

令和4年10月13日
国立大学法人 浜松医科大学

早期受精卵期（10時半および13時）において 生体内ゲノム編集法（*i*-GONAD法）に成功

<研究成果のポイント>

- 生体内でのエレクトロポレーションを用いた簡便な遺伝子改変マウス作製法である *i*-GONAD 法は、これまで、卵丘細胞が分散する夕方（16時以降）の後期受精卵期に行う必要がありました。
- 本研究ではヒアルロニダーゼの添加あるいは3分間のゲノム編集液の浸透により、10時半または13時の早期受精卵期においてもゲノム編集が可能であることを見出しました。
- この新しい方法はICR系統およびC57BL/6J系統においても有用でした。
- 浜松医科大学で確立されたこのマウス作製法は、時間に左右されることなく *i*-GONAD 法を行うことを可能にしました。

※本研究成果は、国際学術誌「International Journal of Molecular Science」オンライン版に日本時間9月14日に公表されました。

<概要>

浜松医科大学光先端医学教育研究センター医用動物資源支援部の高林秀次准教授・飯島健太研究技術職員らの研究グループと国立成育医療研究センターの佐藤正宏研究員は、これまで実施する時間が夕方16時以降という制約があった生体内ゲノム編集法（*i*-GONAD法）^{*1}において、卵管膨大部内での3分間のゲノム編集液の浸透操作あるいはヒアルロニダーゼの添加により実施時間を午前中（10時半）あるいは昼（13時）と時間を選ばずに行うことに成功しました。この成果はスイスMDPI社の国際学術誌「International Journal of Molecular Science」オンライン版に、9月14日に公表されました。

<研究の背景>

共同研究者である佐藤正宏研究員らが開発した *i*-GONAD 法は、CRISPR-Cas9 ゲノム編集法とエレクトロポレーション法を組み合わせ、マウス生体内で直接ゲノム編集を行い、遺伝子改変動物を作製する方法であり、簡便で安価に遺伝子破壊（ノックアウト: KO）や遺伝子挿入（ノックイン: KI）動物の作製が可能な方法です。現在、マウス、ラットおよびハムスターで *i*-GONAD 法の成功例が報告されています。一方、*i*-GONAD 法は生体内で直接行うため、ヒアルロン酸と卵丘細胞からなる塊に取り囲まれている受精直後の早期受精卵に行うことができず、卵管膨大部中の卵丘細胞が受精卵周辺から分散する夕方（16時以降）の後期受精卵期に行う必要がありました。このため、*i*-GONAD 法を行う時間が限られるという問題がありました。ヒアルロニダーゼはヒアルロン酸の加水分解酵素であり、*in vitro* で卵丘細胞塊を分散させるために発生工学ではよく使用されている酵素です。そこで本研究では、10時半と13時の早期受精卵がいる卵管膨大部にゲノム編集液と同時にヒアルロニダーゼを添加し3分間反応させ、卵丘細胞を分散させた後に *i*-GONAD 法を行いました。また、ヒアルロニダーゼを添加しないで3分間ゲノム編集液を浸透させてから *i*-GONAD 法を行いました。

<研究手法・成果>

本研究で *i*-GONAD 法を評価するためにチロシナーゼ (*Tyr*) 遺伝子のノックアウト実験を行いました。*Tyr* 遺伝子はメラニン色素の合成に関与しており、この遺伝子が壊された KO 個体はアルビノ個体となり眼の色素沈着がなくなります。本研究では黒色の C57BL/6J 系統オスとアルビノの ICR 系統メスを交配して、F1 では有色の個体となる受精卵に対して、*Tyr* 遺伝子を破壊するようなゲノム編集液 (RNP) を用いて、*i*-GONAD 法を行いました (図 1A)。

i-GONAD 法の条件として、実施する時間を 10 時半、13 時および 16 時に行いました。

i-GONAD 法の通常操作は交配が確認できたメスに麻酔をかけて、背部より卵巣と卵管膨大部を露出させ、卵管膨大部に RNP を注入後、すぐに (0 分) 卵管膨大部全体にエレクトロポレーションを行います。今回はすぐに処置をする 0min 群と 3 分静置する 3min 群、RNP と一緒にヒアルロニダーゼ (HA) 添加して 3 分間静置する 3min+HA 群で比較を行いました。

10 時半と 13 時に行った 0min 群は予想通り KO 個体の割合が低かったが、HA の添加により KO 個体数は有意に増加しました。さらに、驚いたことに、HA を添加しないでも 3 分静置すれば、KO 効率が上昇することが分かりました。これは HA が無くても 3 分間の静置することにより RNP が卵管膨大部内に浸透していくためであることが分かりました。また、16 時に行った時には HA の効果はありませんでした。

さらに、実験で最もよく使われる C57BL/6J 系統同士の交配でも今回の方法が使えるかを評価するために 13 時に HA を添加して 3 分間静置した後に *i*-GONAD を行いました (図 1B)。その結果、生まれた仔の 46% でゲノム編集がなされていることが明らかとなりました。

図 1 今回の実験操作

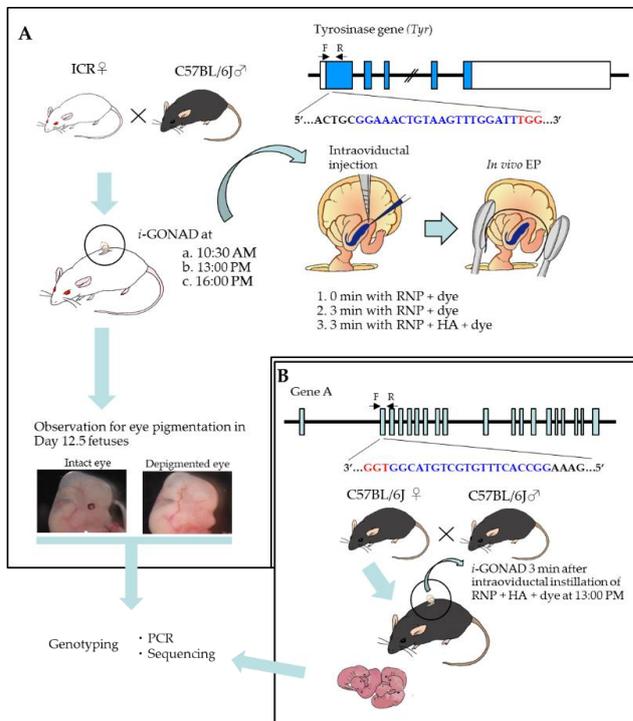


表 1 *i*-GONAD におけるヒアルロニダーゼ (HA) の効果

時間	処置	胎仔数	KO 個体数 (%)
	0 min	17	3 (18%)
10:30 AM	3 min	20	11 (55%)
	3 min + HA	20	17 (85%)
	0 min	33	6 (18%)
13:00 PM	3 min	30	21 (70%)
	3 min + HA	19	15 (79%)
	0 min	44	22 (50%)
16:00 PM	3 min	27	12 (44%)
	3 min + HA	23	13 (57%)

<今後の展開>

今回の方法の開発により、時間を選ばずに *i*-GONAD 法を行うことが可能となりました。また、この方法はマウスのみでなくラットなど他の動物種にも応用可能な方法です。ラットはマウス比較して発生に時間がかかるため、卵丘細胞の分散時間も遅く、そのためより遅い時間に実験を行う必要がありましたが、この方法を用いれば、時間を気にする必要がなくなります。今回は KO 実験についてのみ検討を行いました。今後は、*i*-GONAD 法による KI 時間の最適化を目指して、*i*-GONAD 法の改良を行う予定です。

<用語解説>

*1 *i*-GONAD 法：これまでの技術を必要とした ES 細胞への遺伝子ターゲティング法や、採卵した受精卵へのマイクロインジェクション法で変異マウス作製が行われていました。今回の方法は受精卵の存在する卵管膨大部へ直接ゲノム編集薬液を注入し、電気穿孔法にて作製する方法です。ES 細胞や採卵の必要がない簡便な、安価な、多数のマウスを処分することなく作製できます。

<発表雑誌>

International Journal of Molecular Science (DOI : 10.3390/ijms231810678)

<論文タイトル>

Successful *i*-GONAD in Mice at Early Zygote Stage through In Vivo Electroporation Three Min after Intraoviductal Instillation of CRISPR-Ribonucleoprotein

<著者>

Shuji Takabayashi*, Kenta Iijima, Masumi Tsujimura, Takuya Aoshima, Hisayoshi Takagi, Kazushi Aoto and Masahiro Sato

<研究グループ>

本研究は、浜松医科大学光先端医学教育研究センター医用動物資源支援部、同大学医化学講座および国立成育医療研究センターとの共同研究で行われました。

<研究支援>

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金「科研費番号 21K05890」（研究代表者・高林秀次）の支援によって行われました。

<本件に関するお問い合わせ先>

国立大学法人浜松医科大学 医用動物資源支援部（〒431-3192 浜松市東区半田山 1-20-1）
准教授 高林 秀次
Tel: 053-435-2001
E-mail: shuji@hama-med.ac.jp