の両時期について移植を実施する。これまでの予備的実験から、移植については、採取した受精卵と偽妊娠オポッサムの発生ステージを一致させることが極めて重要である可能性が示唆されている。受精卵採取および偽妊娠オポッサム共に、ホルモン等で安定して誘導出来ない場合は、それぞれの交配数を増やすことにより、交尾が同日に行われたものについて、採卵、移植を実施する。

### (4) 遺伝子改変オポッサムの作製

CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子破壊マウスを作製する。これは、ES 細胞が樹立されていない実験動物にとっては極めて有用な技術であり、既に様々な生物に対してその有効性が認められている。標的遺伝子座は Tyrosinase 遺伝子とする。この遺伝子座の両アリルが破壊された個体はアルビノとなる為、容易に遺伝子破壊を確認でき、その効率および評価に一般的によく用いられる。申請者らによるマウス受精卵を用いた結果では、90%以上の効率でアルビノ個体（両アリル破壊）が得られたが、片アリルのみの破壊も考えられる為、PCR およびシーケンスによる確認も行う。マイクロインジェクション法による受精卵へのダメージも懸念される為、エレクトロポレーション法によるゲノム編集も試みる。

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) 排卵、交尾誘導および採卵

通常、交尾までには雌雄同居から 1 週間ほどを要するが、ホルモンの投与により雌雄同居当日、或いは翌日に交尾を誘導できた。また、交尾した個体からは問題なく受精卵が得られたことから、ホルモン投与による排卵も誘導できたことがわかった。交尾確認は、ビデオ観察により行ったが、得られた受精卵のステージから、正確に交配日時を特定できていることがわかった。これらの結果から、ホルモン投与により同居から交尾までの時間を大幅に短縮でき、かつ、ある程度交尾時期の予測が可能となった。

##### ( 2 ) ( 3 ) 偽妊娠オポッサムの作製と移植

当初、採卵時同様、ホルモン投与のみで偽妊娠オポッサムの作製を試みたが偽妊娠状態に至らなかったため、精管結紮オポッサムとの交尾による作製に切り替えた。受精卵の移植時には、偽妊娠状態である事を子宮の状態(肥厚)を観察する事で確認した。受精卵を採取した雌と同じ交配日である偽妊娠オポッサムに受精卵を移植したところ、問題なく産仔を得る事に成功した。また、同日の偽妊娠オポッサムを準備できなかった際、受精卵を 1 晩培養し、受精卵のステージが 1 日進んだ状態で偽妊娠オポッサムに移植した結果、こちらも同様に産仔を得ることができた。

##### ( 4 ) 遺伝子改変オポッサムの作製

採取した 1 細胞期胚に対して、Tyrosinase 遺伝子座を標的とした CRISPR/Cas9 システムを用いたマイクロインジェクション方による遺伝子ノックアウトを試みた。マイクロインジェクションに用いた 1 細胞期胚は、前核が確認できたものには前核へ、できなかったものには細胞質へそれぞれインジェクションを行った。偽妊娠オポッサムへの移植後、得られた産仔の中に、アルビノやモザイク個体が確認できた。野生型の毛色をもつ個体も含めて PCR およびシーケンス解析を実施したところ、得られた産仔 33 匹中、15 匹が Tyrosinase 遺伝子座に何らかの変異をもつことがわかった。本課題により、世界初となる遺伝子改変有袋類の作製に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroshi Kiyonari, Mari Kaneko, Takaya Abe, Riko Yoshimi, Aki Shiraiishi, Ken-ichi Inoue, Yasuhide Furuta	4. 巻 -
2. 論文標題 Targeted Gene Disruption in a Marsupial, Monodelphis domestica, by CRISPR/Cas9 Genome Editing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	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） なし	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 清成 寛
2. 発表標題 実験動物としての有袋類オポッサム
3. 学会等名 実験動物技術者協会 関東支部 R E G 部会 第20回特別講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清成 寛
2. 発表標題 オポッサムを用いた胚操作基盤技術の開発
3. 学会等名 第53回 日本実験動物技術者協会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子 麻里, 白石 亜紀, 吉見 理子, 清成 寛
2. 発表標題 実験動物としてのハイロジネズミオポッサム
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Kiyonari
2. 発表標題 Transgenesis and Their Use in Animal Models for Human Reproduction
3. 学会等名 The international IVF initiative (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究協力者	阿部 高也  (Abe Takaya)	国立研究開発法人理化学研究所・生体モデル開発チーム・技師  (82401)	
研究協力者	金子 麻里  (Kaneko Mari)	国立研究開発法人理化学研究所・生体モデル開発チーム・テクニカルスタッフ  (82401)	

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