

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19237

研究課題名（和文）累代繁殖できる4倍体マウスの作出をめざして

研究課題名（英文）The challenge to generate tetraploid mice that can be bred cumulatively

研究代表者

堀居 拓郎（Horie, Takuro）

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：00361387

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：4倍体の哺乳類は発生初期に致死となるため、ほとんど生まれてくることはない。我々はp53依存的なチェックポイントが発生初期に存在することを発見し、p53の機能を破壊することで4倍体胚の発生能が劇的に向上することを発表した（Sci Rep 2015）。本研究では、p53に加えてMitochondrial permeability transition poreの構成要素であるシクロフィリン D（CypD）の機能を破壊することで、4倍体細胞の妊娠後期での生存性を上げることに成功した。一方で、p53とCypDの機能阻害によっても、4倍体由来の配偶子（精子）形成には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、将来的に哺乳類で初めての4倍体由来の配偶子を作成し、さらには4倍体動物の累代繁殖につなげることができる。脊椎動物は今日までに2回の全ゲノム倍加（WGD）を繰り返すことで進化してきた。本来ゲノムが倍加することは表現型バリエーションを持たせ、環境変化に適用しやすくなったり、ある染色体がダメージを受けても、他の染色体で代用できたりと、メリットは多いはずである。一方、なぜ下等な両生類は4倍体発生でき、配偶子形成し、子孫を残すことができるのに、高等な哺乳類は4倍体発生も配偶子形成もできなくなってしまったのか、その進化的意義に近づくことができる。

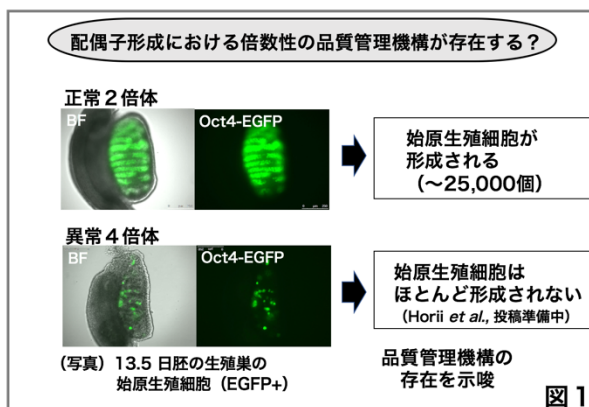
研究成果の概要（英文）：Tetraploid mammals are rarely born because they are lethal early in development. We discovered that a p53-dependent checkpoint exists in early development and published that disruption of p53 function dramatically improves the developmental potential of tetraploid embryos (Sci Rep 2015). In this study, disrupting the function of p53 and cyclophilin D (CypD), a component of the Mitochondrial permeability transition pore, successfully increased the viability of tetraploid cells in late gestation. On the other hand, inhibition of p53 and CypD function did not result in the formation of gametes (spermatozoa) of tetraploid origin.

研究分野：発生工学

キーワード：4倍体

### 1. 研究開始当初の背景

4倍体の哺乳類は発生初期に致死となるため、そもそも生まれてこない。我々はp53をノックアウト(KO)したマウスでは4倍体発生が継続することを発表した(Sci Rep 2015)。驚いたことに、この4倍体マウスの胎仔の生殖巣では、配偶子の起源である始原生殖細胞がほとんど形成されていないことが分かってきた(Horii et al., 投稿準備中)(図1)。このことは、マウスには個体発生のみならず、配偶子形成においても、倍数性の品質管理機構が存在することを示唆している。両生類などの下等脊椎動物では、これらの倍数性チェック機構は存在していないことから、この機構は哺乳類など高等脊椎動物が進化的に獲得した機構である可能性がある。



### 2. 研究の目的

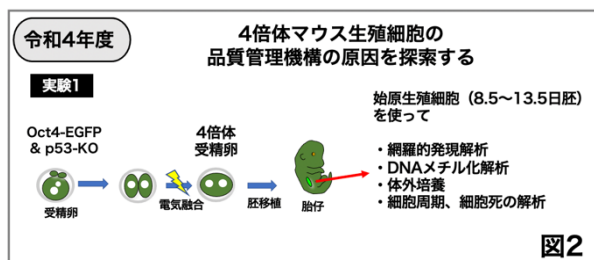
本研究では、まずマウス配偶子形成や個体形成における倍数性異常に関する品質管理機構に関わる遺伝子を明らかにする。次に、この機構をゲノム・エピゲノム編集技術で取り扱うことにより、4倍体胚の発生を向上させるとともに、哺乳類で初めての4倍体由来の配偶子を創出し、将来的に累代飼育できる4倍体マウスの作出を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、2022年度は、始原生殖細胞における倍数性異常に関する品質管理機構を解明するために原因遺伝子の探索実験を行った。そして、2023年度は得られた解析結果を元に検証実験を行った。具体的な研究内容は以下の通りである。

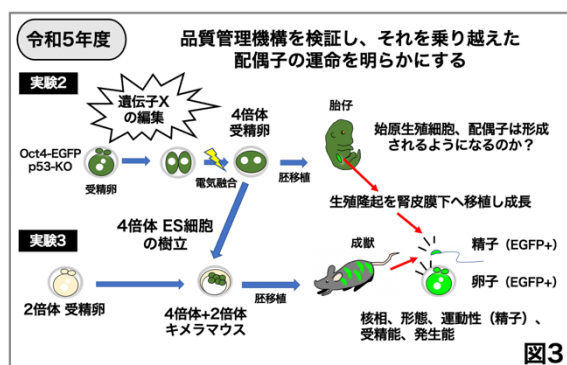
#### 令和4(2022)年度 倍数性の品質管理に関わる原因遺伝子の探索(図2)

マウス受精卵(始原生殖細胞マーカー Oct4-EGFPをレポーターとして保有)を回収し、受精卵のゲノム編集によりp53をKOする。2細胞期に電気融合により4倍体胚を作製する。4倍体の胎仔より各発生段階の始原生殖細胞をセルソーターにより回収し、トランスクリプトーム解析やメチローム解析を用いて、2倍体との比較を行った。これらの実験により多角的に倍数性管理機構の鍵となる候補遺伝子をピックアップする。



#### 令和5(2023)年度 倍数性の品質管理に関わる原因遺伝子の検証(図3)

前年度の研究で明らかとなった倍数性管理機構に関わる候補遺伝子(遺伝子X)をゲノム編集により除去することで、この機構が機能しなくなり、4倍体胚の発生や配偶子の形成能がされるようになるのか検証実験を行う。候補となる遺伝子の影響をゲノム編集により取り扱った4倍体マウスを作製する(実験2)。あるいは、こうして作製した4倍体胚からES細胞を樹立して、生殖系列キメラを作製する(実験3)。遺伝子XのKOにより個体発生が途中で停止する場合は、胎仔の生殖隆起を回収し、腎皮膜化へ移植することで生殖細胞を成長させる。倍数性管理機構を乗り越えた配偶子を得ることができれば、配偶子の核相、形態、運動性(精子の場合)を確認する。最終的に、4倍体由来配偶子どうしを体外受精により掛け合わせるにより、受精能や発生能を調べ、次世代の4倍体マウスが得られるのか検



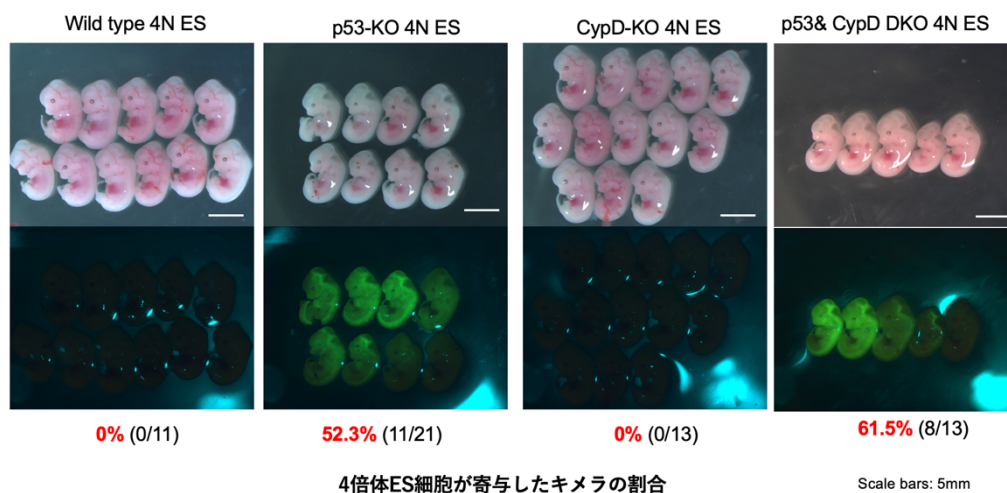
証する。

#### 4. 研究成果

2022年度は4倍体と2倍体で網羅的DNAメチル化解析による比較を行った。網羅的メチル化解析の結果、4倍体で2倍以上メチル化率が上昇した領域が39、逆に半分以下に減少した領域が217あることが明らかとなった。また、既存のデータベースや文献などから、4倍体発生に関わる遺伝子としてMitochondrial permeability transition pore (mPTP)の構成要素であるシクロフィリンD (CypD) 遺伝子を候補とした。

2023年度は、体細胞および精子でEGFP蛍光を発するAcr/CAG-EGFPマウス(阪大・伊川正人先生より入手)から受精卵を回収し、2細胞期で電気融合させ、4倍体胚盤胞を作製した。この胚から4倍体ES細胞を樹立した。CRISPR-Cas9ゲノム編集により、4倍体オスES細胞のp53およびCypD遺伝子をKOした。これらのES細胞を2倍体胚に注入し、4倍体-2倍体キメラマウスを作製した。妊娠中期(12.5日)においては、未処理の4倍体ES細胞からは0%(0/11)、p53-KO 4倍体ES細胞からは52.3%(11/21)、CypD-KO 4倍体ES細胞からは0%(0/13)、p53とCypDのDKO 4倍体ES細胞からは61.5%(8/13)の効率で4倍体ES細胞が寄与したキメラ胎児が得られた(図4)。また、4倍体ES細胞の寄与率についてFACSを用いて解析したが、p53-KOとp53&CypD-DKOで大きな差は見られなかった(図5)。これらのことから、妊娠中期までの発生においては、p53が4倍体細胞の発生を阻害する主要な因子であり、CypDはあまり関与していないことが示された。

図4 p53およびCypD遺伝子をKOした4倍体ES細胞キメラ発生能(12.5日胚)



次に、p53-KO および p53&CypD-DKO ES細胞を使って、キメラ産子を産ませることにした。p53-KO ES細胞からは18%(6/33)、p53&CypD-DKO ES細胞からは43%(3/7)の効率で4倍体ES細胞が寄与したキメラ産子を得られた。すなわち、妊娠後期においては、p53に加えて、CypDが4倍体細胞の生存に重要な役割を果たしていることが示唆された。

最後に、p53&CypD-DKO 4倍体ES細胞由来オスキメラマウスの精巣上部尾部から精子回収を行った。4倍体ES細胞由来精子ではAcr/CAG-EGFPによりEGFP蛍光が観察されるはずであるが、残念ながら得られた精子は全てEGFP陰性、すなわち宿主胚由来であった(図6)。本研究からp53に加えてCypD遺伝子をKOすることにより、特に妊娠後期の4倍体細胞の生存性が上昇することを確認できたが、生殖細胞形成の改善には至らないことが示唆された。

図5 p53およびCypD遺伝子をKOした4倍体ES細胞キメラ寄与率(12.5日胚)

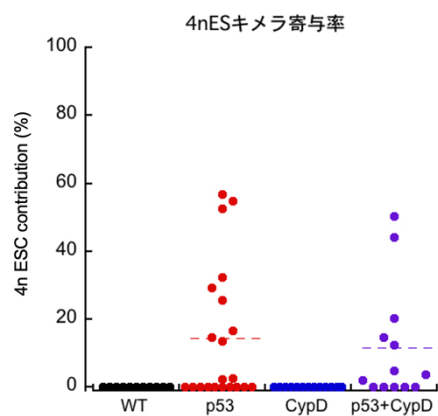
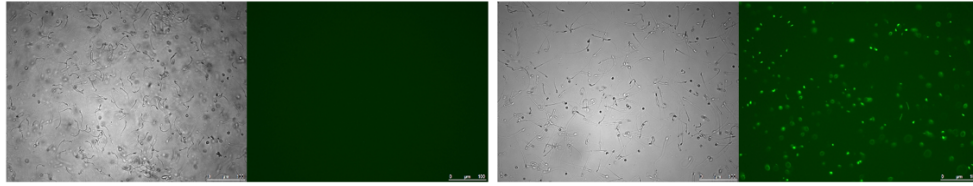


図6 p53およびCypD遺伝子をKOした4倍体ES細胞キメラの精子形成能

Sperm

4N ES -2N chimera

B6-Acr/CAG-EGFP (control)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Horii T, Morita S, Kimura M, Hatada I	4. 巻 15
2. 論文標題 Efficient generation of epigenetic disease model mice by epigenome editing using the piggyBac transposon system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Epigenetics Chromatin	6. 最初と最後の頁 40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13072-022-00474-3.	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 -

1. 著者名 Horii T, Morita S, Hatada I	4. 巻 2577
2. 論文標題 Generation of Epigenetic Disease Model Mice by Targeted Demethylation of the Epigenome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 255-268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-2724-2_18.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita S, Horii T, Hatada I	4. 巻 2577
2. 論文標題 Regulation of Gene Expression Using dCas9-SunTag Platforms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 189-195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-2724-2_13	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀居拓郎、金子武人、小林良祐、森田純代、畑田出穂
2. 発表標題 ゲノム、エピゲノム編集による疾患モデル動物の作出支援（AMED-BINDS）
3. 学会等名 第7回日本ゲノム編集学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀居拓郎、森田純代、木村美香、畑田出穂 エピゲノム編集マウス作製の効率化と作製支援
2. 発表標題 エピゲノム編集マウス作製の効率化と作製支援
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀居拓郎、森田純代、木村美香、畑田出穂
2. 発表標題 エピゲノム編集による過大子モデルマウスの作製
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀居拓郎、小林良祐、畑田出穂
2. 発表標題 ゲノム・エピゲノム編集による疾患モデル動物の無償作製支援 (AMED-BINDS)
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀居拓郎、森田純代、木村美香、畑田出穂
2. 発表標題 エピゲノム編集によるBeckwith-Wiedemann症候群モデルマウスの作製
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第67回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀居拓郎、森田純代、木村美香、畑田出穂
2. 発表標題 標的メチル化編集によるBeckwith-Wiedemann症候群モデルマウスの作製
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学生体調節研究所附属生体情報ゲノムリソースセンター ゲノム科学リソース分野  
<http://epigenome.dept.showa.gunma-u.ac.jp/~hatada/index.php>

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