



| | |
|--------------|---|
| Title | マウス受精卵に対して簡便に長鎖DNA を挿入するためのゲノム編集技術開発 |
| Author(s) | |
| Citation | 令和6（2024）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書．2025 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/101278 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和6年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

| | | | | | |
|---------------------|--|----------|------------------------|----|----|
| ふりがな 氏名 | まるぞえ えみ 丸添 愛未 | 学部 学科 | 歯学部歯学科 | 学年 | 4年 |
| ふりがな 共同 研究者氏名 | | 学部 学科 | | 学年 | 年 |
| | | | | | 年 |
| | | | | | 年 |
| アドバイザー教員 氏名 | 高畑 佳史 | 所属 | 歯学研究科 ゲノム編集技術開発ユニット | | |
| 研究課題名 | マウス受精卵に対して簡便に長鎖 DNA を挿入するためのゲノム編集技術開発 | | | | |
| 研究成果の概要 | 研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。) | | | | |

「研究目的」

CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術は遺伝子組換え技術と組み合わせることにより、作製者が望む設計で自由に遺伝子改変マウスを、非常に効率的かつ迅速に作製することが可能になった。遺伝子改変マウスの作製・解析と、疾患モデルマウスの病態解析を合わせることで、疾患発症メカニズムの解明、新規治療法の開発、創薬、早期診断マーカーの確立に強力な研究手法として活用されている(図1)。

ゲノム編集＝目的のDNA配列を自在に改変



主なゲノム編集法

- ・ ZFN
- ・ TALEN
- ・ **CRISPR/Cas9**

標的遺伝子の破壊(ノックアウト)や外来遺伝子の付加(ノックイン)が可能



遺伝性疾患のモデル細胞やモデル動物(突然変異体)の作製

遺伝子治療にも応用

図1：Crispr/Cas9 ゲノム編集の登場と応用

CRISPR/Cas9 は PAM 配列が存在する DNA の標的部位と相補的な配列として gRNA を作製し、gRNA が標的部位に特異的に結合する性質を利用して、Cas9/gRNA 複合体が標的 DNA 配列に誘導され、PAM 配列から 3 塩基上流を切断する (図 2)。

CRISPR/Cas9を利用したゲノム切断

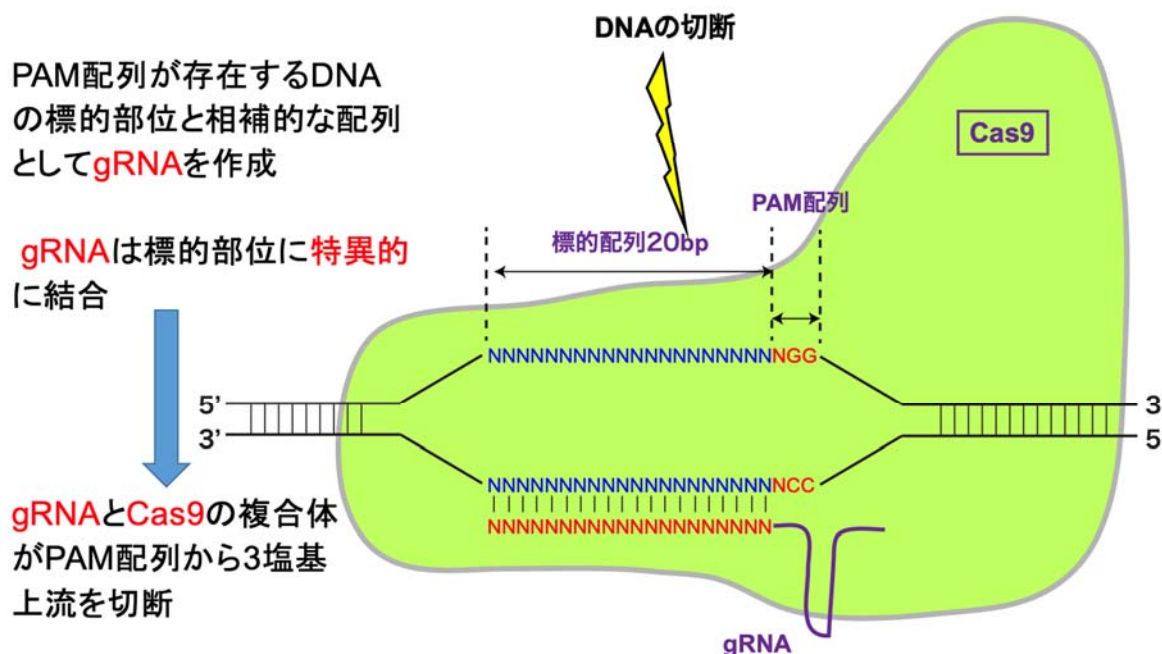


図 2 : CRISPR/Cas9 と gRNA 複合体によるゲノム切断図

既に当該研究室では、エレクトロポレーションを用いた TAKE 法(1)により、マウス受精卵に対して外来タグペプチドなどの短い DNA 配列を挿入する実験系を構築し、ノックイン動物を簡便に作製する技術を開発してきた。しかし、GFP などの比較的分子量の大きな蛍光タンパク質や、loxP 配列を 2 箇所含むような大きな DNA 配列に対して相同組み換えを誘発する効率的な方法が確立されていない。そこで、長鎖 DNA を特定のゲノム領域に効率的に挿入することが可能になる技術開発に挑戦する。長鎖 DNA は核内への移行効率が悪いため、TAKE 法による核内への核酸導入が難しいとされてきた。本研究ではアデノ随伴ウィルスを用いて長鎖 DNA を核内へ高発現させることが有効ではないかと考え、ゲノム編集効率の最適化を行い、長鎖 DNA のノックイン法の条件設定と効率の最適化を試みる。

「研究方法」

アデノ随伴ウィルス(AAV)はポリメラーゼをコードしておらず、自身のゲノム複製を宿主細胞のポリメラーゼ活性に依存している。エンドサイトーシスにより細胞内へ侵入すると核内に到達し、ウィルス被膜が脱落することで、長鎖 DNA を核内に送達することが理論的に可能である。

本研究では、マウス受精卵に対してどの AAV セロタイプが効率良く感染するかどうか検討を行い、長鎖 DNA ノックインのためのゲノム編集効率の最適化を目指す。

(1)AAV1, AAV2, AAV5, AAV6 ベクターに対する目的配列のクローニング

アデノ随伴ウィルスの組み換えベクター(Takara, pAAV-CMV Vector)を使用し、挿入したい配列とホモロジーアームを含む領域のクローニングを行う。この際、ノックインの効率化を上げるため、ホモロジーアームの長さの条件の最適化を行う。

(2)マウス受精卵に対する AAV ベクターの感染効率の検討

異なる AAV セロタイプの発現ベクターを用いて、マウス受精卵に蛍光タンパク質を過剰発現させ、蛍光強度を指標に、核酸の導入効率を検討する（図 3）。

ZsgreenとP2Aの両方で標識する理由

Prg4は関節軟骨の表面に発現する細胞外マトリックス成分

軟骨細胞や滑膜細胞により合成される分泌タンパク質

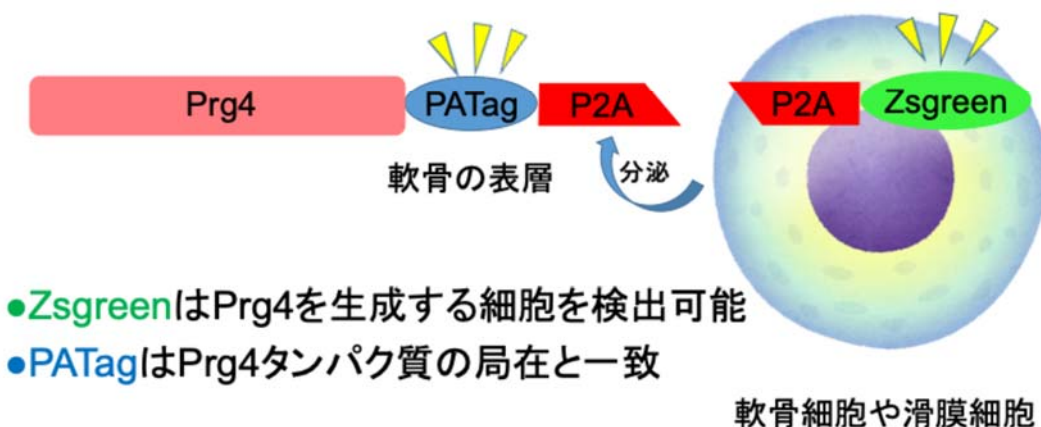


図 3：長鎖 DNA ノックインのための蛍光タンパク質 Zsgreen の挿入

(3)AAV によるマウス受精卵への長鎖 DNA 挿入の最適化

CARD HyperOva 試薬を投与し、過排卵処置を施した雌マウスから採卵を行い、体外受精により前期受精卵を作製する。受精卵の洗浄を行い、標的配列を含む AAV を感染させ、sgRNA,Cas9 混合物をエレクトロポレーションにより導入する。翌日、2 細胞期胚をレシピエントである偽妊娠マウスに移植し（図 3）、20 日後に得られる産仔のゲノムを抽出し、長鎖 DNA が挿入されたかどうか PCR 法にてスクリーニングを実施する。AAV の感染時期とタイミングの条件最適化を行う。以上の実験を順に実施し、AAV による簡便な長鎖 DNA ノックイン法の技術開発を確立する。

「研究経過」

アデノ随伴ウイルスの組み換えベクターに、PA-tag, P2A ペプチド、蛍光タンパク質 Zsgreen を連結した長鎖 DNA をクローニングした。相同組み換え修復を行うためホモロジーアームの長さは 600bp とした。

マウス受精卵に対する感染効率の最適化を行うため、AAV のセロタイプについて検討した。既に論文の報告があるように（2）、AAV6 型の感染効率が高い実績があるため、それに倣って AAV6 型を用いた。移植後に産まれた産仔の遺伝子判定を行うため、2 種類のプライマーを設計した。1 つ目はノックインする配列の両端を挟むよう設計し、野生型では 320bp 付近、変異体では 1142bp の DNA 増幅産物が検出されるように作製した。プライマー 2 では、野生型では検出できず、変異体のみで検出されるプライマーを設計した。これらのプライマーを用いてスクリーニングを行ったが、目的の変異体を取得することはできなかった（図 4、図 5）。得られる産仔数が 3 匹と少なく、実験スケールを大きくすることが求められる。また体外受精の精度と、受精卵の取り扱いの技術的難易度が高く、移植できる 2 細胞胚が少なかった。今後はより精度の高い再現性を高めて技術的精度の向上を計りたい。

図 4 :

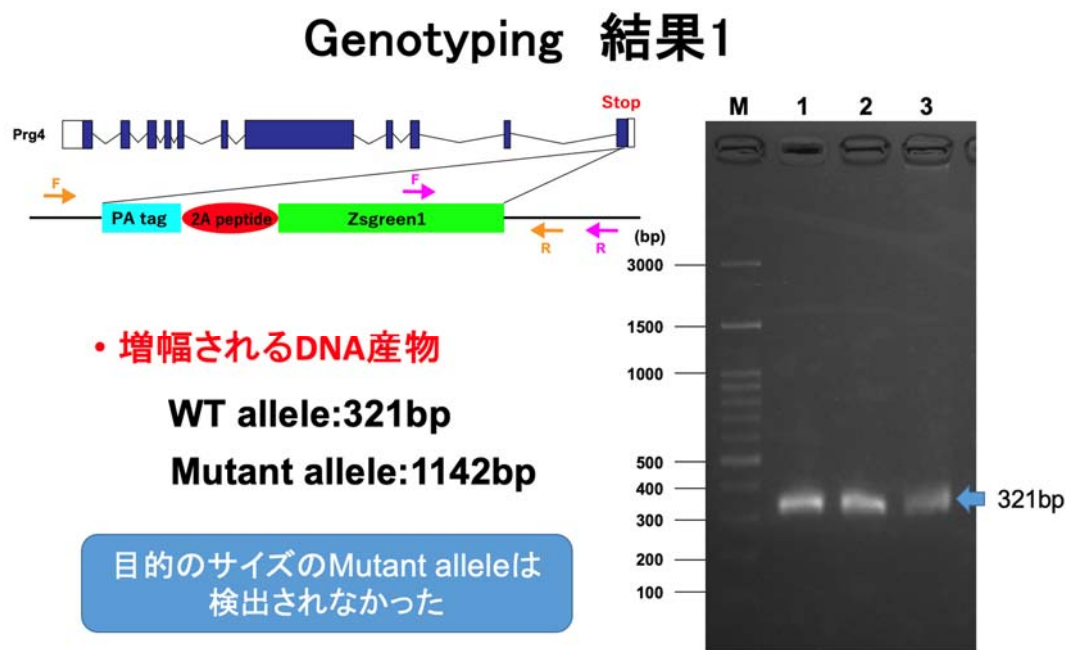
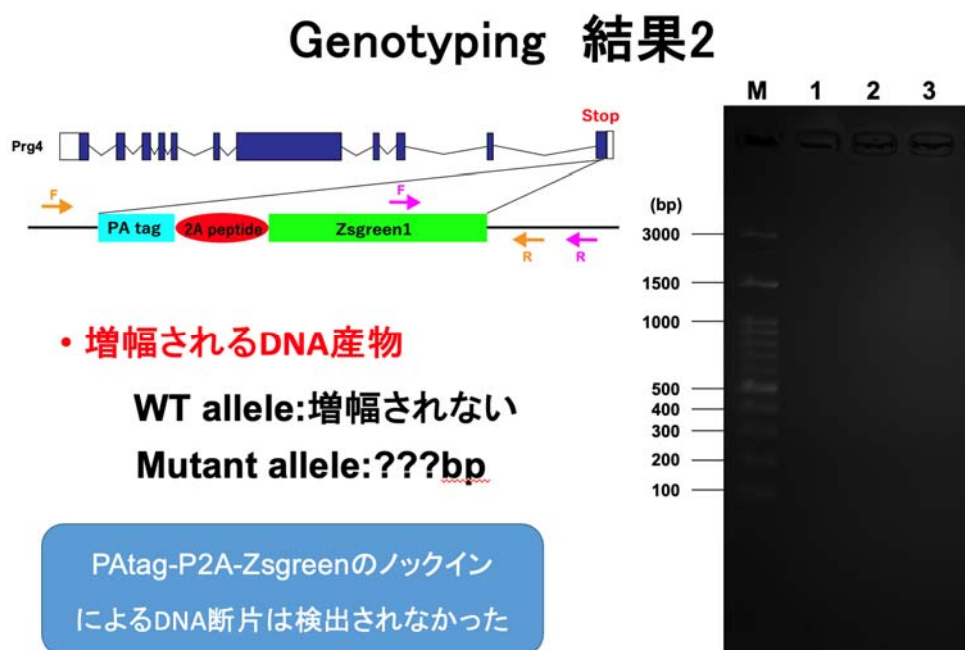


図 5 :



「研究成果」

今後、長鎖 DNA のノックインが簡便になれば、セーフ・ハーバー部位への標的遺伝子の挿入や、Flox マウスの作製、標的遺伝子への融合タンパク質付加などの遺伝子改変が簡便になり、マウスジェネティクス研究手法の革新的進歩が期待できる。

参考文献

1. Kaneko T, Sakuma T, Yamamoto T, Mashimo T. Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Sci Rep.* 2014;4:6382
2. Chen, S. *et al.* CRISPR-READI: Efficient Generation of Knockin Mice by CRISPR RNP Electroporation and AAV Donor Infection. *Cell Reports* **27**, 3780-3789.e4 (2019).