

Title	ES細胞におけるCRISPR/Cas9ゲノム編集とキメラマウスを用いた遺伝子機能解析への応用
Author(s)	大字, 亜沙美
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61705
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (大字亜沙美)

論文題名

ES細胞におけるCRISPR/Cas9ゲノム編集と
キメラマウスを用いた遺伝子機能解析への応用

論文内容の要旨

現在、日本を含め先進諸国では不妊症患者の増加が社会問題になりつつある。日本では、約6組に1組のカップルが不妊であり、その原因の約半分に男性が関与すると言われているが、男性不妊の原因遺伝子はほとんど明らかになっていない。雄性生殖細胞が受精可能な精子となるまでには、精子形成が起こる精巣内や、精子が射出されるまでに通る精巣上体・輸精管において体細胞や分泌物との相互作用が必要不可欠である。そのため、不妊の原因遺伝子を明らかにするには個体レベルでその機能を理解しなければならず、遺伝子改変マウス、中でも内在性遺伝子を破壊したノックアウト (KO) マウスを用いた実験が求められる。しかしながら、これまでKOマウスの作製には、多大な労力とコストおよび専門的なノウハウが必要だったため、より簡便な技術が求められていた。

そのような時、原核生物の獲得免疫機構であるClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated Proteins 9 (CRISPR/Cas9) システムを利用したゲノム編集技術が登場した。本システムは、ゲノム上の標的配列を認識するsgRNAとCas9ヌクレアーゼによりDNA二本鎖切断を誘導するため、sgRNA内の標的DNAを認識する20塩基を入れ替えるだけで、簡便・迅速にインデル変異を導入できる。さらに、一本鎖オリゴヌクレオチド (ssODN) や二本鎖DNAを鋳型とした相同組換えと組み合わせることで、様々な変異のノックイン (KI) も可能となった。このようにCRISPR/Cas9システムによるゲノム編集は、これまで遺伝子改変マウス作製に要していた時間・労力・コストを大幅に削減し、実験動物を用いた生命科学研究の発展を加速させるツールとして期待されている。

大阪大学微生物病研究所遺伝子機能解析分野では、受精卵の前核へCas9ヌクレアーゼとsgRNAを発現するプラスミドを注入するだけで、産仔の約50%の効率で変異マウスが得られることを報告している。本法を用いれば、コンストラクト作製から最短1か月で遺伝子改変マウスを得ることができ、迅速かつ効率的な遺伝子機能解析が実現すると考えた。

本研究では、テーマ1として、男性不妊の原因となり得る遺伝子のスクリーニングを試みた。マウスの精巣で特異的もしくは強く発現する8遺伝子を選出し、CRISPR/Cas9システムを用いてマウス受精卵でゲノム編集を行ったところ、全ての遺伝子について、フレームシフト変異を持つマウスが得られた。交配によりKOマウスを作製し交配試験を行った結果、7遺伝子のKOマウスからは野生型と同程度の産仔が得られ、雄の妊孕性に必須ではないことがわかった。一方、残る1遺伝子のKOマウスからは産仔が得られず、生殖機能に必須な遺伝子を見つけることができた。さらに詳細な表現型解析を実施したところ、当遺伝子は減数分裂期に必須であることがわかった。

一方、CRISPR/Cas9システムを用いた受精卵のゲノム編集では、新たな問題点が見えてきた。ひとつは、ファウンダー世代で頻繁に見られるモザイシズムである。CAS9/sgRNAコンプレックスによるDNA切断が卵割後に起こると、割球ごとに異なる変異が導入され、1匹のマウス個体に複数の遺伝子型の細胞が存在するモザイク状態になる。このようなモザイク個体では、望んだ変異の細胞が生殖系列に寄与せず、系統を確立できない場合がある。次世代が得られたとしても、ホモ変異個体を得るまでに複数回交配を重ねる必要があり、従来の方法と同程度の時間が必要となる。さらに、標的遺伝子によって変異導入効率が異なることや、領域欠損やKIなどの複雑なゲノム編集は全体的に効率が良くないこともわかってきた。

そこで、テーマ2として、CRISPR/Cas9システムと胚性幹 (ES) 細胞を組み合わせ、個体レベルでの遺伝子解析システムの開発を試みた。sgRNA/Cas9発現ベクターのES細胞への導入法や選択方法などの条件を最適化することに加え、長領域欠損や長鎖KIなどの複雑なゲノム編集効率を検討した。その結果、受精卵法ではインデル変異が得られなかったsgRNA配列を用いた場合でも、ES細胞法では高頻度で変異クローンを得ることができた。同様に、複雑なゲノム編集効率に関しても、ES細胞を用いることで効率良く得られることを見出した。さらにES細胞では目的変異を持つクローンだけを選別できること、高頻度で両アレルに変異が導入されることを利用して、キメラマウスを用いた一世代での迅速な遺伝子機能解析法の開発に取り組んだ。まず精子形成に関与することが知られている*Cetn1*遺伝子について、GFPでラベルしたES細胞から両アレルにインデル変異を有するKO-ES細胞クローンを樹立し、キメラマウスを作製した。キ

メラマウス内のGFP陽性精子を観察したところ、過去に報告された*Cetn1*-KOマウスの表現型と一致する頭部奇形を示した。次に、KOすると水頭症のため性成熟前に致死となる*Dnajb13*遺伝子について、KO-ES細胞からキメラマウスを作製した。すると、キメラマウスが体内に持つ野生型細胞によって水頭症の症状が改善され、長期生存を実現できた。さらにキメラマウスのGFP陽性精子を観察したところ、精子鞭毛に異常が見られたため、*Dnajb13*が精子形成にも必須であることを示せた。

本研究で確立した、受精卵やES細胞を用いた効率的な表現型解析法や目的変異の導入法遺伝子改変法や表現型解析法は、必須遺伝子のスクリーニングだけでなく、致死性遺伝子を含めた個体レベルの迅速遺伝子機能解析ツールとして、幅広く生命科学の発展に資すると考える。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (大 字 亜 沙 美)	
論文審査担当者	(職) 氏 名 教授 伊川 正人
	主 査 副 査 教授 辻川 和丈
	副 査 教授 水口 裕之
論文審査の結果の要旨	
<p>本研究は、CRISPR/Cas9システムを利用してマウス受精卵やES細胞のゲノム編集を行い、遺伝子改変マウスを作製して標的遺伝子の機能解析を試みたものである。</p> <p>I. 精巣で強く発現する8遺伝子を破壊 (KO) し、表現型解析を行ったところ、7遺伝子のKO雄マウスは妊孕性を有した。このことから、各臓器における遺伝子発現の特異性だけでは、単独で機能する遺伝子をスクリーニングできず、マウス個体レベルの表現型スクリーニングが必要であることを示した。</p> <p>II. MTL5欠損マウスの精巣では、減数分裂期に精子形成が停止する精子形成不全が認められたことから、MTL5は減数分裂に関与するタンパク質であり、正常な精子形成に必須であることを見出した。</p> <p>III. マウスES細胞におけるCRISPR/Cas9システムを用いた変異導入効率は極めて高く、長領域欠損やノックインのような複雑な変異も効率的に導入できることを示した。</p> <p>IV. GFPを発現するES細胞を用いてゲノム編集を行い、両アレルに変異が導入されたKO-ES細胞からキメラマウスを作製した。キメラマウスのGFP陽性細胞に注目することで、経世代を介さない、迅速な遺伝子機能解析法を確立した。</p> <p>以上、本論文は、CRISPR/Cas9システムをマウス受精卵やES細胞に適用し、遺伝子機能解析を効率化したことにより、学位に値するものと認める。</p>	