

## 報告

# エレクトロポレーション法を用いたマウス受精卵のゲノム編集技術の確立

岩田悟<sup>1, 2, 3)</sup>、仲臺瞳<sup>2)</sup>、上瀬茉美<sup>2)</sup>、長原美樹<sup>1)</sup>、岩本隆司<sup>1, 2)</sup>

中部大学実験動物教育研究センター<sup>1)</sup>、中部大学生命健康科学部生命医科学科<sup>2)</sup>、中部大学応用生物学部<sup>3)</sup>

## 1. はじめに

本学の実験動物教育研究センター（以下、動物センター）は 2006 年 4 月に設立されて以来、実験動物学研究の支援機関としての役割を果たすことを目的に運営されてきた。微生物モニタリング検査や定期的な施設メンテナンス、実験動物の教育活動など利用者が快適に利用できる施設となることを目指している。また、前年度はマウス系統の凍結保存サービス<sup>1)</sup>を確立するなど、より一層の研究支援体制の強化に努めている。動物センターでは、さらなる利用者の研究の向上を図るため、マウス受精卵におけるゲノム編集技術の確立を目指し研究を行った。

ゲノム編集とは、人工ヌクレアーゼを用いて任意のゲノム配列に indel 変異や一塩基置換、レポーター遺伝子のノックインなどを誘導する技術である。人工ヌクレアーゼにより標的配列特異的な二本鎖 DNA 切断を引き起こし、それに続く DNA 修復機構（非相同末端結合や相同組換え等）によってゲノムの改変を行う。ゲノム編集には、1996 年に初めて報告されたゲノム編集技術である ZFN<sup>2)</sup>、2010 年に報告された TALEN<sup>3)</sup>、そして 2012 年に報告された CRISPR/Cas9<sup>4)</sup>がある。CRISPR/Cas9 は、標的配列を決める guide RNA (gRNA) と Cas9 nuclease を発現させるだけで標的の DNA 配列を切断、破壊ができる。煩雑なベクター構築が必要であった ZFN や TALEN と比較して作製が簡便でありコストもかからなくなったことで、瞬刻間に世界中に拡大した。しかしながら、マウス受精卵への CRISPR/Cas9 システム導入には熟練した技術と高価な設備が必要なマイクロインジェクション法を用いて行う必要があったため処理時間が多くかかり、作業によっては胚生存率が低くなるなど課題もあった。そんな中、簡便かつ短時間で高効率なゲノム編集マウス作製法である TAKE 法 (Technique for Animal Knockout

system by Electroporation) を用いたゲノム編集技術が開発された<sup>5)</sup>。TAKE 法とは、エレクトロポレーション（電気穿孔）により細胞に微小な穴を開けることで受精卵内に核酸を導入し、遺伝子改変動物を作製する方法である。本手法では、電極バスタブ内に受精卵を 20 個～150 個入れてエレクトロポレーションを行うことで、一度に大量の受精卵を短時間かつ高効率でゲノム編集を行うことが可能である。

本稿では、動物センターにおいて 2017 年度に立ち上げたゲノム編集技術 TAKE 法について報告する。さらに、より計画的な胚操作を行うべくエレクトロポレーション後に凍結保存したマウス胚の遺伝子改変効率についても報告する。

## 2. 材料および方法

### 1) 供試動物

- B6D2F1 (C57BL/6N×DBA/2) 雌 4 週齢（採卵用）、C57BL/6N 雄 8 週齢（採精用）、ICR 雌 8 週齢（卵管移植用）、ICR 雄 8 週齢（精管結紮用）（日本エスエルシー）

### 2) 使用試薬

- 試薬ホルモン類：妊馬血清性腺刺激ホルモン PMSG、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン hCG
- 試薬培地類：TYH (LSI メディエンス)、KSOM (九動)、流動パラフィン (ナカライテスク) 1M DMSO、DAP213、0.25M Sucrose (九動)
- 試薬麻酔類：麻酔薬 (3 種混合; ドミトール (日本全薬工業)、ミダゾラム「サンド」 (サンド)、ベトルファール (Meiji Seika ファルマ))
- ゲノム編集試薬類：Alt-R® S.p. Cas9 Nuclease 3NLS、Alt-R® crRNA (Tyr: 5'-GGGTGGATGACCGTGAGTCC-3')、Alt-R®

tracrRNA (Integrated DNA Technologies)、  
Opti-Mem (Thermo Fisher Scientific)

### 3) 使用器具

- ・ 解剖セット: ハサミ (大、小)、ピンセット (中、尖鋭)、マイクロ剪刀、動脈クレンメ、オートクリップ、縫合針、縫合糸 (夏目製作所)
- ・ 器具類: ガラスキャピラリー、胚凍結用チューブ、オートピペッター (P-20, 200, 1000)、ディスポフィルター、凍結保存用ケーン
- ・ 装置類: ホットプレート、実体顕微鏡、エレクトロポレーター NEPA21 (図 1)、MS 白金プレート電極 5mm gap (図 2)



図 1. エレクトロポレーター NEPA21

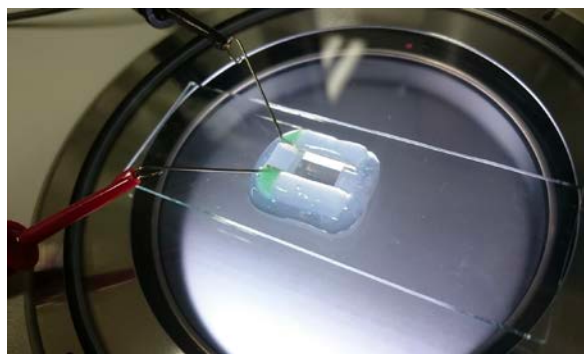


図 2. MS 白金プレート電極 5mm gap

## 2) 作業手順 (方法)

### (1) 体外受精

方法は、マウス生殖工学技術マニュアル (熊本大学 生命資源研究・支援センター 資源開発分野) に沿って実施した<sup>6)</sup>。

- ① 採精: C57BL/6N 雄から精巣上体尾部を摘出し脂肪組織や血液を除去する。マイクロ剪刀で精巣上体尾部を切り、出てきた精子塊をピンセットで採取する。

精子塊を TYH 培地のドロップに入れ、精子を懸濁した後、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C、5% CO<sub>2</sub>) で 1 時間培養する。

- ② 採卵: PMSG-hCG による過排卵誘起処理した B6D2F1 雌から、hCG 投与後 16 時間後に卵管膨大部を採取する。卵管膨大部をディッシュ内の流動パラフィン中に沈め卵管膨大部をピンセットで切開し、TYH 培地のドロップに移す。

- ③ 媒精: 前培養した精子懸濁液を最終濃度が 500 精子/μL になるように未受精卵のドロップに添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。

2 時間経ったら、マウスピペットを用いて、周りの卵丘細胞や精子を取りながら、洗浄用の KSOM ドロップに移す。胚がきれいになるまで、KSOM のドロップを移動させながら洗っていく。

2~3 時間経したら、前核が 2 つ見えていることを確認する。

### (2) TAKE 法によるゲノム編集

#### ① ゲノム編集試薬の準備

crRNA と tracrRNA を Duplex Buffer で溶解する。crRNA (800 ng/μL) と tracrRNA (800 ng/μL) を 95°C で 5 分加熱する。その後、室温まで冷却し crRNA:tracrRNA gRNA complex を作製する。crRNA:tracrRNA gRNA complex (400 ng/μL) 30 μL と Cas9 Nuclease (400 ng/μL) 30 μL を加えて合計 60 μL にする。

#### ② 電極の準備

電極バスタブ内に、混合溶液 47~50 μL を入れる。余分な 10 μL は抵抗値調節用とする。

#### ③ エレクトロポレーション

受精卵を KSOM 培地から取りだし、ディッシュに入れた 1xOpti-MEM で一度洗浄する。次いで、電極バスタブ内の液中加入する。

溶液抵抗値を測定する。500  $\Omega$  (480~520) になるようゲノム編集試薬(または 1xOpti-MEM) を添加して、再度抵抗値を測定し 500  $\Omega$  (480 ~ 520) にする。

抵抗を調整したら、直ちにスタートボタンを押してエレクトロポレーションする。エレクトロポレーション処理後、受精卵を取り出し KSOM 培地へ入れ、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C、5% CO<sub>2</sub>) で翌日まで培養する。

### (3) 卵管内胚移植

エレクトロポレーションの翌日、2 細胞期へ発生した胚を数え、移植する。

- ① 偽妊娠雌マウスの作出: 外陰部が赤く腫脹(発情前期) している ICR 雌マウスを選び、精管結紮処理をした ICR 雄マウスと交配させ、翌日膣栓を確認できたものを移植に用いる。
- ② 胚移植: 麻酔の効いた偽妊娠雌マウスの背側の片側の皮膚および腹壁を切開し、卵管を体外に露出させる。卵管膨大部から 1~2 カーブ離れた卵管采側の卵管をマイクロ剪刀で切開する。切開部から卵管膨大部に向かって、胚を含むキャピラリーを挿入し、卵管膨大部に気泡が入るまでマウスピースから静かに息を吹き込む。

### (4) 胚の凍結

エレクトロポレーションの翌日、2 細胞期へ発生した胚を凍結する。

- ① 1M DMSO をフィルターで濾過しディッシュを作製する。
- ② キャピラリーにて、凍結する胚を 1M DMSO ドロップに静かに移す。オートピペッターにて、1M DMSO とともに胚を凍結用チューブの底に入れ氷上に置く。5 分後、オートピペ

ッターを用いて、冷却した DAP213 を管壁に伝わせてチューブ内に静かに添加しチューブの蓋を緩めて閉める。さらに 5 分後、液体窒素内で冷却しておいたケーンにチューブを装着し、直ちに液体窒素中に浸漬する。

### (5) 胚の融解

- ① 0.25M スクロース溶液、胚洗浄用ディッシュ (KSOM) を予め 37°C に保温する。
- ② 胚の入った凍結チューブを液体窒素から取り出し、直ちにフタを開け、チューブ内の液体窒素を捨て、室温に 30 秒間静置する。
- ③ オートピペッターで 0.25M スクロース溶液をチューブ内へ添加し、完全に保存液が溶けるまでピペッティングする。チューブの内容物をディッシュに移し、さらに 0.25M スクロース溶液でチューブ内を共洗いする。融解後直ちに内容液より胚を回収し、胚洗浄用ディッシュのドロップに静かに導入し、37°C CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 10 分間静置する。新しい KSOM で 2 回洗浄する。
- ④ 37°C CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間培養後、(3)により卵管内胚移植を行う。

### 3. 結果

エレクトロポレーション後の2細胞期胚数(%), 移植胚数、産仔数(%), 遺伝子改変率(%) を表1に示す。メラニン色素合成に関わる *Tyr* 遺伝子のノックアウトにより、28匹中26匹の産仔がF<sub>0</sub>マウスでアルビノ (*Tyr* ノックアウトマウス) となった (図3)。残りの2匹は毛色がモザイクであったが、後代F<sub>1</sub>同士を交配させたところアルビノとなった産仔が得られた (図4)。このことから、全てのF<sub>0</sub>マウスの生殖細胞系列においてゲノム編集が起こったと考えられる。

表2には、エレクトロポレーション後に2細胞期へ発生した胚を液体窒素により凍結保存を施し、1ヶ月後に融解し卵管移植に供試した結果を示した。この凍結胚を用いたマウスの産仔数は19%であり、遺伝子改変率は75%であった。本実験において凍結保存操作を行った胚でも、産仔発生や遺伝子改変効率に低下は見られたもののゲノム編集は問題なく起こった。胚移植の受容雌である偽妊娠雌マウスの作出には発情前期の雌を見分ける習熟した技術を要する。今回のようにエレクトロポレーション後の胚を凍結保存することで、作出した偽妊娠雌マウスの必要数のみ融解した胚を用いた移植ができるので、計画的な胚操作が可能になると考えられる。

| 受精卵の個数 | 2細胞期胚数 (%)      | 移植胚数 | 産仔数 (%)       | 遺伝子改変率 KO (%) |
|--------|-----------------|------|---------------|---------------|
| 156    | 148/156 (94.9%) | 81   | 28/81 (34.6%) | 26/28 (92.9%) |

表1. TAKE 法によるゲノム編集の結果



図3. TAKE 法により作製された *Tyr* を標的とした遺伝子改変マウス。



図4. F<sub>0</sub>の *Tyr* モザイクマウスの後代F<sub>1</sub>同士を交配して得られた産仔。

| 融解数 | 正常胚数 (%)      | 移植胚数 | 産仔数 (%)    | 遺伝子改変率 KO (%) |
|-----|---------------|------|------------|---------------|
| 58  | 42/58 (72.4%) | 42   | 8/42 (19%) | 6/8 (75%)     |

表2. エレクトロポレーション後に凍結した胚におけるゲノム編集の結果

### 4. 今後について

今回、TAKE 法を用いることで、簡便かつ高効率でマウスのゲノム編集に成功した。また、エレクトロポレーション後に凍結保存した胚においてもゲノム編集が起きた産仔が得られた。今後は、転座や逆位、欠失、重複など高度な染色体改変を高効率で起こす技術の確立により、幅広い遺伝子改変動物の作製が可能な技術基盤を構築していく。

また、TAKE 法を用いたゲノム編集技術を立ち上げることができたが、本手法は採卵・移植など習熟した胚操作技術を要する。そこで、採卵・移植のステップが不要で生体のままゲノム編集が可能な GONAD 法 (Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery)<sup>7)</sup>のセットアップを現在行っている。これまで TAKE 法と同様に Tyr を標的にゲノム編集を行なったところアルビノの表現型を示す産仔が得られている。しかしながら、TAKE 法と比較して遺伝子改変率が高くなかったため、さらなる効率向上を目指して条件検討をしていきたいと考える。

国内外の大学や研究機関、企業では、ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変動物の作製部門を相次いで立ち上げている。本学の動物センターにおいても、ゲノム編集動物の作製支援を行う体制を整備することで医学・生命科学研究の発展に貢献していきたい。

## 謝辞

本研究は中部大学 2017 年度特別研究費助成により実施した。

## 引用文献

- 1) 上瀬菜美, 他. "実験動物教育研究センターにおけるマウス系統の凍結保存サービスの確立" 中部大学生命健康科学研究所紀要 13 (2016): 89-93.
- 2) Kim, Yang-Gyun, Jooyeun Cha, and Srinivasan Chandrasegaran. "Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93.3 (1996): 1156-1160.
- 3) Talens, Rudolf P., et al. "Variation, patterns, and temporal stability of DNA methylation: considerations for epigenetic epidemiology." *The FASEB Journal* 24.9 (2010): 3135-3144.
- 4) Jinek, Martin, et al. "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." *science* (2012): 1225829.
- 5) Kaneko, Takehito, et al. "Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos." *Scientific reports* 4 (2014): 6382.
- 6) 中瀬直己, "マウス生殖工学技術マニュアル" 熊本大学 生命資源研究・支援センター 資源開発分野 (2013).
- 7) Takahashi, Gou, et al. "GONAD: Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery system: a novel microinjection independent genome engineering method in mice." *Scientific reports* 5 (2015): 11406.

**Title:** The establishment of genome editing in mouse zygotes by electroporation.

**Authors:** Satoru Iwata<sup>1,2,3)</sup>, Hitomi Nakadai<sup>2)</sup>, Mami Jose<sup>1)</sup>, Miki Nagahara<sup>1)</sup> and Takashi Iwamoto<sup>1,2)</sup>

**Addresses:** <sup>1)</sup>The Center for Education in Laboratory Animal Research, <sup>2)</sup>Department of Biomedical Sciences, College of Life and Health Sciences, <sup>3)</sup>College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan.

**Keywords:** genome editing, CRISPR/Cas9, electroporation