

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号： 1 3 8 0 2

研究種目： 奨励研究

研究期間： 2021 ~ 2021

課題番号： 2 1 H 0 4 1 4 8

研究課題名 胚操作不要のゲノム編集技術「GONAD法」による遺伝子改変アルビノモルモット作製

研究代表者

青島 拓也 (AOSHIMA, TAKUYA)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・技術職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 470,000 円

研究成果の概要：胚操作不要のゲノム編集技術「genome-editing via oviductal nucleic acids delivery (GONAD) 法」を用いて、モルモットのチロシナーゼ遺伝子をノックアウトし、遺伝子改変モルモットの作製を試みた。

本研究において、GONAD法によるモルモットのゲノム編集を成功させることはできなかったが、成功に必要な2つの課題を解決することができた。それは、プロジェステロンチューブ埋植と人工授精法によりモルモットの交配成立時間を管理できるようになったこと、およびこれまで不明であった卵管内の受精卵の局在を、およそその範囲で特定できるようになったことである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モルモットは、ビタミンCを体内合成できない、完全性周期を示す等、ヒトに類似した特徴を多く有し、栄養学や免疫学等の分野で広く利用されている。それにも関わらず、これまでにモルモットの遺伝子改変動物は作製されていない。この作製は、栄養学や免疫学の研究を大きく発展させ、新たな治療薬や治療法の開発に繋がる可能性を秘めた社会的意義の極めて大きい研究である。本研究では遺伝子改変モルモットの作製までは至らなかったが、GONAD法でモルモットのゲノム編集を成功させるために必要な知見を得ることができたことは、少なからず学術的意義、社会的意義のある研究であった。

研究分野： 実験動物学

キーワード： ゲノム編集 GONAD法 モルモット

1. 研究の目的

新規ゲノム編集技術「genome-editing via oviductal nucleic acids delivery (GONAD) 法」は、卵管内の受精卵に直接ゲノム編集を施す極めて画期的なゲノム編集技術であり、胚操作を必要としないため、胚操作法や胚培養法が確立されていない動物に対しても有効なゲノム編集技術と考えられる。

モルモットは、マウスやラットと同じ齧歯目動物でありながら、ビタミンCを体内合成できない、完全性周期を示す等、ヒトに類似した特徴を多く有し、栄養学や免疫学等の分野で広く利用されてきた。しかし、これまでにモルモットで遺伝子改変動物は作製されておらず、その手技は確立されていない。モルモットにおけるこの技術の確立は、栄養学や免疫学だけでなく、様々な研究分野の発展に大きく貢献するもので、その意義は極めて大きい。

そこで本研究では、胚操作を必要としないゲノム編集技術 GONAD 法を用いてモルモットのゲノム編集を行い、世界初となる遺伝子改変モルモットの作製を目指すこととした。

2. 研究成果

本研究では、GONAD 法を用いてモルモットのチロシナーゼ遺伝子 (Tyr) をノックアウト (KO) し、アルビノ個体を作製することとした。これまでの研究から検討が必要と考えられる以下の2点について検討を行い、モルモットの GONAD 法を実施した。

(1): 卵管内の受精卵の局在部位の特定

モルモットの卵管はマウスやラットとは異なり卵管膨大部が不明瞭で、排卵数も少ないため、卵管内の受精卵の局在部位を実体顕微鏡下で識別することができず、GONAD 法を実施するにあたり、RNP の注入～エレクトロポレーションの実施部位を決定することが出来なかった。そこで交配が成立した雌を用いて、卵管内の受精卵が局在する部位を特定することとした。

日本エスエルシー株式会社より、6～10 週齢の雄性 Hos:Weiser-Maples 及び雌性 Slc:Hartley を購入し、交配適期に雌と雄を同居させ交配をかけた。交配が成立した雌は 0.75dpc にイソフルラン過麻酔で安楽死させ、開腹して卵管を採取した。卵管采から子宮までの卵管を3分割し、分割した卵管をそれぞれ PBS でフラッシングし、排出された PBS 内の受精卵の有無を確認した。

その結果、受精卵は卵管采側 1/3 の卵管から排出された PBS 内で確認された。他の2つの3分割した卵管からは受精卵は確認できなかった。したがって、交配成立後 0.75dpc ではモルモットの受精卵は卵管の卵管采側 1/3 に局在していると考えられ、この部位に RNP 注入～エレクトロポレーションを実施する必要があると考えられた。

(2): 性周期同期化法と人工授精法による交配成立時間の管理

モルモットはマウスやラットと異なり昼夜を問わず交配が成立するため、交配成立時間を詳細に特定することが困難であること、また GONAD の実施時間が不定期になってしまうことから、性周期同期化法および人工授精法により、モルモットの交配成立時間を管理し、コントロールすることを試みた。

日本エスエルシー株式会社より購入した、6～10 週齢の雌性 Slc:Hartley 背部にプロジェステロンを充填したシリコンチューブ (プロジェステロンチューブ) を埋植し、2～3 週間後に摘出した。摘出後ヒト下垂体性腺刺激ホルモン (HMG) 5 IU を頸背部に3日間皮下投与して過排卵処置を行い、その後 5 mg/mL のプロジェステロン溶液を 100 μ L 皮下投与して排卵を誘起させた。雄から採取した精巣上体尾部精子を膈内に投与して人工授精を行った。人工受精 21 日後に開腹し、子宮内の胎児の有無を確認した。

その結果、人工授精した雌動物の子宮内に胎児を確認することができたことから、P チューブによる性周期同期化法および人工授精法により、モルモットの交配成立時間をコントロールすることが可能となり、すなわち GONAD 法を実施する時間を管理することが可能となった。

本研究で実施した GONAD 法の結果を表 1 に示す。

表 1: GONAD 法を用いたモルモットのチロシナーゼ遺伝子のノックアウト実験のまとめ

GONAD 法に 供した雌	剖検	不妊	途中死亡	胎仔	眼球の色素沈 着が認められ た胎仔・産仔	変異が認め られた 胎仔・産仔
26	24	15	2	13	13	0

本年度内の研究において、GONAD 法を用いてモルモットのチロシナーゼ遺伝子を KO し、遺伝子改変アルビノモルモットを作製することはできなかった。その原因の一つとしてエレクトロポレーションの電流値の条件が考えられた。モルモットの受精卵はマウスやラットに比べ、透明帯が厚くマウスやラットよりも大きな電流値が必要と考えられるが、本研究で GONAD 法を実

施した動物の半数近くは不妊となった。この原因として電流が受精卵に影響を及ぼしている可能性も否定できず、今後 TAKE 法等により、モルモットに適した電流値あるいは電流条件を詳細に検討する必要があると考えられた。

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