

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03142

研究課題名(和文)ポストゲノム編集時代のマウス発生工学技術基盤の構築

研究課題名(英文) Establishment of new gene modified mouse production system

研究代表者

水野 聖哉 (Mizuno, Seiya)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：10633141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：受精卵ゲノム編集により遺伝子改変マウスを作出することが容易となった。しかし、従来法に比べ、ゲノム編集で作出された遺伝子改変マウスが持つ変異は複雑である。加えて、受精卵ゲノム編集ではモザイク状態のマウスも出現する。更に、多くの場合、一度の作製で数十匹のファウンダーマウスが誕生する。これらのアレル数が不明かつ複雑な変異を有する多数のマウス中から目的の変異アレルを検出することが作製毎に必要であった。そこで、我々はlong readシーケンシング技術を活用し、簡便かつ正確に目的の変異アレルを検出するシステムを構築した。また、組織特異的遺伝子破壊実験に利用可能なCre遺伝子ノックインマウスを複数作出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子改変マウスは特定の遺伝子機能を生体で評価することが可能なバイオリソースである。近年のゲノム編集技術の発展は、遺伝子改変マウスを容易にし、これまでとは比較にならないほどの多くの遺伝子改変マウスシステムが作出されている。また、新規参入した研究者も増加した。これらは、in vivo研究の可能性を大幅に拡張する一方、意図しない変異をもつマウスを誤って使用してしまうケースの増加にもつながる。誤った遺伝子改変マウスを利用した実験はin vivo研究の質を著しく落とす。我々が開発した簡便かつ正確に目的の変異アレルを検出するシステムは、この問題点を解決することで、確かなin vivo研究に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：Genome editing with mouse zygotes has facilitated the creation of genetically engineered mice. However, compared to conventional gene targeting methods, the mutations in genetically engineered mice produced by genome editing are more complex. In addition, mouse zygote genome editing also result in mosaic mice. Furthermore, in many cases, dozens of founder mice are created per a project. It is necessary to detect the intended mutant allele in a large number of mice with unknown number of alleles and complex mutations. Therefore, we constructed a system to detect the intended mutant allele easily and accurately by utilizing long read sequencing technology.

We also generated several Cre knock-in mice that can be used for tissue-specific gene disruption experiments.

研究分野：実験動物学

キーワード：遺伝子改変マウス ゲノム編集 ロングリードシーケンシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集技術の発展による発生工学の革命的進化はマウス遺伝学研究にパラダイムシフトをもたらし、現在では多数の研究機関でゲノム編集マウス作製が実施されている。すなわち、数多くの研究者がゲノム編集マウスを実験対象として利用して各生命現象を詳細に解析する *in vivo* 研究が一般化してきている。しかし、本研究開始当時は、ゲノム編集マウスの簡便かつ正確な遺伝型解析の手法が確立されておらず、非常に面倒な遺伝型解析が必要であった。特に、標的ゲノム領域の二箇所を同時に切断し、2つの *LoxP* 配列を同時にノックインする *Flox* アレル変異の検出が最も難しい課題であった。

Flox マウスは、組織特異的な遺伝子破壊 (conditional knockout、以下 *ckO*) 実験のために使用される。この *Flox* マウスと組織特異的に *Cre* を発現するマウス (以下、*Cre* ドライバーマウス) とを交配することで、*ckO* マウスが作出される。正確な *Cre* 発現制御には長い発現調節配列が適しているため、数千塩基対の発現調節配列と *Cre* 遺伝子からなら外来遺伝子をもつ *Transgenic* マウスよりも組織特異的に発現する内在遺伝子座に *Cre* 遺伝子をノックインしたマウスがよいと考えられていたが、その整備は進んでいなかった。

2. 研究の目的

Flox アレルを含む意図したアレルを迅速かつ簡便に特定できる新たな遺伝型解析システムの確立を目指す。また正確な *Cre-LoxP* 組換えが誘導できる新規の *Cre* ノックインドライバーマウスを開発する。

3. 研究の方法

3 - 1. ゲノム編集変異の遺伝型解析法の確立

マウス受精卵ゲノム編集では、多様な変異を誘導できる。本研究においては特に従来法での遺伝型解析が面倒であった領域欠損変異、点変異、*Flox* 変異を解析対象とした。

まず、領域欠損変異検出に関して記載する。領域欠損変異とは、2つの *sgRNA* と *Cas9* を同時導入することで、それらの *sgRNA* に挟まれた領域を欠失させた変異である。ゲノム編集を誘導した場合、ある程度の頻度で数千塩基対以上の大きな欠失変異が生じることがある。また、欠失が生じないで逆位が起きることもある。そのため、領域欠損変異をゲノム編集で誘導した場合には、意図した領域欠損変異だけでなく、片側 (もしくは両側) での意図しない比較的大規模な欠失変異や逆位などが出現する可能性がある。そのため、標的サイトより数千塩基対上流および下流にフォワードプライマーおよびリバースプライマーを設定した PCR にて、なるべく全ての変異を増幅することを目指した。増幅した PCR 産物の配列をナノポアロングリードシーケンサーで決定した。正確性がより高いショートリードシーケンサーを使用しなかった理由は、二つの離れた場所に位置する変異の関係性が *cis* であるか *trans* であるかを原理的に区別できないためである。研究実施当時のナノポアロングリードシーケンサーの正確性は変異配列を決定するほど高くなかった。そこで、我々はナノポアロングリードシーケンサーのエラーを自動で補正するオンターゲットサイト解析ソフトウェア「Determine Allele mutations and Judge Intended genotype by Nanopore sequencer (DAJIN)」の開発に取り組んだ。更に、一度の解析にて複数のサンプル処理を可能とするために、上述の PCR にて個体を識別する *index* 配列を付与すること、そして DAJIN がその *index* 配列を自動で識別・分類する様なシステムの構築を目指した。

ゲノム編集での点変異誘導では、領域欠損変異の誘導時とは異なり、一箇所のみ切断ですむことが多いために、変異様式は領域欠損変異の誘導時と比べて複雑ではない。その一方、一箇所のみ切断によって、オンターゲットサイトに 2 箇所以上の小さな変異が誘導される可能性についてはあまり検討されていなかった。もし意図しない変異がタンパク質コーディング部位等に生じた場合には、その後の *in vivo* 実験で誤った結論が導出される可能性がある。そこで我々は、標的変異サイトの上下流数千塩基対を含む領域の配列をナノポアロングリードシーケンサーで決定することにした。その際に、上述の DAJIN システムを利用した。

Flox アレルは数百から数千塩基対離れた二箇所に *LoxP* をそれぞれノックインすることで作出される。ノックインする際には修復時のテンプレートとなるドナー DNA を CRISPR と共に受精卵に導入するが、このテンプレートを利用せずにゲノム DNA が修復された場合には上述の領域欠損変異が生じる。すなわち、領域欠損変異とそれを誘導する際に生じる可能性がある意図しない変異に加えて、片側の標的サイトのみ *LoxP* が導入されたアレルや *Flox* アレルが生じることになる。そこで、上述のナノポアロングリードシーケンサーと DAJIN システムでこれらの複雑なゲノム編集変異アレルを包括的に決定することを目指した。なお、DAJIN の開発等のバイオインフォマティクス研究は分担者の久野が実施し、それ以外の実験は研究代表者である水野の指揮のもとで協力者が実施した。

3 - 2. *Cre* ノックインドライバーマウスの開発

生殖細胞特異的に *Cre* を発現する *Cre* ノックインドライバーマウスを受精卵ゲノム編集で作製した。具体的には、雌性生殖細胞の出生後すぐから三日齢の間に発現を開始する *Gdf9* 遺伝子の終

止コドンの直前に P2A 配列で繋いだ Cre 遺伝子をノックインしたマウスを作成した。また、雌雄両方の生殖細胞で特異的に発現する Ddx4 遺伝子の終止コドンの直前に P2A 配列で繋いだ CreERT2 遺伝子をノックインしたマウスを作成した。これらの生殖細胞系 Cre ノックインドライバーマウス自身の表現型解析を行った。また、各 Cre ドライバーマウスを Cre レポーターマウスである GRR マウスと交配した。GRR マウスでは Cre 組換え前には EGFP 遺伝子が、Cre 組換え後には tDsRed 遺伝子が発現することから、Cre 組換えが生じた細胞を赤色蛍光で、組換えが生じていない細胞を緑色蛍光で可視化することができる。このシステムを利用して各 Cre ドライバーマウスにおける Cre 組換え能を評価した。これらの研究は主に研究代表者である水野の指揮のもとで協力者が実施した。また、分担者である藤山は同様の方法にて、Synapsin1-CreERT2 マウスを作成・解析した。

4. 研究成果

4 - 1. ゲノム編集変異の遺伝型解析法の確立

我々の DAJIN システムが、受精卵ゲノム編集での領域欠損変異誘導時に生成される変異アレルを正確かつ包括的に解析可能かを検討するために、3 つの遺伝子を標的とした領域欠損変異マウスをそれぞれ作成し、その遺伝型を解析した。一つ目の遺伝子である Prdm14 の遺伝型解析において、DAJIN は従来法と矛盾がない解析結果を出力することに成功した。また自動的に出力される BAM により欠損領域を正確に可視化することも確認できた。更に、意図した欠損アレルを有するマウスの表現型を解析した結果、過去の報告の通りに、雄性生殖細胞の完全な枯渇が観察された。二つ目の解析対象である Ddx4 遺伝子でも同様に従来法と矛盾のない解析結果を DAJIN は出力した。3 つめの解析対象である Stx2 遺伝子では逆位などの更に複雑な変異が生じていたが、DAJIN は全ての変異アレルを正確に出力した。加えて、切断部位の結合面に挿入していた一塩基まで正確に DAJIN が出力したことから、DAJIN は一塩基の分解能で変異配列を決定できることが明らかとなった。

次に、受精卵ゲノム編集での点変異誘導時に生成される変異アレルを DAJIN で検出した。対象遺伝子として Tyr を選択し、3 つの独立した点変異マウスを作成し、その遺伝型を解析した。その結果、3 つの全ての点変異を DAJIN は従来法と遜色ない感度で検出することができた。また、意図した点変異の上流に生じていたおよそ七百塩基対の欠失も検出することができた。このような複雑な変異アレルは従来法やショートリードの次世代シーケンズ解析では検出されなかったことから、簡便性のみならず感度の面でも我々の DAJIN システムが有用であることが確認された。

最後に、受精卵ゲノム編集での Flox 変異誘導時に生成される変異アレルの検出を試みた。Flox 変異は上述の領域欠損変異や点変異よりも複雑で、更に、LoxP 配列自身に相補的な配列が含まれているため、まずは人工的な Flox 配列を DAJIN で解析した。その結果、正常な LoxP 配列を含む人工 Flox 配列を DAJIN は意図した Flox 配列であると認識・出力することに成功した。一方、点変異 LoxP 配列を含む人工 Flox 配列は、意図した Flox 配列だとは認識されなかった。この成功を確認したのち、我々は 3 つの遺伝子を標的とした Flox 変異マウスをそれぞれ作成し、その遺伝型を解析した。最初に解析した Cables2 遺伝子において、DAJIN は意図した Flox 変異配列や意図しない領域欠損・片側のみ LoxP 挿入・逆位も認識し出力した。更に、想定以上の領域欠損も検出することが出来た。これらの解析結果は従来法と矛盾しなかった。Cables2 遺伝子と同様に、Exoc7 遺伝子や Usp46 遺伝子においても同様の結果が得られた。DAJIN が検出したアレルは確かに次の世代でも検出され、DAJIN の正確性が裏付けられた。

ナノポアロングリードシーケンサーは現在発展中の技術であるために、今すぐに我々の手法が一般化する可能性は低いが、正確な遺伝型解析は遺伝子改変動物を用いた in vivo 実験の質の向上に間違いなく貢献する。また、迅速かつ包括的な解析手法は、ともすれば各実験精度が低くなりがちな大規模な screening を含む in vivo 実験の高品質化にも結びつく。

4 - 2. Cre ノックインドライバーマウスの開発

CRISPR を用いた受精卵ゲノム編集によって Gdf9-Cre ノックインドライバーマウスを作成することに成功した。そのヘテロ変異マウスにおいては、目立った表現型の異常は観察されなかったが、ホモ変異マウスでは卵胞の発育が停止する異常が観察された。詳細に観察したところ、Gdf9 null 変異マウスと同様に、一次卵胞中に巨大な卵母細胞が観察され、二次卵胞以降のステージの卵胞は形成されなかった。そのため、このノックインアレルから発現する Gdf9 は 2A ペプチドが C 末端に付加されたために、卵母細胞外へと正常に分泌できなかったと考えられる。本ヘテロノックインマウスと GRR マウスとの交配に誕生した Gdf9+/Cre; ; ROSAGRR/+ マウスにおいては当初の想定通りに生後 0~3 日目の原始卵胞中の卵母細胞でのみ Cre 組換えが認められた。なお、成獣においては 100% の効率で雌性生殖細胞での組換えを誘導した。また、全身での Cre 組換えを評価したところ、小脳の一部で組換えが認められたものの、それ以外の組織での組換えは認められず、雄性生殖細胞でも組換えも認められなかった。

同様の手法にて Ddx4-CreERT2 マウスを作成した。このヘテロ変異マウスでは目立った異常は観察されなかった。また、メスのホモ変異マウスも異常表現型を示さなかったがオスのホモ変異マウスでは精母細胞で分化が停止する異常が確認された。これは Ddx4 機能低下マウスと同様の表現型であることから、2A ペプチドの付加が Ddx4 タンパクの機能を障害したと考えられる。GRR マウスを利用した組換え効率の確認を行ったところ、タモキシフェンの投与によって、雌雄どち

らの生殖細胞においても 100%の効率で組換えが生じることが明らかとなった。加えて、雄性生殖細胞では精子幹細胞で、雌性生殖細胞では原始卵胞中の卵母細胞から組換えが生じており、成獣の体内においても最も未熟な生殖細胞で組換えが起きることが明らかとなった。全身での組換えを確認したところ、すい臓等の一部の組織で組換えがみられたもののその頻度は低かった。Synapsin1-CreERT2 マウスは目立った異常な表現型を示さず、中枢神経系で予測通りの組換えを示した。

これらの Cre ドライバーマウスの遺伝背景は最もよく使用される近交系である C57BL/6 であるため、遺伝背景が混在することなく cKO マウスを作出することが可能である。目的の細胞系譜で完全な組換え効率を示し、全身における組換え部位が既知で、その表現型までが明らかとなっている Cre ノックインドライバーマウスは稀であるために今後多くの cKO マウス実験に貢献することが十分に期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iwasaki Kanako, Fujiyama Tomoyuki, Nakata Shinya, Park Minjeong, Miyoshi Chika, Hotta-Hirashima Noriko, Ikkyu Aya, Kakizaki Miyo, Sugiyama Fumihiro, Mizuno Seiya, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Takahashi Satoru, Funato Hiromasa, Yanagisawa Masashi	4. 巻 41
2. 論文標題 Induction of Mutant Sik3Sleepy Allele in Neurons in Late Infancy Increases Sleep Need	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2733 ~ 2746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1004-20.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Le Hoai Thu, Hasegawa Yoshikazu, Daitoku Yoko, Kato Kanako, Mizuno Iijima Saori, Dinh Tra Thi Huong, Kuba Yumeno, Osawa Yuki, Mikami Natsuki, Morimoto Kento, Ayabe Shinya, Tanimoto Yoko, Murata Kazuya, Yagami Ken ichi, Takahashi Satoru, Mizuno Seiya, Sugiyama Fumihiro	4. 巻 58
2. 論文標題 Generation of B6 Ddx4em1(CreERT2)Utr, a novel CreERT2 knock in line, for germ cell lineage by CRISPR/Cas9	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 genesis	6. 最初と最後の頁 e23367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvg.23367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saori Mizuno-Iijima, Shinya Ayabe, ..., Seiya Mizuno(29人中27番目)、Atsushi Yoshiki, Fumihiro Sugiyama	4. 巻 19
2. 論文標題 Efficient production of large deletion and gene fragment knock-in mice mediated by genome editing with Cas9-mouse Cdt1 in mouse zygotes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods	6. 最初と最後の頁 30328-303287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymeth.2020.04.007	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 Kuno Akihiro, Ikeda Yoshihisa, Ayabe Shinya, ..., Mizuno Seiya(最終著者)	4. 巻 20
2. 論文標題 DAJIN enables multiplex genotyping to simultaneously validate intended and unintended target genome editing outcomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3001507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3001507	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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森本 健斗, 沼田 幸樹, 水野 聖哉, 大徳 陽子, 加藤 花名子, 八神 健一, 高橋 智, 杉山 文博
2. 発表標題 生殖隔離制御遺伝子座Hstx2内に存在する隣接関連遺伝子群の機能同定
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 水野 聖哉, 久野 朗広, 高橋 智, 杉山 文博
2. 発表標題 『より良い』ノックアウトマウスを作出するためのゲノム編集デザイン
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生殖隔離制御遺伝子座Hstx2内に存在する隣接関連遺伝子群の機能同定
2. 発表標題 森本 健斗, 沼田 幸樹, 水野 聖哉, 大徳 陽子, 加藤 花名子, 八神 健一, 高橋 智, 杉山 文博
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019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
研究分担者	藤山 知之 (Fujiyama Tomoyuki) (00635089)	筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教 (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	久野 朗広 (Kuno Akihiro) (60830122)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	

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