

平成 31 年 2 月 27 日

報道機関 各位

## CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集による遺伝子改変マウス作製を 効率的かつ簡便に行う方法を開発

### 概要：

CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術による遺伝子改変動植物の作製は、ヒトの病気の原因解明や新薬開発、有用成分を多く含んだより良い農作物品種の作出など、さまざまな応用が可能であり、新しい産業を作り出すと期待されています。

今回、富山大学研究推進総合支援センター生命科学研究支援ユニット・助教・西園 啓文にしぞの ひろふみと生命融合科学教育部・博士課程 2 年・Mohamed Darwishモハメド ダーウィッシュらの研究グループは、ウシ胎児血清（FBS）を用いた 1 細胞期受精卵凍結法と電気穿孔法を組み合わせることで、従来のゲノム編集で問題であった作製効率を改善し、また“必要な時に素早く”作製することが可能な方法を開発しました。

この方法により、より簡単に、かつ効率的に遺伝子改変マウスが作製することができるようになり、遺伝子機能やヒトの病気原因の解明、新薬開発における薬効薬理試験など、さまざまな研究が活性化すると期待されます。

この成果は 1 月 23 日に『Journal of Neuroscience Methods』誌にオンライン掲載されました。

### 成果のポイント：

- 凍結 1 細胞期受精卵とエレクトロポレーションを用いることで、簡単に迅速なゲノム編集マウス作製法を開発しました
- 凍結受精卵を用いるため、必要な時に必要な数だけのゲノム編集マウスを作製することができます
- 凍結受精卵を用いる方法は、凍結融解後の生存率が課題となっていました。FBS 処理を行うことで凍結融解後の生存率が高いことを見出しました

#### 【本件に関する問い合わせ先】

富山大学研究推進総合支援センター生命科学先端研究支援ユニット  
助教・西園 啓文（にしぞの ひろふみ）  
〒930-0194 富山県富山市杉谷 2630 番地 TEL. 076-434-7173

## 研究成果の内容：

ゲノム編集とは、生物が持つゲノム DNA の特定の配列を認識して切断し、遺伝子の破壊や、任意の配列を挿入するなどの編集を行う技術のことです。そのなかでも近年注目を集めているのは CRISPR/Cas9 と呼ばれるゲノム編集システムで、さまざまな動物種のゲノム DNA を比較的簡単に編集することができます。研究用マウスの受精卵にゲノム編集を行い作製する遺伝子改変マウスは、遺伝子機能の解明研究だけではなく、ヒトの病気の原因解明や新薬の開発研究にも重要な研究ツールとなっています。

しかし、これまでゲノム編集技術による遺伝子改変マウスを作る際には、受精卵の前核と呼ばれる微小領域にマイクロマニピレーターという特殊な機器を使い、ガイド RNA (gRNA) と Cas9 タンパク質を注入する必要がある、この操作には高い技術が要求されるという問題点がありました。

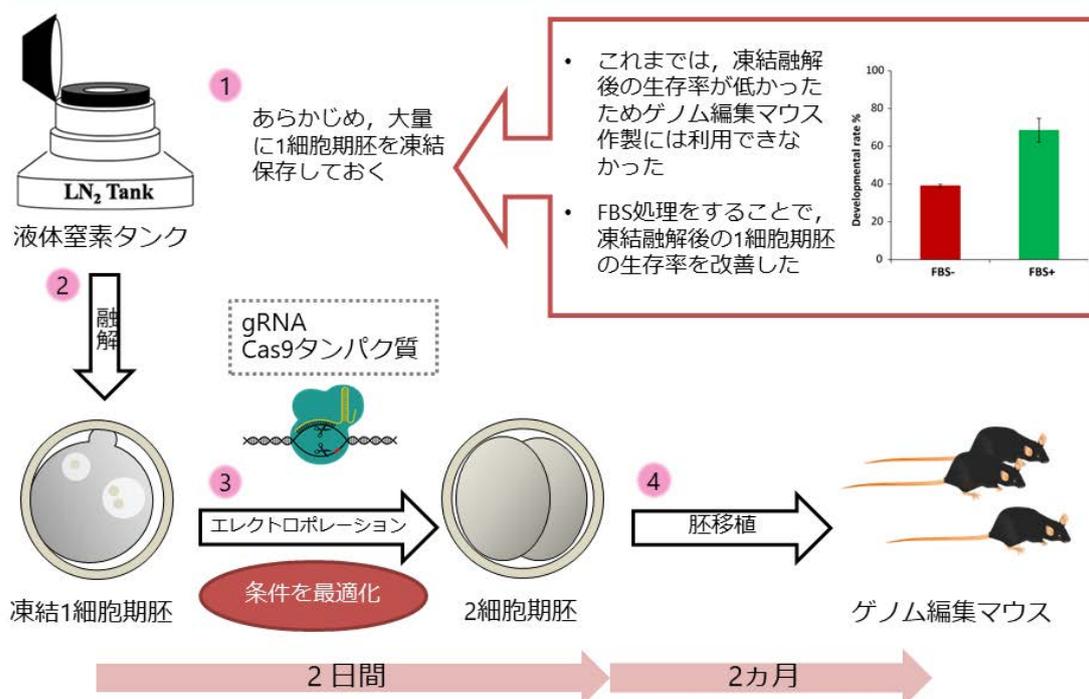
この問題については、2014 年に金子ら (Sci Rep, 2014) によって、エレクトロポレーションという方法を使うことで、マウス受精卵に簡単に素早く gRNA および Cas9 mRNA を導入できる方法が開発され、さらに橋本ら (Dev Biol, 2016) や中川ら (Exp Anim, 2018) によってさまざまな方法の改善がなされました。しかし、『広く研究に使われている C57BL/6 マウスの受精卵を、必要な時に大量にゲノム編集する技術』については、現在に至るまでそれほど改善されておらず、さらなる技術開発が必要となっていました。

始めにわれわれは、C57BL/6 マウスの受精卵をあらかじめ液体窒素で凍結保存しておくことで、必要な時に、また大量にゲノム編集マウスを作製することができるのではないかと考えました。ところが、この方法には『ゲノム編集に一般的に用いる C57BL/6 マウスの 1 細胞期胚を凍結保存すると、凍結融解後の生存率が低い』という致命的な問題がありました。

この問題について技術開発を行った結果、今回、研究チームは、ウシ胎児血清 (FBS) 含有培地で処理してから凍結保存することで、C57BL/6 マウス 1 細胞期胚でも安定的に凍結保存することができ、また融解後の生存率も高いことを見出し、この凍結 1 細胞期胚とエレクトロポレーション法を合わせて用いることで、簡単に迅速にゲノム編集マウスを作製することに成功しました (次ページ図)。

今回開発した方法により、より簡単に、かつ効率的にゲノム編集技術を用いた遺伝子改変マウスが作製できるようになり、遺伝子機能やヒトの病気原因の解明、新薬開発における薬効薬理試験など、さまざまな研究が活性化すると期待されます。

“必要な時に、必要な数だけ”ゲノム編集マウスを作る技術を開発



論文情報：

掲載誌

Journal of Neuroscience Methods

Volume 317, 1 April 2019, Pages 149-156

論文タイトル

Rapid and high-efficient generation of mutant mice using freeze-thawed embryos of the C57BL/6J strain.

URL

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165027019300159?via%3Dihub>

著者

Mohamed Darwish, Hirofumi Nishizono, Hideki Uosaki, Hitomi Sawada, Taketaro Sadahiro, Masaki Ieda, Keizo Takao