

平成27年 6月 12日

遺伝子改変マウスの簡便な作製法を開発

- ・ エレクトロポレーション法を用いて、高効率・高生存率に遺伝子改変マウスの作製を行う手法を確立
- ・ 本手法は、熟練した技術を必要とせず、簡便に目的遺伝子の改変が可能

概要

徳島大学藤井節郎記念医科学センターの竹本龍也助教と、千葉大学医学研究院の橋本昌和助教（現・大阪大学生命機能研究科）との研究グループは、エレクトロポレーション法を用いてマウス受精卵に CRISPR/Cas9 システムを導入することで、高効率・高生存率に遺伝子改変マウスの作製を行う手法を確立しました。

これまで受精卵への遺伝子導入は、熟練した技術を必要とするマイクロインジェクション法によって行われてきました。本研究で確立したエレクトロポレーション法による遺伝子導入は、熟練した技術を必要としないため、容易に目的遺伝子を改変することができます。本手法を利用することにより、生物学や医学の研究がより加速することが期待されます。

本研究成果は、平成27年6月11日に *Scientific Reports* に掲載されました。

研究の背景

医学や生物学の研究分野において、遺伝子改変マウスは重要な役割を担っています。以前は、高度な技術と、費用、期間を必要としていた遺伝子改変マウスの作製も、ゲノム編集技術が開発されたことで容易になり、作製にかかる時間も大幅に削減されました。

ゲノム編集技術は、人工制限酵素（CRISPR/Cas9 など）を細胞内で働かせ、目的の遺伝子（ゲノム）を切断することでその機能を破壊する方法です。遺伝子改変マウスの作製を行う場合、人工制限酵素を受精卵に導入する必要があります。これまでの研究の多くは、受精卵に微細なガラス管を直接差し込み、人工制限酵素をコードする RNA 遺伝子を顕微注入するマイクロインジェクション法によって行われてきました。しかしながら、マイクロインジェクション法は、高度な技術を必要とするため、遺伝子改変マウスを作製できる研究機関は限られています。また、たとえ熟練した技術を有していても、準備や操作に多くの時間を必要としています。したがって、ハイスループットに遺伝子改変マウスを作製することは困難でした。

研究の内容と成果

今回の研究では、電気パルスにより核酸を細胞へ導入する方法（エレクトロポレーション法）を用いることで、受精卵に RNA を効率的に導入する条件を見いだしました。エレクトロポレーションは、一度に 40-50 個のマウス受精卵に RNA を導入することができ、1 個ずつ遺伝子導入を行うマイクロインジェクション法と比べ非常に簡便です（図1）。

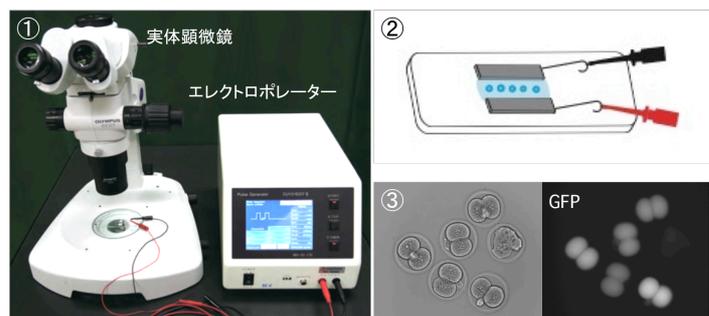


図1. ①遺伝子導入に用いた装置 ②エレクトロポレーションのチャンパー。電極間のRNA溶液にマウス受精卵を置き電気パルスをかけることでRNAが導入される。③GFP mRNAを導入した受精卵。GFPタンパクの蛍光が観察された。

この方法を用いてゲノム編集技術の1つである CRISPR/Cas9 システム (Cas9 mRNA と gRNA) を受精卵へと導入することで、高効率・高生存率に遺伝子改変マウスを作製することができました (図 2)。また、遺伝子を破壊するだけでなく、目的配列の導入や置換を行うこともできました。

本研究で確立した手法は、最も簡単に遺伝子改変マウスを作る方法です。

本研究成果の意義

- ・ エレクトロポレーションを用いる方法は熟練した技術を必要としないため、これまで遺伝子改変マウスの作製が困難であった研究機関でも行うことができます。
- ・ 一度に多くの受精卵に遺伝子導入することができるため、大幅な時間短縮が実現されます。
- ・ エレクトロポレーションを行うチャンバーの RNA 溶液を交換するだけで、複数の異なる遺伝子改変マウスを作製することができます。したがって、ハイスループットに多系統の遺伝子改変マウスを作成することができます。

論文：

Masakazu Hashimoto and Tatsuya Takemoto. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing.

Scientific Reports 5, 11315; doi: 10.1038/srep11315 (2015).

<http://www.nature.com/srep/2015/150611/srep11315/full/srep11315.html>



図2: エレクトロポレーション法によるFgf10遺伝子破壊
Cas9 mRNAとgRNAを受精卵へ導入することで、Fgf10遺伝子の破壊を行った。得られた胚の87% (34/39)は、Fgf10遺伝子ホモ変異マウスのフェノタイプと同じで、四肢が形成されなかった。

藤井節郎記念医科学センター・初期発生研究分野
竹本龍也
088-634-6412

takemoto.tatsuya@tokushima-u.ac.jp
<http://www.fujii.tokushima-u.ac.jp/embryology/>