

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22608

研究課題名（和文）受精時ゲノム編集技術を用いた低モザイク性遺伝子ノックイン技術の開発

研究課題名（英文）Development of novel genome editing method to reduce genetic mosaicism

研究代表者

鈴木 亨（Suzuki, Toru）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：70455351

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、以前に報告した受精時ゲノム編集技術を発展させ、ゲノム部位特異的な遺伝子導入を行う技術の開発を行うことを目的とした。改変対象遺伝子部位に蛍光タンパク質遺伝子を導入するための実験デザインを行い、初めに遺伝子改変後の遺伝子発現とタンパク質合成が問題なく起こることを確認した。さらに、マウス未受精卵に精子頭部と遺伝子導入のためのCasシステムを導入し、蛍光タンパク質の発現を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では受精時ゲノム編集を応用し、ゲノム部位特異的な遺伝子導入を行う技術の開発を行った。マウス胚において遺伝子改変のマーカースとして用いた蛍光タンパク質の発現が確認されたことから、予想通りの遺伝子導入が可能であることが示唆された。今後本技術の精度の向上や分子メカニズムの研究を進めることで、マウスを含む実験動物を用いたゲノムや遺伝子機能の解析による基礎生物学的な理解が進むとともに、ヒト生殖補助医療や生物生産への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this project is to develop a new method for introducing genes into specific genomic loci using genome editing combined with fertilization. Initially, we designed experiments to introduce marker genes encoding fluorescent protein into target genomic loci of mice, and confirmed that the genes reconstructed after gene introduction can be accurately expressed and detected in control experiments. Based on the results, experiments to introduce genes into mouse genome were conducted and fluorescent signals were detected in some embryos.

研究分野：生殖生物学

キーワード：受精時ゲノム編集 マウス ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

CRISPR/Cas システムの発見とその作用機序の解明により、ゲノム配列依存的な新規遺伝子改変技術が開発された。簡易かつ高効率を実現するこのゲノム編集法は瞬時に生命科学研究に取り入れられ、すでに多くの成果につながっている。実験動物モデルであるマウスへの導入も進み、近年における遺伝子改変マウスの多くは CRISPR/Cas システムにより作製されている。

マウスでの CRISPR/Cas システムを用いた遺伝子改変動物の作製は、一般的に受精卵へのシステム構成要素の導入により行われている。ヌクレアーゼである Cas9 によりターゲットとなるゲノム DNA に切れ目を入れ、この損傷が細胞内の機構により修復される際に狙った変異を導入する。細胞の DNA 損傷修復機構には大きく、相同性依存的修復 (HDR) と非相同的末端結合 (NHEJ) が存在し、HDR は細胞周期の S 期から G2 期にかけて、また NHEJ は G1 期から G2 期にかけて活性化している。マウス受精卵でのゲノム編集は、DNA 複製が行われる S 期を狙って行うことで、HDR を介した長鎖遺伝子の導入も比較的効率で行うことができる。

しかしながら、DNA 複製が行われた後にゲノム編集が起こることで、遺伝子改変のモザイク性が生じやすいことや、受精卵の前核へシステムを注入するための微細針によるゲノムへの物理的損傷、また、胚発生の最初期にゲノム編集が行えないなどの問題点が考えられる。胚発生の最初期に、低侵襲的な方法で、DNA 複製が起こる前のゲノム編集が可能となれば、既存の受精卵ゲノム編集を補完しうる技術として有効であると考えられる。申請者は以前の研究において、こうした問題点を克服するためのアプローチとして、細胞内精子注入 (ICSI) による受精卵作製時に CRISPR/Cas システムを導入する受精時ゲノム編集法を開発し報告した。

受精時ゲノム編集では、単純な遺伝子機能欠損を効率よく起こしうることを明らかとしたが、特定のゲノム部位に蛍光タンパク質遺伝子といった外来遺伝子を導入 (遺伝子ノックイン) することはできていなかった。これは、受精時ゲノム編集を行う未受精卵が M 期 (MII 期)、初期の受精卵が G1 期にあることにより、通常長鎖遺伝子を導入する場合に用いられる HDR の活性が低いことに起因すると思われる。受精時ゲノム編集で遺伝子ノックインを可能とするためには、HDR によらない仕組みの利用が必要であると考えられる。

CRISPR/Cas システムが広範囲に応用され、NHEJ を介した遺伝子ノックイン技術の開発も進んでおり、NHEJ が G1 期から G2 期にかけて活性化していることから、対象細胞の細胞周期によらない遺伝子改変技術として注目されている。受精時ゲノム編集においても、NHEJ を介した機構は機能していると考えられたことから、これらを組み合わせることで受精時ゲノム編集をより良い技術へ発展させることが期待できる。

2. 研究の目的

申請者が開発・報告した、CRISPR/Cas システムを利用した受精時ゲノム編集は、高効率、低侵襲的にゲノム改変を起こすことができ、ゲノム編集生物作製における問題点の一つであるモザイク性を低減させる可能性を持つ。受精時ゲノム編集を、NHEJ を介した遺伝子ノックイン技術と組み合わせることにより、より効率が良くモザイク性の低いゲノム編集技術の確立が期待される。本研究では、ICSI によるマウス受精卵作製時に CRISPR/Cas システムを導入し、初期胚での遺伝子ノックインをマーカー遺伝子である蛍光タンパク質の発現により解析することで、遺伝子改変に関わる新技術の開発と評価を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変デザインと遺伝子発現評価のためのコントロール実験

遺伝子改変の対象遺伝子として、マウス胚盤胞期胚での遺伝子発現が起こる Oct4 (Pou5f1) および Cdx2 を選定した。終始コドンの周辺に CRISPR/Cas システム用のガイド RNA (crRNA) を設計し、切断予測部位に 2A 配列と緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子もしくは赤色蛍光タンパク質 (mCherry) 遺伝子、3' 末端配列を連結するような遺伝子導入用のプラスミドベクターをデザインした。また改変後の遺伝子発現が正常に起こることを評価するため、CAG プロモーター下に改変後の対象遺伝子を搭載したプラスミドを構築した。B6D2F1 マウスの雌雄を用い、ICSI による受精卵の作製と遺伝子発現評価用のプラスミドの導入を行った。作製した受精卵は体外培養により 4 日間、胚盤胞期まで培養した。蛍光タンパク質の発現は、蛍光顕微鏡により観測した。

(2) 受精時ゲノム編集と改変遺伝子発現の解析

各改変対象遺伝子に対するガイド RNA (crRNA)、tracrRNA および Cas9 をコードする mRNA を合成した。実験用マウスの雄雌より未受精卵と精巣上体内精子を回収し、ICSI による受精卵作製と CRISPR/Cas システムの導入を行い、作製した受精卵は体外培養により 4 日間、胚盤胞期まで培養した。蛍光タンパク質の発現は、蛍光顕微鏡により観測した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子改変デザインと遺伝子発現評価のためのコントロール実験

遺伝子改変のデザインを行い、デザインを基に構築したプラスミドを用いて遺伝子改変後の遺伝子の発現を評価した。ICSIにより評価用プラスミドを導入した受精卵は胚盤胞期まで発生し、マーカー遺伝子である GFP ならびに mCherry の蛍光が観察された。本研究でデザインした遺伝子改変がゲノム上で起き、目的遺伝子と蛍光タンパク質遺伝子が発現した場合、蛍光観察により判定可能なことが確認された。

(2) 受精時ゲノム編集と改変遺伝子発現の解析

受精時ゲノム編集により作製したマウス胚を体外培養し、胚盤胞期まで発生させた。Cdx2 を遺伝子改変対象として作製した胚において、遺伝子導入された mCherry の蛍光が観察され、目的のゲノム部位に正確に遺伝子導入が行われたことが示唆された。

本研究により、受精時ゲノム編集による遺伝子ノックインが可能なことが明らかとなった。NHEJ を介した遺伝子ノックイン技術は発展途上にあり、今後導入効率を高めるための実験デザインや新規技術の検討、およびより制約の少ない遺伝子導入法の採用により、受精時ゲノム編集を発展させた受精卵ゲノム編集を補完する技術の確立が期待される。

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 Santini Laura, Halbritter Florian, Titz-Teixeira Fabian, Suzuki Toru, Asami Maki, Ma Xiaoyan, Ramesmayer Julia, Lackner Andreas, Warr Nick, Pauler Florian, Hippenmeyer Simon, Laue Ernest, Farlik Matthias, Bock Christoph, Beyer Andreas, Perry Anthony C. F., Leeb Martin	4. 巻 12
2. 論文標題 Genomic imprinting in mouse blastocysts is predominantly associated with H3K27me3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-021-23510-4	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0件

〔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
---------	---------