

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16026

研究課題名(和文) Y染色体CRISPRイメージング技術の確立と哺乳動物の雌雄産み分け

研究課題名(英文) Optimization of the CRISPR imaging method in mammalian zygote for sex selection

研究代表者

岡村 永一 (Okamura, Eichi)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・助教

研究者番号：30755913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ゲノム編集技術などの技術革新に伴い、より効率良く遺伝子組換え系統を樹立することが可能となり、マウスやラットの飼育数は爆発的に増加している。動物実験では再現性の観点から片方の性別のみを利用するケースが多く、不要な性の個体は安楽死処分せざるをえない。従って、雌雄を選択的に産み分ける技術の開発が重要と考えられるが、マウスやラットで実用化されている方法は無かった。本研究では受精卵で雄のみが持つY染色体を可視化すれば雌雄産み分けが可能なのではないかと着想した。そこでCRISPRイメージング法をマウス受精卵に応用し、プローブを最適化することで、高感度に特定の染色体領域を可視化することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではマウス受精卵において特定の染色体領域を可視化する最適条件を決定することが出来た。この方法を用いてY染色体を可視化すれば、様々な動物種で雌雄産み分けが可能になると考えられる。また、本研究では高効率にTgマウス作製を樹立可能な方法を確立することが出来た。この方法は汎用性があり多くの研究者にとって利便性の高いツールと考えられ、今後の生命科学研究の進展に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In animal experiments, only one gender is selectively used from the viewpoint of the reproducibility. Therefore, it is important to develop a technique for sex selection. However, there has been no effective sex selection method that can be applied to mice and rats. In this study, we conceived that visualization of the Y chromosome, which is possessed only by males, in fertilized eggs could be helpful for sex selection. By optimizing the CRISPR imaging technique, which is one of application technologies of genome editing, I succeeded to visualize specific chromosomal region effectively in mouse fertilized eggs.

研究分野：発生工学

キーワード：CRISPRイメージング 雌雄産み分け

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム編集技術の普及により各々の研究者が比較的簡単に新しい遺伝子組換え系統を樹立することが可能となり、マウスやラットの系統数は爆発的に増加している。一方、動物の維持には多大な人的・費用的コストがかかる上、飼育スペースも限られることが研究の律速となりつつある。また、動物愛護の観点からも、必要最低限の動物を産生し維持することが求められている。こうした問題は、再生医療用モデル動物として着目されているブタなどの大型動物や、よりヒトに近く慎重な取り扱いが求められるマーモセット等の霊長類ではさらに深刻となる。こうした背景から、より計画的に動物を産生するための胚生殖工学技術の開発が望まれていた。動物実験では再現性の観点から片方の性別のみを利用する 경우가多く、不要な性の個体は安楽死処分せざるをえない。従って、雌雄を選択的に産み分ける技術は従来から切望されているが、マウスやラットで実用化されている方法は無かった。畜産業においても、例えば酪農では雌ウシ、食肉用では雄ウシというように目的により必要な性別が異なるため雌雄産み分けのニーズは高い。実際にウシでは既に実用化されている産み分け法も存在するが、判別精度や繁殖効率・コスト面において課題が多く、また、畜産農家が自身で実施出来る簡便な方法は存在しないため、新しい技術の開発が強く望まれていた。2013年に報告された CRISPR イメージング法は、不活性型 Cas9 と EGFP の融合タンパク質 (dCas9-EGFP) を gRNA の配列特異的に任意の DNA 配列へリクルートし、特定染色体領域をライブイメージングする技術である。研究代表者は受精卵で雄のみが持つ Y 染色体を可視化すれば雌雄産み分けへと応用可能なのではないかと着想した。しかし、これまで全ての CRISPR イメージングの報告は培養細胞や植物を用いたものであり、動物個体や受精卵を用いた生体内イメージングが可能であるかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的はマウス受精卵の中で効率的に特定の染色体領域を可視化する技術を開発し、受精卵の中に Y 染色体が有るかどうかを確認することで雌雄の判別をする新技術を開発することである。そのために、CRISPR イメージングプローブに改良を施し、高感度化を試みる。また、CRISPR イメージングをマウス生体内で実施するためのトランスジェニックマウス系統の作出も試みる。

3. 研究の方法

1. 高感度な CRISPR イメージングプローブの開発

オリジナルの CRISPR イメージングプローブは、DNA 切断活性を無くした Cas9 (dCas9) と EGFP の融合タンパク質を gRNA によって標的染色体部位へとリクルートして可視化するという原理に基づく。本研究では、より高感度なイメージングを可能とするため以下の構築を新規に作製した。

3xEGFP プローブ : Cas9 に融合した EGFP をリンカーを介して 3 つタンデムに連結することで蛍光強度の増強を試みる。

MS2 プローブ : gRNA 末端に MS2 アプタマー配列を連結する。dCas9 タンパク質と MS2 アプタマー結合性 MCP-EGFP タンパク質を同時に発現し標的領域に多量の EGFP を集積させることで蛍光強度の増強を試みる。

Sun Tag プローブ : GCN4 ペプチド配列を連結した Cas9 タンパク質、および、抗 GCN4 ミニ抗体と EGFP の融合タンパク質を細胞内に発現させ標的 DNA 領域へと多量の EGFP を集積させることで蛍光強度の増強を試みる。

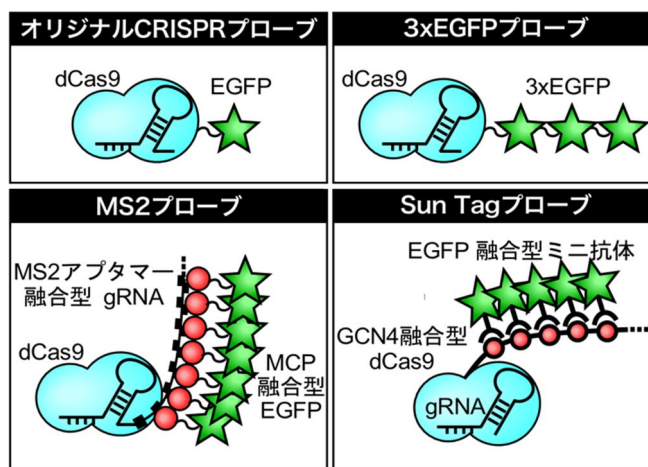


図1: 作製した新規CRISPRイメージングプローブ

in vitro transcription によってこれらの mRNA を合成し、テロメア領域を標的とする gRNA とともにマウス受精卵へと導入し、2 細胞期まで発生させ、蛍光画像を取得した。また、イメージングを行なった後の受

精卵を仮親へ移植し、発生率を検証した。

2. Y 染色体に CRISPR プローブを集積させるための gRNA の選定

高感度な CRISPR イメージングのためには、プローブを効率良く染色体に集積させる必要がある。そのためには gRNA をリピート配列に設計することが望ましい。Y 染色体上のリピート配列をゲノムデータベースから探索し、20 種類の gRNA を設計した。その後、CRISPR イメージングプローブと gRNA の共発現ベクターを構築した。これをマウス ES 細胞へ導入し、Y 染色体のイメージングを試みた。

3. 効率的なトランスジェニック(Tg)マウス作製法の開発

CRISPR イメージングを成獣生体内で実施するためには Tg マウスを作製する必要がある。しかし既存の受精卵前核マイクロインジェクション法は Tg 作製効率は高くとも 10%程度であり効率が悪い。本研究ではトランスポゾンシステムを用いることで効率的に Tg を作製可能な条件を探索した。

4. 研究成果

マウス受精卵においてテロメア領域を標的とし、オリジナル、および、改良版の CRISPR イメージングプローブの比較解析を行なった。テロメア領域は高度なリピート構造であり、培養細胞におけるイメージングが既に論文報告されている。イメージングの結果、3xEGFP プローブ、Sun Tag プローブはオリジナルのプローブと同等の蛍光強度であり改善は認められなかった。しかし、gRNA 配列末端に MS2 アプタマー配列を連結し、dCas9 と MS2 アプタマー結合性 MCP-EGFP タンパク質を発現させた MS2 CRISPR プローブは明らかな蛍光強度の改善が認められた。

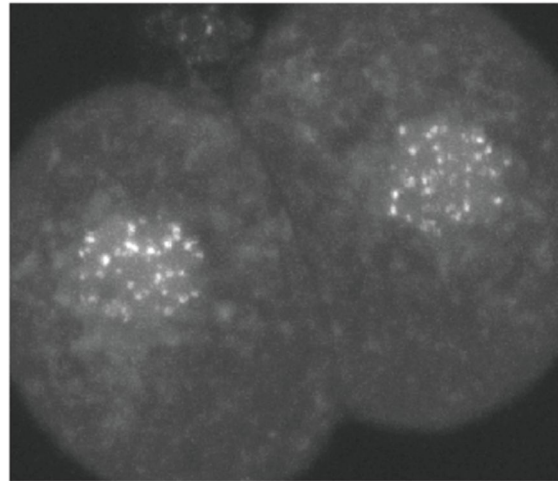


図 2: マウス受精卵内で可視化したテロメア領域

次に CRISPR イメージング後の胚について、凍結融解後の生存率についての検証を行った。上述のテロメア領域を可視化したマウス 2 細胞期胚について、簡易ガラス化を用いて凍結保存を行った。常法により融解したところ、非操作のコントロール群と比較して遜色ない生存率が確認された。また、これを仮親に移植して発生率を検証したところ、イメージングの有無で発生率に大きな差は生じないことが明らかになった。

また、Y 染色体を可視化するための gRNA のスクリーニングをマウス ES 細胞を用いて実施した。Y 染色体上リピート配列を標的とした gRNA を 20 種類設計した。dCas9-EGFP と gRNA の共発現ベクターを ES 細胞に導入し、共焦点顕微鏡で観察したところ、明瞭に Y 染色体を可視化できる gRNA は存在しなかった。同様にマウス受精卵においても検証したが、明瞭なシグナルを得ることはできなかった。これらの結果から、より効率的に Y 染色体へ dCas9-EGFP を集積させるための工夫が必要であると考えられた。

最後に、CRISPR イメージングを生体内で実施するため、Tg マウス作製法の改良を行った。gRNA と dCas9、および、MCP-EGFP 遺伝子発現カセットを同時にゲノム導入するためには、通常の前核インジェクション法による Tg 作製法は効率が低い。そこでトランスポゼースを利用した Tg 作製法の最適化を行った。特にトランスポゼース mRNA およびドナー DNA の導入タイミングを工夫することで、7 割以上の F0 個体が Tg となる最適条件を見出すことに成功した。

本研究ではこのように、マウス受精卵において特定の染色体領域を可視化する最適条件を決定することが出来た。残念ながら当初の目的であった Y 染色体領域の可視化には成功しなかった。Y 染色体はリピート配列が多く、他の染色体とは異なるクロマチン状態のためにプローブが効率良く結合できなかった可能性も否定できない。今後、受精卵においてゲノム上の様々な領域の可視化を試みる予定であり、可視化し易い領域と困難な領域の性質を明らかにしていきたいと考えている。また、本研究では高効率に Tg マウスを樹立可能な方法を確立することが出来た。この方法は汎用性があり、多くの研究者にとって利便性の高いツールと考えられることから、生命科学研究の発展に大きく貢献できると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 依馬朋香, 村田知弥, 岡村永一, 三上夏輝, 松本翔馬, 水野聖哉, 依馬正次, 杉山文博
2. 発表標題 in vivo ゲノム編集を用いた迅速な心筋特異的ノックアウトマウスの作製
3. 学会等名 第69回 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 依馬朋香, 村田知弥, 岡村永一, 三上夏輝, 松本翔馬, 水野聖哉, 依馬正次, 杉山文博
2. 発表標題 迅速な心筋特異的ノックアウトマウスシステムの開発
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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