

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19187

研究課題名（和文）ゲノム編集ヤギを活用したコンディショナルノックアウトによる排卵制御中枢の解明

研究課題名（英文）Analysis of the regulatory mechanism of ovulation in goats via establishing a conditional knockout animal model utilizing the genome-editing technique

研究代表者

大蔵 聡（Ohkura, Satoshi）

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20263163

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、受精卵エレクトロポレーション法（GEEP法）を用いたヤギ受精卵におけるゲノム編集により、排卵を制御するキスペプチン神経系の特異的ノックアウトによって卵胞嚢腫モデルとなるゲノム編集ヤギを作出することを最終目標とし、その端緒となるキスペプチン遺伝子の全身性ノックアウトヤギの作出を試みた。エレクトロポレーション条件の検討およびその最適化を行い、体内受精卵（1細胞期胚）のゲノム編集により得られたゲノム編集胚を仮親ヤギに移植したところ、片アレルのキスペプチン遺伝子座に5塩基の欠損があるフレームシフト変異を生じたゲノム編集ヤギ個体を初めて得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、家畜におけるゲノム編集技術に欠かせない基本的な遺伝子工学および生殖工学技術を確立できたとともに、ゲノム編集技術により全身性キスペプチン遺伝子ノックアウトヤギの作出に見通しが立った。本研究の成果により、これまで報告のなかったヤギにおいてゲノム編集個体の作出技術を確立できたことは、学術的に大きな意義がある。

研究成果の概要（英文）：Our study was designed to create a goat model for follicular cysts by conditionally knocking out the kisspeptin neurons, which are pivotal in regulating ovulation, through genome editing of fertilized goat eggs using the “gene editing by electroporation of Cas9 Protein (GEEP)” method. As a first step, we attempted to establish a conditional knockout technique by creating a systemic knockout goat of the kisspeptin gene using the GEEP method. We meticulously examined and optimized electroporation conditions, leading to the successful generation of genome-edited embryos of the kisspeptin gene from internally fertilized goat eggs (1-cell stage embryos). These embryos were then transferred to recipient goats, resulting in the birth of a genome-edited male goat with a frameshift mutation with a five-nucleotide defect at the kisspeptin locus in one allele. This significant milestone represents the first-ever report of genome-edited individuals in goats.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ゲノム編集 キスペプチン エレクトロポレーション 受精卵 GnRH 排卵 ヤギ 卵嚢腫

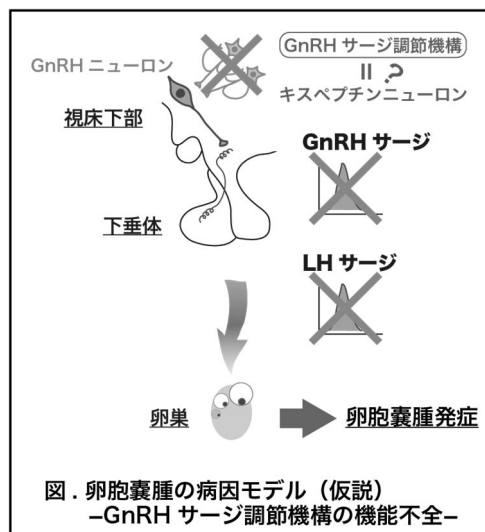
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) わが国の畜産現場においてウシの受胎率が低下し続けている。受胎率の低下は牛群の平均分娩間隔の延長をもたらし、ひいては畜産物生産性を低下させる。ウシの受胎率低下は日本のみならず世界的な傾向であり、畜産物の持続的生産や生産性向上のためには、受胎率の低下は解決すべき喫緊の課題である。

(2) 受胎率低下の要因として、卵胞発育から排卵にいたる過程の不調や受精後の胚着床の不具合など、ウシの繁殖生理機能の低下が考えられる。中でも、近年のウシに頻発する卵胞嚢腫は受胎率低下の大きな要因である。卵胞嚢腫牛の卵巣では、異常な大きさの卵胞が排卵することなく存在する。これは排卵を調節する脳機能の異常が原因と考えられる。排卵は、卵巣から分泌されるエストロジェンの正のフィードバック作用による性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) および黄体形成ホルモン (LH) のサージ状分泌が引き金となるため、エストロジェンの正のフィードバック作用を仲介する、中枢の GnRH サージ調節機構の機能不全が卵胞嚢腫の発生要因であると想定できる (図)。しかし、排卵を制御する脳機能の全容は解明されていない。



### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、反芻家畜の排卵を制御する中枢機構である GnRH サージ調節メカニズムに焦点を絞り、この機構をターゲットとしたゲノム編集ヤギの作出に挑戦し、コンディショナルノックアウト技術を用いて卵胞嚢腫モデルヤギを作出することをめざした。このモデルヤギを用いて卵胞嚢腫発症メカニズムを解明し、排卵調節の生理機構に基づく新たな視点からの卵胞嚢腫治療薬開発に資する基盤的知見を得ることを当初の目的とした。

(2) これまでに研究代表者らは、視床下部神経ペプチド「キスペプチン」が GnRH 分泌制御に中心的な役割を担うことを明らかにしており、本研究では「GnRH サージ中枢におけるキスペプチン神経系の機能不全が卵胞嚢腫の原因」とする仮説を立てた。そこで本研究では、最新のゲノム編集技術(受精卵におけるゲノム編集:受精卵エレクトロポレーション法(GEEP法))を駆使し、キスペプチン神経系を視床下部内局所でノックアウトするコンディショナルノックアウトにより卵胞嚢腫モデルとなるゲノム編集ヤギを作出し、反芻家畜の排卵制御機構の解明を試みた。

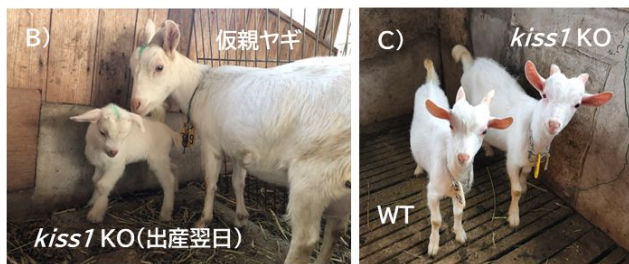
### 3. 研究の方法

(1) GEEP 法を用いたヤギ受精卵におけるゲノム編集により、これまで報告のないゲノム編集ヤギの作出技術の確立と検証を行った。キスペプチン遺伝子 (*Kiss1*) 座への外来遺伝子ノックインは成功率が低いことが予想されたため、まず、キスペプチン遺伝子の全身性ノックアウトを試みた。ヤギキスペプチン遺伝子のエクソン 2 領域にガイド RNA (gRNA) を複数設計し、EGxxFP アッセイにより各 gRNA の標的配列切断活性を評価して高効率な切断活性を示す gRNA を選定した。次に、選定した gRNA により、過剰排卵誘起処置を施したヤギから採取した体内受精卵 (1 細胞期胚) を用いてゲノム編集を行い、ゲノム編集胚の胚発生率およびゲノム編集胚のジェノタイプングによるゲノム編集率を指標として、最適なエレクトロポレーション (EP) 条件を決定した。以上の検討により最適化した EP 条件を用いて、1 細胞期胚のゲノム編集を行い、得られたゲノム編集胚を 7 日間発生培養して胚盤胞にまで発生させ、仮親となるヤギに移植した。

(2) 得られたゲノム編集ヤギ (*Kiss1* ヘテロ変異体; 雄 1 頭 (後述)) を用いて、経時的な体重測定による成長特性評価と、LH およびテストステロン分泌動態の解析と交配能の確認による繁殖機能評価を行った。また、ゲノム編集個体と野生型雌ヤギとの交配により得られた産子の遺伝子型解析 (ジェノタイプング) を行った。

### 4. 研究成果

(1) ヤギ *Kiss1* のエクソン 2 領域に設計した gRNA を用い、最適化した EP 条件により体内受精卵 (1 細胞期胚) のゲノム編集を行った。得られたゲノム編集胚を発生培養した後に仮親となるヤギに移植したところ、ゲノム編集胚移植を行った仮親ヤギ 6 頭中 1 頭の妊娠が確認でき、その個体から産子 (雄 1 頭) を得た。産子のジェノタイプングにより、片アレルにおいてキスペプチン遺伝子座に 5 塩基の欠損があるフレームシフト変異が生じていることが明らかとなった (*Kiss1* ヘテロ変異体、図)。



D) *kiss1* exon2 領域

	Val	Ser	Ala	Tyr	Asn	Trp	Asn
WT :	GTGTCGGCCTACAACCTGGAAC						
Kiss1 :	GTGTCGG*****AACTGGAAC						
KO	Val	Ser	Glu	Leu	Glu	...	

5塩基の欠損が入ったことにより  
遺伝子の機能欠損の可能性  
(フレームシフト変異)

(2) *Kiss1* ヘテロ変異体は野生型ヤギと同等の成長曲線を示した。また、血漿中黄体形成ホルモンおよびテストステロン分泌動態は、野生型雄ヤギと比べて変わりなく推移した。さらに、*Kiss1* ヘテロ変異体は、野生型ヤギと同時期に性成熟を迎え、妊孕性も有していた。次に、野生型雌ヤギとの交配により得た産子のジェノタイプングにより、雌個体(1頭)において、*Kiss1* ヘテロ変異体と同様に片アレルにおいてキスペプチン遺伝子座に5塩基の欠損があるフレームシフト変異が生じていることが明らかとなった。現在、得られた雌 *Kiss1* ヘテロ変異体との交配により *Kiss1* ホモ変異体(KO個体)の作出を行っている。

(3) 以上、本研究では、GEEP法を用いてキスペプチン遺伝子の全身性KOゲノム編集ヤギを作出するための技術の確立を行った。その結果、ヤギにおける過排卵誘起のためのホルモン処置プロトコルや、雄ヤギとの交配後にヤギ1細胞期受精卵採取を可能とするタイミングの確定など、家畜におけるゲノム編集技術に欠かせない基本的な生殖工学技術を確認するとともに、エレクトロポレーション条件の検討およびその最適化により、ヤギ1細胞期受精卵において高いゲノム編集率を得る手法を確立できた。また、得られたゲノム編集胚の移植により仮親ヤギからゲノム編集ヤギ個体を得ることができた。

(4) 本研究により、全身性キスペプチン遺伝子ノックアウトヤギの作出については、ヘテロ変異体の交配により可能となる見込みとなったが、研究当初の目的である、家畜の排卵を制御する中枢機構であるGnRHサージ調節メカニズムにおけるキスペプチン神経系を特異的にノックアウトした卵巣嚢腫モデルヤギの作出には至らなかった。交配、妊娠・分娩、性成熟の一連の繁殖プロセスに年単位の時間がかかるヤギでは致し方ないところと考えるが、本研究により、GEEP法を用いて全身性キスペプチン遺伝子ノックアウトヤギの作出には見通しが立ち、また、その過程の一連の遺伝子工学・生殖工学技術について、これまで報告のなかったヤギにおいて確立できたことは学術的に大きな意義がある。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oshimo, Y., Munetomo, A., Magata, F., Suetomi, Y., Sonoda, S., Takeuchi, Y., Tsukamura, H., Ohkura, S. and Matsuda, F.	4. 巻 67
2. 論文標題 Estrogen increases KISS1 expression in newly generated immortalized KISS1-expressing cell line derived from goat preoptic area	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 15 ~ 23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2020-053	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6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ohkura, S.
2. 発表標題 The neuroendocrine mechanism regulating pulsatile GnRH release in the hypothalamus in goats
3. 学会等名 Japan-Poland Joint Seminar “Cutting-edge Reproductive Physiology: Bridges to the Future of Research and Cooperation”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ohkura, S.
2. 発表標題 The neuroendocrine mechanism regulating pulsatile GnRH release in the hypothalamus in goats
3. 学会等名 The 4th International Conference on Mathematics and Natural Sciences (IConMNS) 2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 近藤由梨・松山秀一・中村 翔・森田康広・稲谷結花・長尾勇佑・大蔵 聡
2. 発表標題 Kiss1ノックアウトヤギを用いた性腺刺激ホルモン放出ホルモンパルス発生機構の解析
3. 学会等名 令和4年度東海畜産学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsuda, F., Okuda, K., Suetomi, Y., Kobayashi, K. and Ohkura, S.
2. 発表標題 Study on the method of gene delivery to the hypothalamic arcuate nucleus using goats and newly established goat kisspeptin neuron cell lines
3. 学会等名 Society for Neuroscience 50th Annual Meeting (Neuroscience 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤由梨・森田康広・松山秀一・稲谷結花・長尾勇佑・大蔵 聡
2. 発表標題 Kiss1ノックアウトヤギを用いたパルス状性腺刺激ホルモン分泌制御機構の解析
3. 学会等名 令和3年度愛知県農学系4機関による研究交流会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>1. プレスリリース：独自ゲノム編集技術を用いたゲノム編集ヤギ個体の作出に成功  <a href="https://www.nagoya-u.ac.jp/researchinfo/result/2022/09/post-323.html?fbclid=IwAR3Bgm3VN84MxxrQD7U8f_moMNXLLjCII-9dQ0Jb-yMTRkq0ggJAKZ61a1A">https://www.nagoya-u.ac.jp/researchinfo/result/2022/09/post-323.html?fbclid=IwAR3Bgm3VN84MxxrQD7U8f_moMNXLLjCII-9dQ0Jb-yMTRkq0ggJAKZ61a1A</a></p> <p>2. 名古屋大学大学院生命農学研究科動物生産科学研究室  <a href="https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~laps/">https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~laps/</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
研究分担者	松山 秀一  (Matsuyama Shuichi)  (50455317)	名古屋大学・生命農学研究科・准教授    (13901)	

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	森田 康広  (Morita Yasuhiro)  (90818262)	帯広畜産大学・畜産学部・准教授    (10105)	

	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	稲谷 結花  (Inatani Yuka)	(株)セツロテック・研究員	
研究協力者	長尾 勇佑  (Nagao Yusuke)	(株)セツロテック・研究員	
研究協力者	中村 翔  (Nakamura Sho)	名古屋大学・生命農学研究科・特任准教授   (13901)	
研究協力者	近藤 由梨  (Kondo Yuri)	名古屋大学・生命農学研究科・大学院生   (13901)	

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