

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06006

研究課題名（和文）有袋類における次世代型遺伝学的手法の確立

研究課題名（英文）Establishment of technologies of next-generation genetics in marsupial

研究代表者

清成 寛 (Hiroshi, Kiyonari)

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究計画では、遺伝子改変オポッサム作製の効率化を目指すと共に、F0世代による遺伝子機能解析を可能とする次世代型遺伝学的手法の基盤技術開発およびリソース化を目指した受精卵の凍結保存技術の確立を目的とした。成果としては、高効率にF0世代での遺伝子機能解析が可能となり、かつ、系統保存技術の確立に向けて技術的な大きな進展があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子改変を実施する上で重要だと考えられる受精卵のステージについて、明暗周期の最適化を行うことで、数時間単位で調整することが可能となり、これにより、遺伝子改変個体の作製に適した時期の受精卵ステージを特定することができ、作製効率を改善することができた。凍結保存技術開発については、人工授精の技術の確立に成功し、凍結精子による系統保存の可能性が大きく期待できる成果があった。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we aim to improve the efficiency of generating genetically engineered opossums, and to develop foundational technologies for next-generation genetic approach that enable gene function analysis using the F0 generation. Additionally, we aim to establish techniques for the cryopreservation of fertilized eggs to facilitate resource conservation. The outcomes include significant technological progress in enabling high-efficiency gene function analysis in the F0 generation and in advancing the establishment of strain preservation technologies.

研究分野：遺伝学、生殖工学

キーワード：オポッサム 有袋類 ゲノム編集 系統保存

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで哺乳類を用いた遺伝・発生学的研究はマウス(有胎盤類)を中心とした限られた生物に依存してきたが、CRISPR/Cas9技術の台頭により様々な生物に対して遺伝子改変が行われ、多様な生物間の比較研究が加速している。有袋類であるハイ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。2020年度、我々は一連の胚操作技術開発に成功し、世界初となる遺伝子改変有袋類(遺伝子ノックアウト(KO)オポッサム)を作出した。一方で、オポッサムは性成熟に9ヶ月程度を要し、ホモ変異体の作出までに2年近くかかるため、マウスで確立されたゲノム編集技術を用いて、交配を必要としないF0世代での遺伝子機能解析を検討したが、ホモ変異体は得られるものの、モザイク個体が多く解析に大きな支障となることがわかった。

### 2. 研究の目的

これまでほとんど知られていないオポッサムの排卵や受精、発生メカニズムを解明し、それをコントロールする事でマイクロインジェクションに最適な時期の受精卵を効率よく取得し、F0ホモ変異体オポッサム作出の基盤技術開発を目指す。また、作成した遺伝子改変オポッサムのリソース化を目指し、凍結保存技術の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) F0ホモ変異体の作出効率化

##### 1-1. 排卵・受精メカニズム解明とコントロール

オポッサムはこれまで交尾排卵動物として知られていたが、一部の文献および我々のこれまでの経験から交尾なしでも排卵することがわかってきた。また逆に、交尾をしても受精卵が得られない(排卵していない)例も多く確認された。排卵はメスの発情と密接な関連があると予想され、メスの膣の状態と排卵との相関関係を調べるため、それぞれの膣、卵巢(卵胞)の状態と排卵の有無について調べる。また別のアプローチとして、応募者らは、同居中のオスからある時期に特有な刺激臭が放たれる事を見いだしており、この匂いとメスの発情との関係(膣、卵巢(卵胞)の状態と排卵の有無)についても併せて検討する。最終的には、ホルモン投与により上記現象を誘導することで排卵のコントロールを目指す。

## 1-2. F0 ホモ変異体の作出

オポッサムの受精卵は卵管を通過する際にムコイド層を獲得し、これが発生に必須と考えられているため、injection には、卵管通過後（交尾後 24 時間）の受精卵が必要である。更に、これまでの結果から交尾後 30~34 時間の受精卵では、既に雌雄前核が接触、或いは、融合していることから、より早期の受精卵を用いてマイクロインジェクション時期の最適化検討を行う。

### （2）受精卵凍結による系統保存技術の確立

凍結方法としてはガラス化凍結法および緩慢凍結法を検討する。オポッサムの受精卵はシェルコートと呼ばれる硬い層に覆われており、そのままでは凍結液が細胞質に浸透していかない。そこで、まずは針やピンセットによりシェルコートに穴を開けた、或いは、除去した受精卵を用いて検討する。

## 4. 研究成果

### （1）F0 ホモ変異体の作出効率化

オポッサムは、マウスやラットのように発情を特定することは極めて困難であるとされている。我々は、雌の膣の日々の状態観察を行い、わずかに膣の状態が変化していくこと、同居中の雄からある時期に特有な刺激臭が放たれることを確認し、この事とメスの発情との相関関係について調べた。しかしながら、これらの変化と発情との明確な相関関係を示すデータは得られなかった。一方で交尾日のコントロールはできないものの、遺伝子改変を実施する上で重要な受精卵のステージについては、明暗周期の最適化を実施することで、数時間単位で受精卵のステージのコントロールが可能となり、これにより、遺伝子改変個体の作製に適した時期の受精卵ステージを特定することができ、作製効率を改善することができた（論文執筆中）。

### （2）受精卵凍結による系統保存技術の確立

受精卵の凍結保存については、ムコイド層やシェルコートの除去が非常に困難であること、除去できたとしても受精卵にかなりのダメージがあり、その後の発生に影響を及ぼすことなどから、依然として難しい状況にある。そこで他の多くの哺乳類で確立されている凍結精子による系統保存について検討した。検討を実施するにあたり、まず、融解後の凍結精子をどのように卵子と授精させるかの検討を実施した結果、体外受精より人工授精が適していると結論づけ、人工授精技術の確立を目指した結果、これに成功した。これにより、精子凍結による系統保存技術の確立が大きく前進する成果となった。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroshi Kiyonari, Mari Kaneko, Takaya Abe, Aki Shiraishi, Riko Yoshimi, Ken-Ichi Inoue, Yasuhide Furuta	4. 巻 31
2. 論文標題 Targeted gene disruption in a marsupial, <i>Monodelphis domestica</i> , 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 3956-3963
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2021.06.056	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9件（うち招待講演 5件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 清成 寛
2. 発表標題 袋をもたない小さな有袋類 ” オポッサム ”
3. 学会等名 日本実験動物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清成 寛
2. 発表標題 ゲノム編集による遺伝子改変有袋類の誕生
3. 学会等名 日本発生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清成 寛
2. 発表標題 Generation of first genetically engineered marsupials, <i>Monodelphis domestica</i>
3. 学会等名 ゲノム編集学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清成 寛
2. 発表標題 Generation of first genetically engineered marsupials, Monodelphis domestica
3. 学会等名 International Mammalian Genome Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清成 寛
2. 発表標題 Generation of first genetically engineered marsupials, Monodelphis domestica
3. 学会等名 Transgenic Technology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清成 寛
2. 発表標題 非モデル動物を用いた遺伝学的ツールの確立
3. 学会等名 有性生殖研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023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 International IVF Initiative (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清成 寛
2. 発表標題 ゲノム編集による遺伝子改変有袋類の誕生
3. 学会等名 関西実験動物研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清成 寛
2. 発表標題 ゲノム編集による遺伝子改変有袋類の作製
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>有袋類の遺伝子改変に世界で初めて成功 - ゲノム編集による遺伝子改変オポッサムの作製 -  <a href="https://www.riken.jp/press/2021/20210722_1/index.html">https://www.riken.jp/press/2021/20210722_1/index.html</a></p>
--

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	金子 麻里  (Kaneko Mari)		

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
研究協力者	吉見 理子  (Yoshimi Riko)		
研究協力者	白石 亜紀  (Shiraishi Aki)		
研究協力者	阿部 高也  (Abe Takaya)		

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