

論文内容要旨

遺伝子組換えブタを効率的かつ安定的に生産する  
遺伝子組換え技術開発に資する研究

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

山下 司 朗

指導教員

種村 健太郎 教授

## 第1章 緒論

## 第2章 ブタ受精卵への CRISPR/Cas9 導入による遺伝子組換え胚作出と Trex2 共導入によるモザイク胚低減

## 第3章 TEX101 プロモーターおよび部位特異的組換えシステムを用いた 精子形成過程特異的遺伝子組換え技術の確立

## 第4章 総括

## 第1章 緒論

ブタはヒトと臓器サイズなどの解剖学的類似点や生理学的機能、遺伝学的な近さから実験動物として需要が高まってきている(Walters and Prather 2013)。これまでにヒト疾患研究を目的とし、遺伝子組換えにより癌(Sieren et al. 2014)や免疫不全(Ito et al. 2014)等になる遺伝子組換えブタが開発されてきたが、遺伝子組換え細胞を用いた核移植という非常に高度な技術が必要であったため、その作出効率は非常に低い状況にあった。

近年、ゲノム編集技術により任意の遺伝子配列を改変することのできるCRISPR/Cas9(Jinek et al. 2012)などを受精卵へマイクロインジェクションにより注入することで、様々な生物において簡便に遺伝子組換え動物を作出できることが示されている(H. Wang et al. 2013)。また、エレクトロポレーションを利用し、より簡便に導入する方法も開発されている(Kaneko et al. 2014)。これらの技術により効率よく遺伝子組換えブタが作出できるようになってきているが(Tanihara et al. 2016)、十分な遺伝子変異が導入されないことや変異パターンが異なる複数の遺伝子組換え細胞から構成されるモザイク個体となる等の問題が残っている。

また、遺伝子組換えにより作出されたヒト疾患モデル動物は症状が強く現れるために長期間飼育することが難しく、遺伝子組換え動物同士の交配による繁殖は困難である。一方、マウスにおいては生殖細胞特異的プロモーターを利用した遺伝子組換えによる表現型を示さない個体から特定遺伝子を欠損した精子を作るコンディショナルノックアウト(CKO)個体が作出されており(Lei et al. 2010)、ヒト疾患モデル動物のように維持、繁殖が難しい個体を安定生産する試みが行われている。

本研究においては遺伝子組換えブタの生産性向上を目指し、ブタ受精卵でのゲノム編集におけるモザイク胚低減、遺伝子組換えブタの交配による安定生産を目指しブタにおける精子特異的発現因子であるTEX101の発現解析およびTEX101プロモーターを利用した精子形成過程CKOブタ作出に取り組んだ。

## 第2章 ブタ受精卵へのCRISPR/Cas9導入による遺伝子組換え胚作出とTrex2共導入によるモザイク胚低減

### 【緒言】

受精卵でのゲノム編集により効率よく遺伝子組換え個体を得られることが報告されているが、導入される変異パターンの異なる複数の遺伝子組換え細胞集団が混ざり合うモザイクが生じることが知られている(Lamas-Toranzo et al. 2018)。マウスにおいてはCRISPR/Cas9導入時期やCas9をタンパク質で導入することでモザイク変異の問題をある程度解決できているが(Hashimoto et al. 2016)、ブタを含む大型動物

では高頻度でモザイクとなり、未だに大きな問題となっている (Lamas-Toranzo et al. 2018)。

モザイク変異を避けるためには DNA 複製前の 1 細胞期胚において CRISPR/Cas9 による DNA 切断が行われるだけではなく、DNA 切断後の遺伝子修復でエラーが起こることが重要である (Hsu, Lander, and Zhang 2014)。また、Exonuclease はゲノム編集ツールにより切断された DNA 末端を削り取ることでゲノム編集効率を向上させると考えられており、マウス由来 Trex2 (mTrex2) が最もゲノム編集効率を向上させる因子として同定されている (Certo et al. 2012)。そこで本研究では、早期に遺伝子変異を導入し、モザイク変異を軽減させることを目的として、ブタ受精卵内への CRISPR/Cas9 と mTrex2 mRNA 共導入による効果を検討した。

### 【材料と方法】

食肉処理施設にて採取したブタ卵巣より未成熟卵子を取り出し、体外成熟、体外受精 (IVF) によってブタ受精卵を得た。得られた受精卵を Cas9 タンパク、sgRNA および mTrex2 mRNA を懸濁した OptiMEM 培地に入れ、エレクトロポレーション法により導入を行った。体外培養を実施し、IVF 後 6 日で得られた胚盤胞期胚の発生率、直径を観察した。変異導入効率ならびにモザイク変異は、胚盤胞期胚より得られた DNA を用いた PCR 反応により CRISPR/Cas9 標的領域を増幅後、サンガーシーケンスによる波形データ取得、TIDE ソフトウェア (Brinkman et al. 2014) を用いて検討した。

### 【結果と考察】

ブタ受精卵に CRISPR/Cas9 および mTrex2 mRNA を導入した結果、様々な変異を持つ胚盤胞期胚が得られ (図 1、3、4)、mTrex2 mRNA 共導入による胚盤胞発生率への影響は認められなかった (表 1)。加えて、得られた胚盤胞期胚の直径および形態はエレクトロポレーションを行っていないコントロール胚と比べて差は認められなかった (図 2、表 2)。このことは同条件で作出した受精卵を受胎ブタに移植することで個体を得られる可能性が高いことを示す。遺伝子変異解析の結果、CRISPR/Cas9 と mTrex2 mRNA を共導入することでモザイク胚の発生を抑制し、非モザイク胚を効率よく得られることが示された (図 4、表 1)。また、最大で 7 種のアレルを持つモザイク胚が観察され、少なくとも 4 細胞期胚まで CRISPR/Cas9 による変異が導入されていることが明らかとなった (図 3A)。

### 【小括】

ブタ受精卵へ CRISPR/Cas9 をエレクトロポレーション法により導入することで遺伝子組換え胚が高効率で得られ、さらに mTrex2 mRNA を共導入することでモザイク胚発生を抑制し、非モザイク胚が効率よく作出できることが明らかとなった。

### 第3章 TEX101 プロモーターおよび部位特異的組換えシステムを用いた 精子形成過程特異的遺伝子組換え技術の確立

#### 【緒言】

遺伝子組換えにより作出されたヒト疾患モデルブタは症状が強く現れるために長期間飼育することが難しく、繁殖に供するまで個体の維持が困難であることが多い。一方、マウスにおいては生殖細胞特異的プロモーターを利用した複数のCKOマウスが作出されており、維持、繁殖が困難である個体を安定生産する試みが行われている。特にTEX101は精子形成過程を通して長期に渡って発現し(Takayama et al. 2005)、効率よくCKOが行われることが報告されている(Lei et al. 2010)。このことからブタにおいてもTEX101プロモーター制御下で、部位特異的組換え酵素DreNを発現させることで、予め2つのrox配列で挟んだ対象遺伝子を精子形成過程特異的に除去するCKOが実施できると考えられるが、これまでブタにおけるTEX101遺伝子解析は報告されていない。

そのため本章ではNCBIのデータベースを参考にブタTEX101 mRNA配列の全長を決定するとともに、Real Time PCR法によるブタTEX101発現解析を実施した。その後、得られた配列をもとにTEX101プロモーター制御下でDreNを発現する線維芽細胞株を樹立した。

#### 【材料と方法】

解析に使用する各器官は0日齢雄子豚、0日齢雌子豚、6ヵ月齢雄豚および6ヵ月齢雌豚より摘出し、Total RNA抽出を行った。6ヵ月齢雄豚精巣total RNAを用いた5' RACE法および3' RACE法によりTEX101 mRNA全長配列を決定した。また、0日齢子豚の各器官、6ヵ月齢豚の精巣および卵巣におけるTEX101 mRNA発現解析はReal Time PCRにより実施し、PCR反応の特異性はPCR増幅産物の電気泳動により確認した。

遺伝子組換えにはメキシカンヘアレスピッグ(ミニブタ)胎仔由来初代培養線維芽細胞を使用した。ブタTEX101プロモーター制御下で橙色蛍光遺伝子クサビラオレンジ(huKO)および部位特異的組換え酵素DreNリコンビナーゼを発現するpTEX101pro huKO-2A-DreN KInベクター(KInベクター)(図11)はブタのセーフハーバー領域として知られるpH11領域にノックイン(KI)するように構築し、pH11領域は事前にCMV-EGFPユニットKIによりセーフハーバーとして有用であることを確認した。KInベクターおよびpH11領域を対象としたCRISPR/Cas9をエレクトロポレーション法により共導入し、選択培養ならびにPCRによりKI細胞株の樹立、Surveyor Assay法によるoff target検証を実施した。また、部位特異的組換えにはCre-loxPシステムと同様の働きを持つDreN-roxシステムを利用した。

## 【結果と考察】

RACE 法によりブタ TEX101 mRNA の全長配列を決定し (図 5)、データベース配列 (XM\_021094473) と比較したところ、5' UTR 配列ならびに翻訳開始点の配列が異なっていること、3' UTR 配列がポリアデニレーションにより短縮していることが確認できた (図 6)。このことから精子形成過程 CKO には本解析により明らかになった 5' UTR 配列およびプロモーターの利用が必須であることが明らかになった。また、Real Time PCR により TEX101 mRNA の発現様式を解析したところ、0 日齢子豚では精巣および卵巣でのみ TEX101 mRNA 発現が観察され、6 ヶ月齢精巣では発現が著しく向上し、6 ヶ月齢卵巣においては発現消失が認められた (図 8, 9)。この発現様式はマウス TEX101 と類似しているため (Takayama et al. 2005)、TEX101 プロモーターを利用することで精子形成過程 CKO ブタを作出できる可能性が示された。

pH11 領域へ CMV-EGFP ユニットを KI した結果、DNA 上のランダムな位置に挿入された Tg 細胞と比べて EGFP 緑色蛍光を示す細胞が多く観察され (図 10)、pH11 領域はセーフハーバーとして有用であることが確認できた。さらに CRISPR/Cas9 と KIn ベクターを共導入したところ 4 株の KI 細胞株が樹立でき (図 12)、off target 変異のないことが確認できた (図 13)。加えて、樹立した線維芽細胞において huKO の橙色蛍光は観察されなかったため、少なくとも線維芽細胞では CKO は起こらないことが確認された。

## 【小括】

ブタにおける TEX101 mRNA 配列はデータベースと 5' UTR 配列および翻訳開始点が異なっており、精子形成過程 CKO には本研究で明らかとなった配列の使用が必須であることが明らかとなった。また、ブタ TEX101 はマウス TEX101 と類似した発現様式を示していることから、TEX101 プロモーターを利用することで精子形成過程 CKO ブタを作出できる可能性が示された。

セーフハーバーとして有用な pH11 領域にブタ TEX101 プロモーター制御下で DreN と huKO を発現するユニットを KI した細胞株を樹立した。今後、この細胞を利用した核移植、胚移植操作により初代培養線維芽細胞の増殖能を回復した後、対象遺伝子を 2 つの rox 配列で挟んだ遺伝子組換え細胞を続けて樹立し、個体作出を実施することで精子形成過程 CKO ブタの作出できると考えられる。

## 第 4 章 総括

本研究では受精卵におけるゲノム編集で生じるモザイク変異、およびヒト疾患モデル遺伝子組換えブタの長期飼育と交配による増産の困難さから、安定生産が難しいという問題を解決するため、モザイク胚の低減法および精子形成過程 CKO につい

て検討した。

第2章では受精卵へCRISPR/Cas9と共にmTrex2 mRNAを共導入することでモザイク胚発生率を抑制し、非モザイク胚を効率よく得られることを示した。また、第3章ではブタにおける精巣特異的発現因子TEX101 mRNA全長配列を決定し、5' UTR配列および翻訳開始点を決定した。加えて、Real Time PCRによる発現解析を行い、ブタTEX101はマウスTEX101と類似した発現様式を示していることを明らかにした。このことはTEX101プロモーターを利用することでマウス同様に精子形成過程CKOブタが作出できる可能性を示唆している。次に、TEX101プロモーター制御下で部位特異的組換え酵素DreNを発現するユニットをブタのセーフハーバー領域であるpH11領域へKIした細胞株を樹立した。本研究では精子形成過程CKOブタ個体の作出には至らなかったが、ブタにおいてもTEX101が6ヵ月齢ブタ精巣にて非常に強く発現していることが確認されたことから、精子形成過程CKOにより特定遺伝子を除去し、交配によりヒト疾患モデル遺伝子組換えブタが生産できる可能性は高いと考えられる。

本研究により受精卵でのゲノム編集において効率よく非モザイク胚を作出できたことから遺伝子組換えブタ個体の効率的な生産、精子形成過程CKOブタ作出により交配を用いた遺伝子組換えブタの安定生産が行えるようになると期待される。

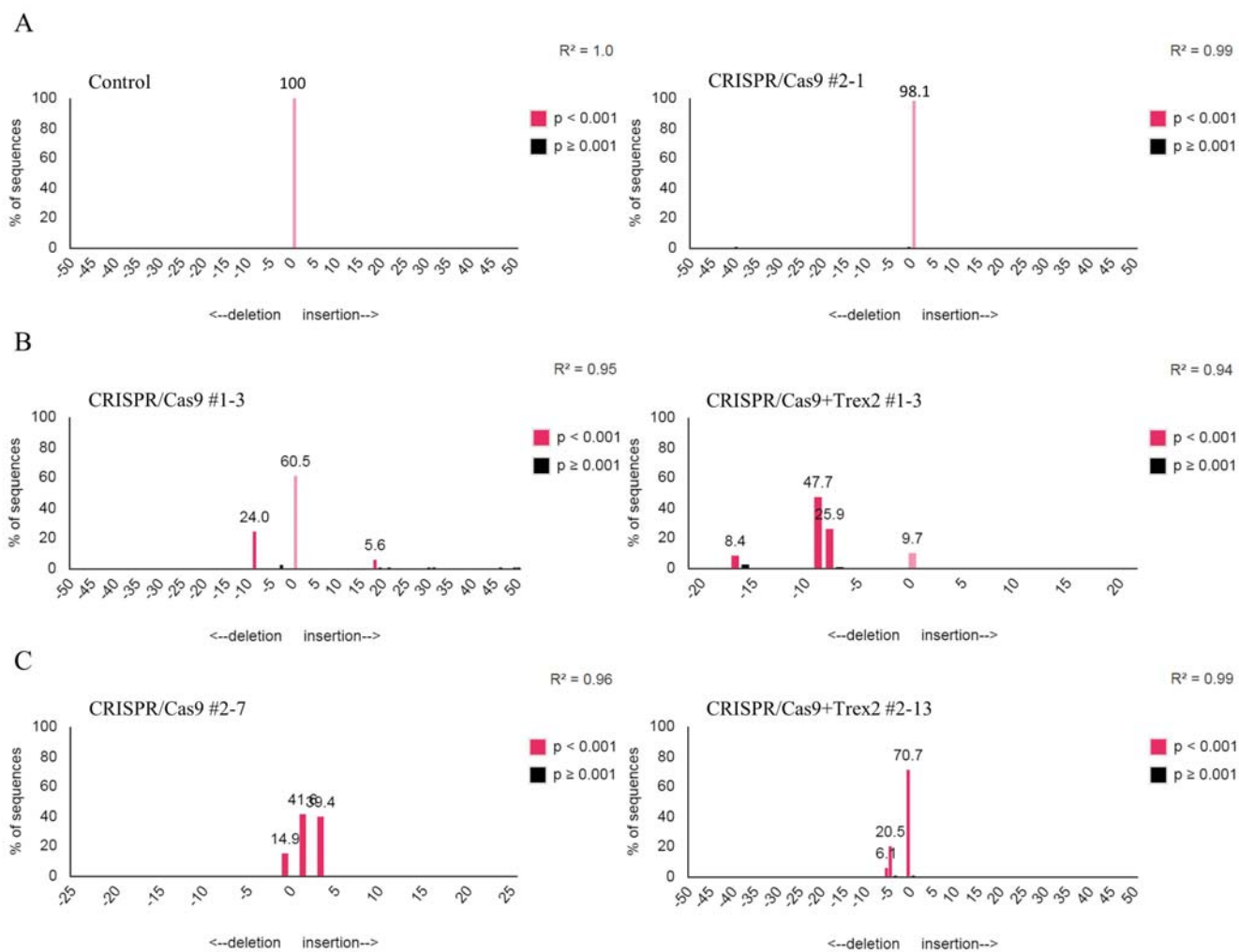


図1. TIDEソフトウェアを用いた遺伝子変異状況解析

濃ピンクバーは変異アレルを、薄ピンクバーは野生型アレルを、黒バーはノイズを示す。

- A. 野生型胚盤胞期胚
- B. 野生型アレルを含む遺伝子組換え胚盤胞期胚
- C. 野生型アレルを含まない遺伝子組換え胚盤胞期胚





図 2. IVF 後 6 日における胚盤胞期胚の形態比較  
Scale bars, 200 μm

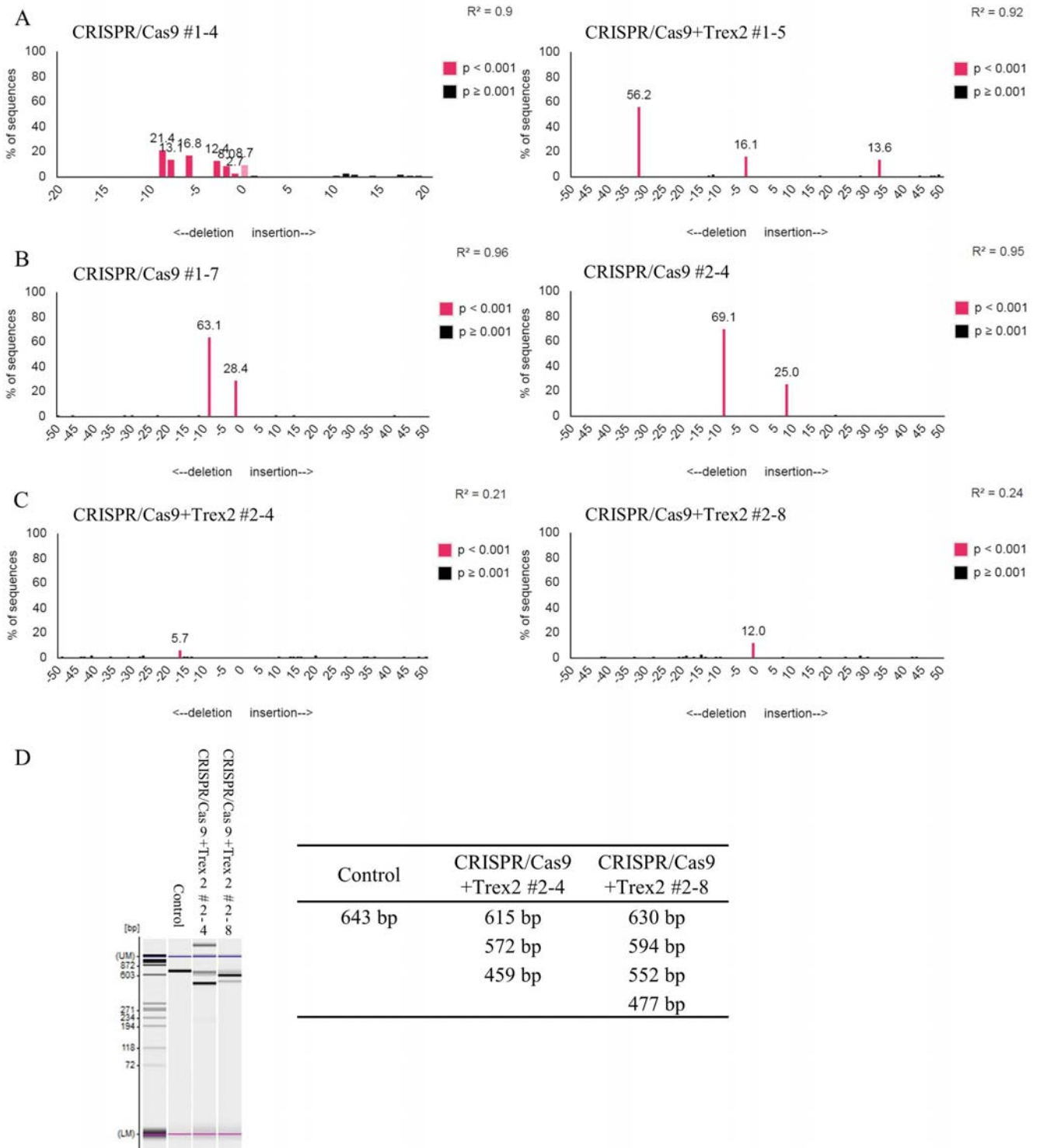


図3. TIDEソフトウェアおよび電気泳動を利用したモザイク変異胚解析

濃ピンクバーは変異アレルを、薄ピンクバーは野生型アレルを、黒バーはノイズを示す。

- A. 3種以上のアレルを持つ胚盤胞期胚
- B. 構成割合が25%以上異なる2種のアレルを持つ胚盤胞期胚
- C. 50 bp以上のindelにより  $R^2 < 0.9$ と判定された胚盤胞期胚
- D. 電気泳動による50 bp以上のindelを持つ胚盤胞期胚解析

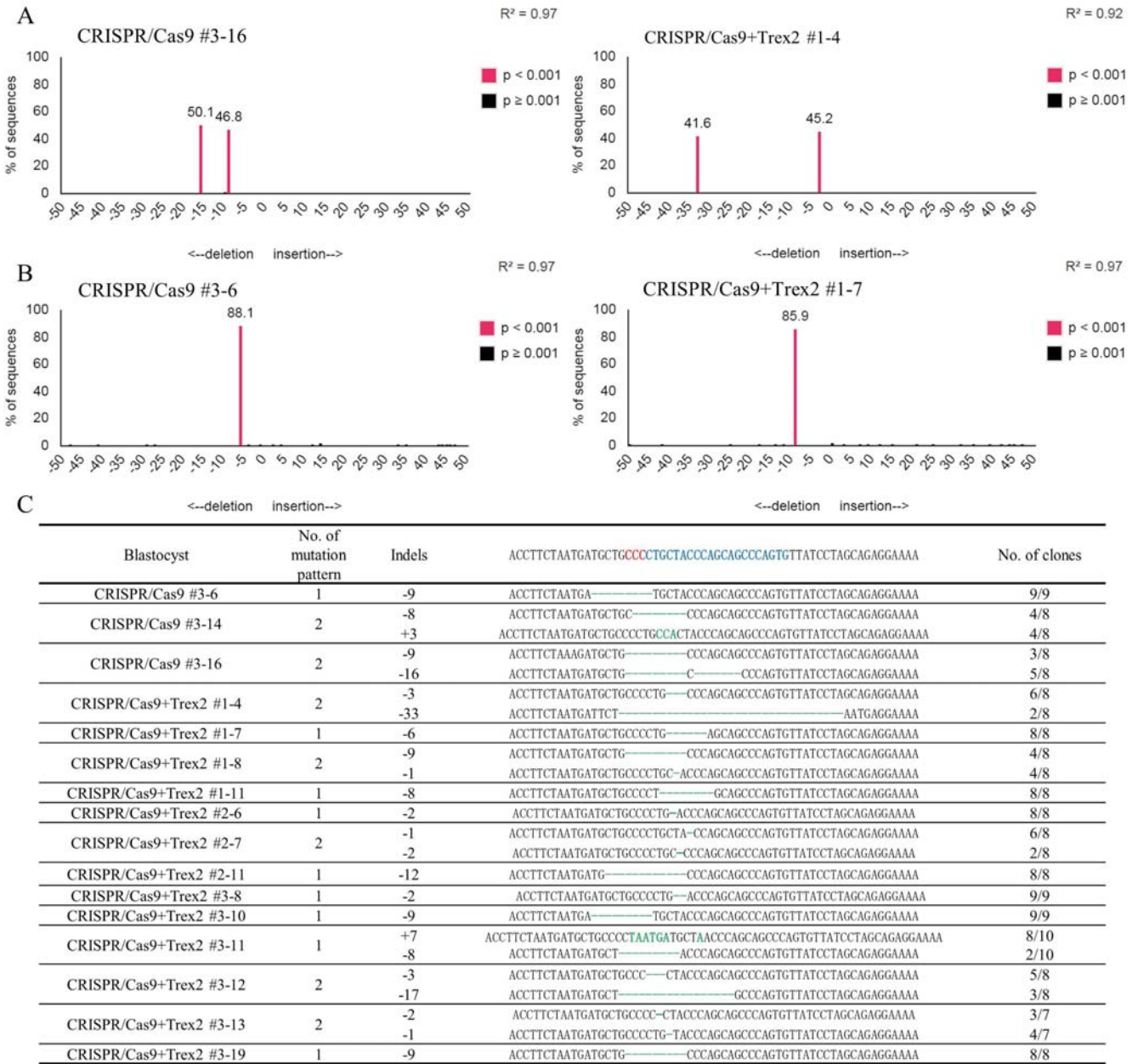


図4. TIDEソフトウェアを用いた非モザイクホモ変異胚解析

濃ピンクバーは変異アレルを、黒バーはノイズを示す。

A. 2種の異なるアレルを持つ非モザイクホモ変異胚盤胞期胚

B. 同じ配列のアレルを持つ非モザイクホモ変異胚盤胞期胚

C. CRISPR/Cas9標的配列と非モザイクホモ変異胚盤胞期胚の配列

青字 : CRISPR/Cas9標的配列、赤字 : PAM配列、緑字 : indel変異

ATGAAGATGAGGAAGCTAAAGCTCAGAAAGGAAAAGAGATGAGCTCAGGCTAAGAAGGATCTATGGATTTCTCTCACACCAA  
AAAGGCAGAGCCACTTCTCTGAGAGGGGAAGAAGCCATGGGAACCTGTCAACAACCAGCATTTGCTGTTCCCTCTTTATCCTAG  
GAGCCCCAACCTTGATCTCGGCACAAAAATTGCCTTGTCAAAGGAGTACATTCATGGGTTTAGAAAGCGATCCAATGTATAC  
ATTTAACTGGACCACAGACAATGTTGAGATTTGTGACAATGGGGCATTGTGCCAGGAAACTGTGCTAATRATCAGATCAGGA  
AGGACCGAGACAGCAATTTTGGCCACTAAGGGCTGCAGTTCAGAGGGGACACCAGCAATAACGTTTATCCAGCACTCTCCAC  
CCCCTGGCATAGTCACAATCTCTACAATAACTACTGTGATGATCCCTTTGCAACAACAGAGAGAATTTGTATGAGATATG  
GCCTGAAGCGGAGTATGAAGCTCCAGAGAGCCAGCAACCCTCCACTGCCAACCTGTGTGGCTTTGGGGAAGTGTGTTGAGT  
GCTCCTTCTCTTCCCTGTCCCAATGATACAAATCGATGCTATCAAGGAAAACCTTCAGGTCAGTGGAGGAGGCATCAACTCAC  
CTTTGGAGATCAAAGGCTGTACAGCCATAACTGGTTGCAGGATAATGTCTGGGATCTTTACAATAGGACCCCTGTGGGTGAA  
GGAAACTGTCCATTCAAGTCTCTCACTCCCCGAAAAGTCCAAAGTGGTGCCATGTGGCTTCCCACTTCATATTGGAGTTTA  
GAGCTACCGCTGCTGCTGTTACTGCCCTGCTTGTCCATTGAGGAGTGGTTTCTGGTCCCAGTTTTACTGGACACTTCTTTT  
GACTGGCCAACAGCAGATTGAGGAGCAGGTGGAGATTTGAAGAACCAAGAGTTCTTGTGGCTTGTATTTGACATTTTGAATA  
AAGCTTCTGCTGTGATTTGTAA  
AA

図 5. RACE 法により決定したブタ TEX101 mRNA 全長配列  
翻訳領域を下線で示す。  
R は A or G を表す。



```

XM_021094473      900:TTCTTTTGACTGGCCAACAGCAGATTGAGGAGCAGGTGGAGATTGAAGAACCAAGAGTT 959
pTEX101 mRNA RACE 896:TTCTTTTGACTGGCCAACAGCAGATTGAGGAGCAGGTGGAGATTGAAGAACCAAGAGTT 955
*****
XM_021094473      960:CTTGTGGCTTGATTTTGACATTTTGAATAAAGCTTCTGCTGTGATTTGTATATCGCTCAA 1019
pTEX101 mRNA RACE 956:CTTGTGGCTTGATTTTGACATTTTGAATAAAGCTTCTGCTGTGATTTGTAATAAAAAAAAAA 1015
***** *
XM_021094473      1020:GACTAGAAGTGGCATTATTGTGCTAAAGGGCCCTTAATATTCATCTTCACCCACATATTT 1079
pTEX101 mRNA RACE 1016:AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1075
* * * * *
XM_021094473      1080:TGCAGAAAGGGAATCAGAGATTCTGAAAACCTGAGTGAATTCTCACACTTACACAGCT 1139
pTEX101 mRNA RACE 1076:AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA---- 1130
* * * * *
XM_021094473      1140:ATGGGCATAGTAAGGACCAGAATTTGATATTCTGACCTAAAGTTTGGTTTTCCATTCCC 1199
pTEX101 mRNA RACE 1130:----- 1130

XM_021094473      1200:TCTAATAGGCTTCCTTCTCTGCTGGTTGGACAAGAGACTAACATTATCCTCCCCTAGAA 1259
pTEX101 mRNA RACE 1130:----- 1130

XM_021094473      1260:CACTCTTAACCCAATCATAAGGCCAGAGTCATCTGCTTTGGGGTTAATATTTCCCGGA 1319
pTEX101 mRNA RACE 1130:----- 1130

XM_021094473      1320:GGTGTGGCAGAATGAGAAAAATCAGACCCTAAGTTTTTCAACTGTAATGAATTAGAGTC 1379
pTEX101 mRNA RACE 1130:----- 1130

XM_021094473      1380:CTATTGTAATGAGTAAAGAATTTAGGGTCCCATCTTCCCCTGCTCTGTTGTCCCTTGCC 1439
pTEX101 mRNA RACE 1130:----- 1130

XM_021094473      1440:CACTTTACATCATTCCTTCCCATCTCTGTGCTACTTAATGCCTCTTTAGTGAACAGAG 1499
pTEX101 mRNA RACE 1130:----- 1130

XM_021094473      1500:GGAACCTAGGAGGATCTGGGGCTCAGTAAAGTCTGATGAATGTCAGCCTAGAACTATTG 1559
pTEX101 mRNA RACE 1130:----- 1130

XM_021094473      1560:GGTGGGGAGATTTTTTTTCTTTG 1584
pTEX101 mRNA RACE 1130:----- 1130

```

図6. ブタTEX101 mRNAデータベース配列 (XM\_021094473) とRACE法により決定したブタTEX101 mRNA配列比較  
 翻訳開始点を波線、終始コドンを下線、ポリアデニレーションシグナル配列を網掛けで示す。  
 RはA or Gを表す。

```

XP_020950132.1      1:MVEKFLVRQLTDPDQLFQNLLIEEAMGTCHNQHLLFLFILGAPTLISAQKLPQRSTFMG 60
pTEX101 Protein RACE 1:-----MGTCHNQHLLFLFILGAPTLISAQKLPQRSTFMG 35
                        *****

XP_020950132.1      61:LESDPMYTFNWTVDNVEICDNGALCQETVLIIRSGRTETAILATKGCSEGTPAITFIQH 120
pTEX101 Protein RACE 36:LESDPMYTFNWTVDNVEICDNGALCQETVLXIRSGRTETAILATKGCSEGTPAITFIQH 95
                        *****

XP_020950132.1      121:SPPPGIVTISYNNYCDDPLCNNRENLYEIWPEAEYEAPREPATLHCPTCVALGNCLSAPS 180
pTEX101 Protein RACE 96:SPPPGIVTISYNNYCDDPLCNNRENLYEIWPEAEYEAPREPATLHCPTCVALGNCLSAPS 155
                        *****

XP_020950132.1      181:LPCPNDTNRCYQGKLVGTGGINSPLKIGCTAITGCRIMSGIFTIGPLWVKETCPFKSL 240
pTEX101 Protein RACE 156:LPCPNDTNRCYQGKLVGTGGINSPLKIGCTAITGCRIMSGIFTIGPLWVKETCPFKSL 215
                        *****

XP_020950132.1      241:TPRKVQSGAMWLPTSYSWLELPLLLLLPLLVH 272
pTEX101 Protein RACE 216:TPRKVQSGAMWLPTSYSWLELPLLLLLPLLVH 247
                        *****

```

図7. ブタTEX101タンパクアミノ酸配列データベース (XP\_020950132.1) とRACE法により決定したmRNA配列より予測されるブタTEX101タンパク質アミノ酸配列比較  
XはM or Iを表す。

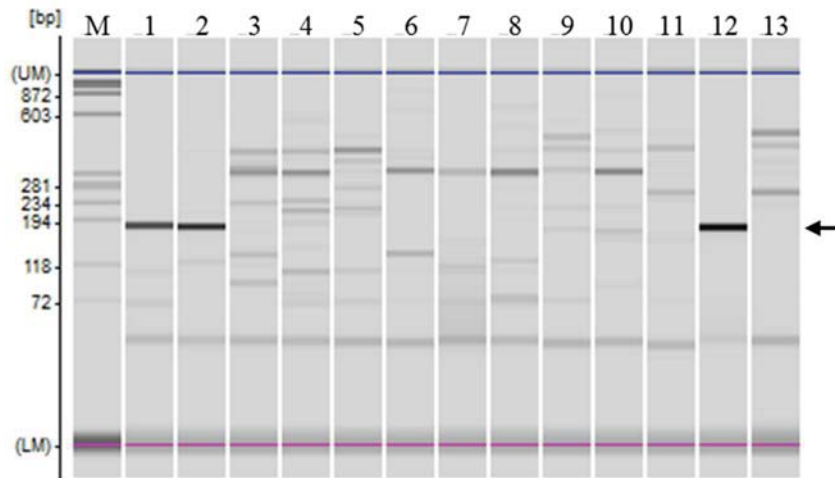


図 8. TEX101 Real Time PCR 増幅産物電気泳動像

0 日齢 : 1 精巣、2 卵巢、3 心臓、4 肺、5 脳、6 皮膚、7 肝臓、8 脾臓、9 腎臓、  
10 胸腺、11 筋肉

6 ヶ月齢 : 12 精巣、13 卵巢

標的とする TEX101 増幅バンドサイズ(182 bp)を矢印にて示す。



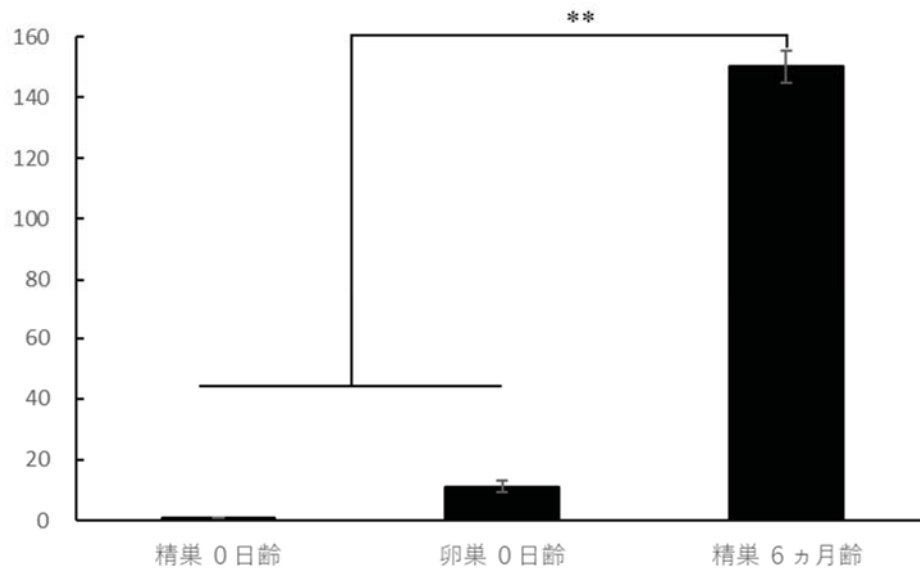
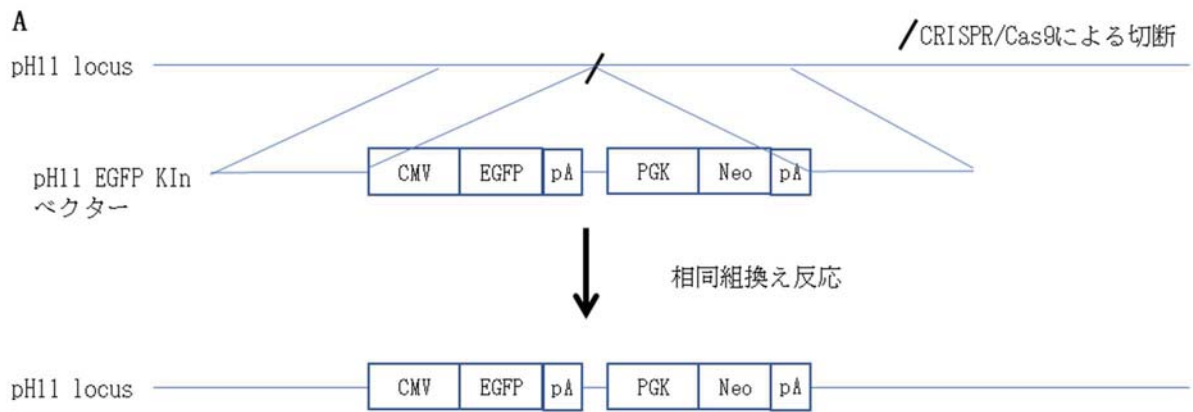


図9. Real Time PCRによるTEX101 mRNA発現量解析

the mean  $\pm$ SEM

Tukey test,  $**p < 0.01$



**B**

	KI (蛍光+/全体)	Tg (蛍光+/全体)
試験 1	2/2	9/13
試験 2	37/38	14/16
合計	39/40 (97.5%)	23/29 (79.3%)

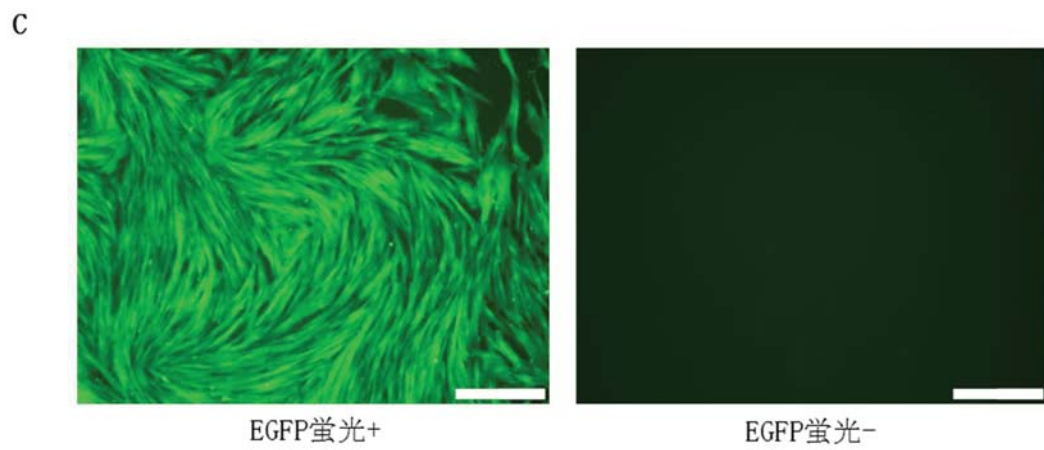


図 10. pH11 領域への CMV-EGFP ユニット KI

- A. pH11 EGFP KIn ベクター構造および遺伝子組換え反応
- B. pH11 EGFP KIn ベクター-KI および Tg による EGFP 蛍光陽性細胞割合
- C. EGFP 蛍光陽性細胞と陰性細胞

Scale bars, 400  $\mu$ m

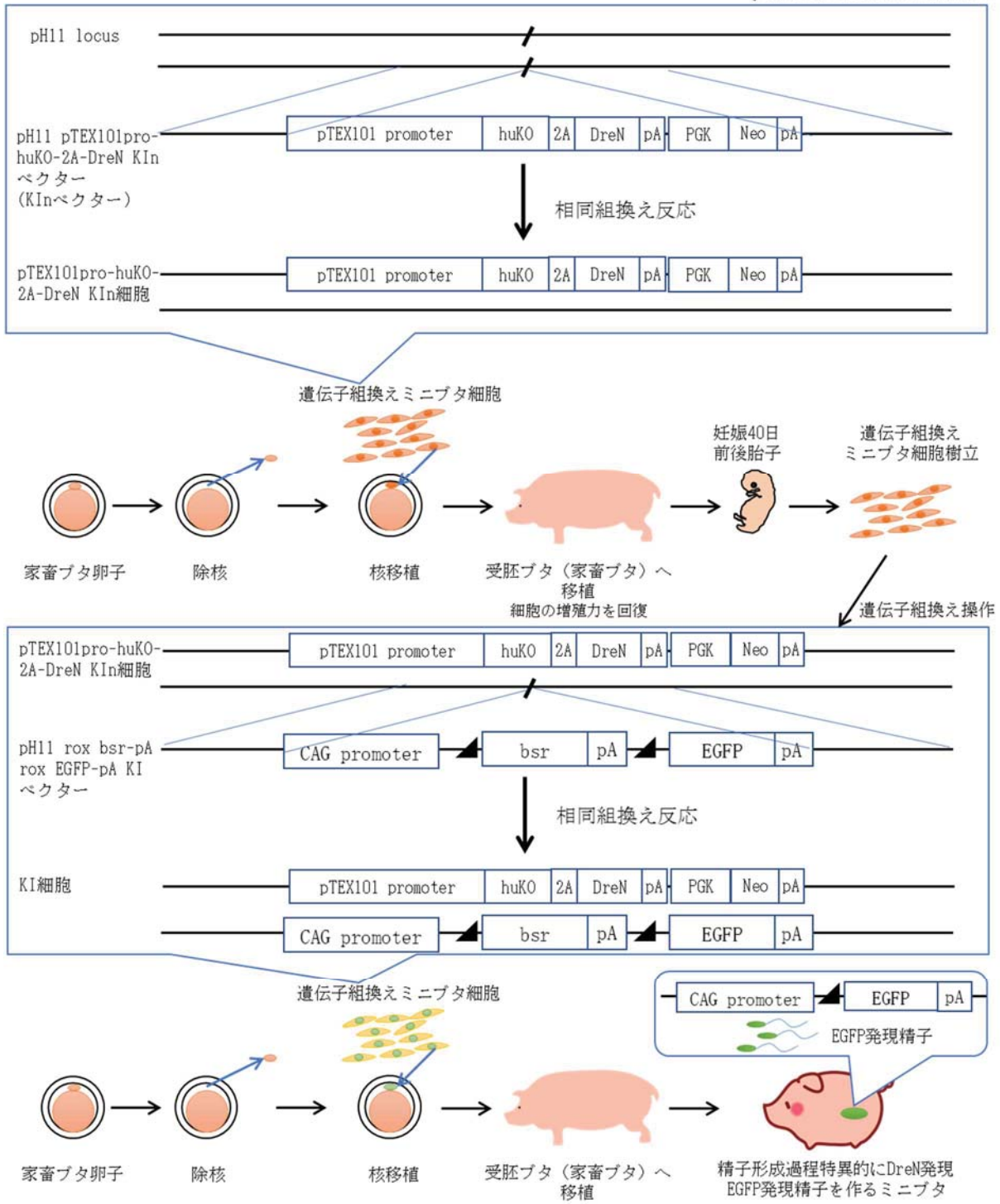


図 11. 精子形成過程特異的遺伝子組換えミニブタ作出概略および使用ベクター構造

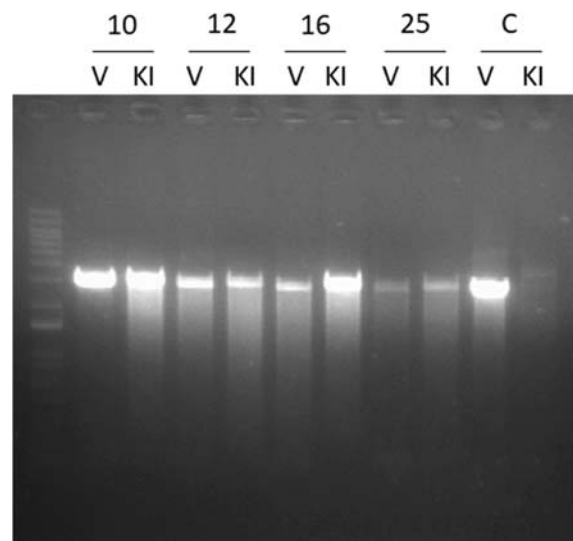


図 12. PCR による pH11 pTEX101pro huK0-2A-DreN KIn 細胞遺伝子型解析  
 C:pH11 pTEX101pro huK0-2A-DreN KIn ベクター  
 V : ベクター配列検出 PCR、KI : KI 検出 PCR

**A**

chr	strand	position	sequence	# mismatches	score	on target	gene
chr14	-1	51317236	GCACCCTGATCTAAACTTCCAGG	0	100	True	None
chr8	1	90550563	GCATCCTGATCCAAACTTCCAGG	3	1.42283105	False	None
chr5	1	98439999	CGTTCCTTATCTAAACTTCTAG	4	1.345833333	False	None
chr5	-1	98637958	CGTTCCTTATCTAAACTTCTAG	4	1.345833333	False	None
chr5	-1	89601317	CCTGCCCATCTAAACTTCCAGG	4	0.905329387	False	None
chr1	-1	3.07E+08	AAACTCTGTTCTAAACTTCCAGG	4	0.860350791	False	None
hr961	1	26777	GCATCTGTTATCTAAACTTCCAGG	4	0.838642996	False	None
chr11	-1	50083797	GCATCCTCATTTAAACTTCCAAG	4	0.807015306	False	None
chr11	-1	50298028	GCATCCTCATTTAAACTTCCAAG	4	0.807015306	False	None
chr13	-1	1.58E+08	TCACACTAATATAAACTTCCAAG	4	0.807015306	False	None
chr3	-1	1.25E+08	GAACCATGAACCTAAACTTCCAGG	4	0.797205949	False	None
chrX	-1	8055853	CTACCTTACCCTAAACTTCCAGG	4	0.792383078	False	None
chrX	-1	8149560	CTACCTTACCCTAAACTTCCAGG	4	0.792383078	False	None
chr6	1	18248049	CCTCTTTGACCTAAACTTCCAGG	4	0.781576737	False	NM_001159613
chr13	1	97783061	TCTCCCTGAACCTAAACTTCCAGG	4	0.645477617	False	None
chr1	-1	1.1E+08	CCCCTCTTATCTAAACATCCTGG	4	0.590550491	False	None
chrX	-1	1.42E+08	GCCCCCTGACCTCAACTTCCAGG	4	0.528267675	False	None
chr14	1	12431	CTACACTGACCTGAACTTCCAGG	4	0.526876011	False	None
chr14	1	161013	CTACACTGACCTGAACTTCCAGG	4	0.526876011	False	None
chr10	-1	64650628	TCACATTGCTCTAAACTTCCAAG	4	0.520512228	False	None
chr6	1	18841094	GCCTCCTGATCTAAACTTACAGG	4	0.519472711	False	None

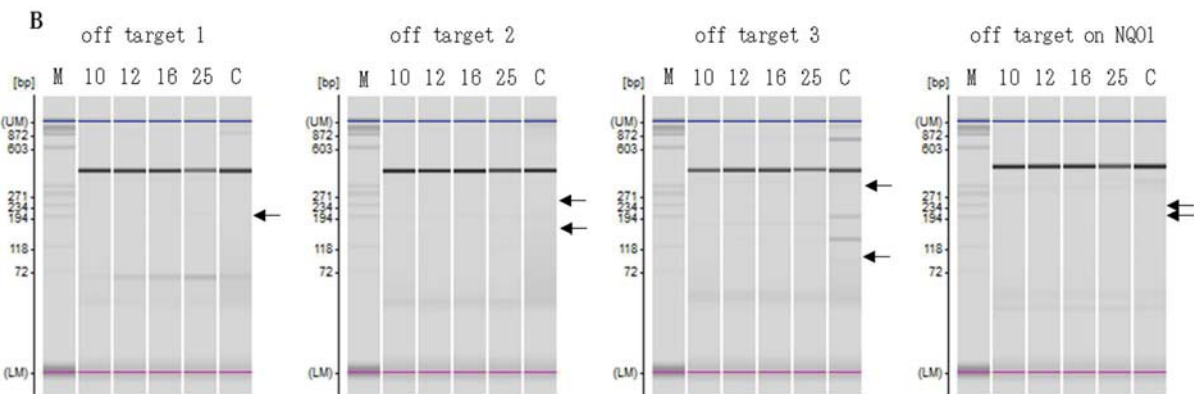


図 13. off target 候補配列および Surveyor Assay 法による off target 変異検証

A. CRISPR design tool により予測された off target 候補配列

赤 : CRISPR/Cas9 標的配列

黄 : Surveyor Assay により検証した遺伝子配列外 off target 候補配列

青 : Surveyor Assay により検証した遺伝子配列内 off target 候補配列

B. Surveyor Assay 法による off target 変異検証

off target 検出時の切断バンド位置を矢印で示す。

表1. 胚盤胞期胚発生率および遺伝子変異率

	Cas9 protein (ng/μl)	sgRNA (ng/μl)	mTrex2 mRNA (ng/μl)	No. of total zygotes	Zygotes developed to Blastocysts (%)	Wild type blastocysts (%)	Partially modified blastocysts (%)	Completely modified blastocysts (%)	Mosaic blastocysts (%)	Non-mosaic blastocysts (%)
CRISPR/Cas9	200	200	0	144	38 (25.9 ± 4.6)	1 (4.8 ± 5.5)	12 (30.8 ± 17.7)	25 (64.4 ± 15.5)	34 (92.6 ± 8.6)*	3 (5.6 ± 6.4)*
CRISPR/Cas9+Trex2	200	200	500	143	45 (31.0 ± 2.6)	0 (0.0 ± 0.0)	10 (21.2 ± 7.8)	35 (78.8 ± 7.8)	32 (70.7 ± 4.5)*	13 (29.3 ± 4.5)*

the mean ± SEM

t-test, \* $p < 0.05$

表2. IVF後6日における胚盤胞期胚直径比較

	No. of blastocyst	Diameter of blastocyst ( $\mu\text{m}$ )
Control	27	178.9 $\pm$ 9.0
CRISPR/Cas9	18	164.7 $\pm$ 10.2
CRISPR/Cas9 + Trex2	21	151.9 $\pm$ 5.1

the mean  $\pm$  SEM

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名	山下 司朗
審 査 委 員	主査：教授 種村 健太郎 副査：教授 麻生 久 教授 米山 裕
学 位 論 文 題 目	遺伝子組換えブタを効率的かつ安定的に生産する遺伝子組換え技術開発に資する研究
論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨	
<p>遺伝子組換えブタの生産には①これまで利用されてきた遺伝子組換え細胞を用いた体細胞核移植では生産効率が非常に低いこと、②免疫不全などのヒト疾患モデルブタは長期飼育することができないため交配による生産が行えない、という2つの大きな問題を抱えていた。本研究はこれら2つの問題点を解決するための新たな取り組みに関する研究成果である。</p> <p>①ゲノム編集技術を用いた受精卵における遺伝子組換えによって効率よく遺伝子組換えが行えることが期待されているが、ブタを含む大動物においては、複数種類の遺伝子組換え細胞が混ざったモザイク個体となることが知られている。このため、期待する表現型を持つファウンダー動物を得られないことが問題となっている。これまで、モザイク胚出現率低下を目的としては、いかに CRISPR/Cas9 を早い時期に導入するか注目されていたが、CRISPR/Cas9 による DNA 切断が行われてもその後の DNA 修復で元の配列に修復されてしまうことがモザイク胚出現の原因となっていると考えられてきた。そこで、本研究では CRISPR/Cas9 による DNA 切断後の DNA 修復エラーを誘発する因子である Trex2 を導入することでモザイクを減少させるという、これまでとは違ったアプローチによって一定程度解決できることを示した。</p> <p>②ヒト疾患モデルのような遺伝子組換えブタは、その形質上、長期飼育することができない場合が多く、また繁殖性も低いため、比較的弱い表現型を示すヘテロ改変オスとメスを交配させることで試験に使用するホモ改変個体を得ていたが、生産効率が非常に低いことが問題であった。そこで、精子形成過程特異的遺伝子組換え技術を確立することで遺伝子組換えによる表現型を示さない健康な個体から、遺伝子組換え精子を生産し、交配によって安定的に作る取り組みが行われている。この個体作製には複数回の遺伝子組換えと核移植操作が必要となるため、目的とする個体作製までは行えていないが、このシステムに利用する遺伝子解析によって精子形成過程特異的遺伝子組換え技術の実現可能性について示されている。遺伝子改変個体の作製は①で取り組んだ方法が容易に、早く生産することができるが、医学・薬学領域では十～数十頭規模で遺伝子組換えブタを利用するため、交配によって安定生産する仕組みは今後重要になってくると考えられる。さらなる安定生産に向けてオスだけではなくメス側の因子の探索も今後期待される。</p> <p>以上のように、本論文はゲノム編集ブタ、そしてヒト疾患モデルとしての遺伝子改変ブタの作出に向けた新知見であり、博士（農学）の学位を与えるにふさわしいものであると判定した。</p>	