

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト
(英語) Brain Mapping by Integrated Neurotechnologies for Disease Studies
(Brain/MINDS)

研究開発課題名： (日本語) 遺伝子操作マーモセットの作製・世代短縮のための革新的胚操作技術の開発
(英語) Innovation of embryo engineering for generating genetically-modified marmosets and enhancing breeding efficiency

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京大学・饗場 篤
所属 役職 氏名： (英語) The University of Tokyo, Atsu Aiba

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 顕微授精による繁殖の効率化と世代短縮技術の開発
開発課題名： (英語) Development of innovative technologies for genetic engineering and rapid reproduction of the marmoset

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所・小倉 淳郎
所属 役職 氏名： (英語) RIKEN, Atsuo Ogura

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発項目①ゲノム編集によるノックインマーモセットの作製技術の開発

本研究ではゲノム編集によるノックインマーモセットの作製技術の開発を行った。具体的には、*CAMKIIA* あるいは *GADI* 遺伝子座に Cre 組換え酵素、または、Safe harbor である *AAVSI* 遺伝子座にカルシウムインジケータ *GCaMP/RCaMP2* を導入したノックインマーモセットの作製を試みた。それぞれの遺伝子座について二重鎖切断効率の高い CRISPR/Cas9 あるいは platinum TALEN を作製した。*GADI* 遺伝子の 3'非翻訳領域および *AAVSI* 遺伝子座に対する CRISPR/Cas9 については、マーモセット線維芽細胞および体外受精により作製した受精卵においても、効率的に二重鎖切断を引き起こすことが確認できた。これらの実験と並行して、マウス *Grml* 遺伝子へのオリゴ DNA によるエピトープタグのノックインをモデルとして、マウス受精卵を用いてノックイン効率の上昇に向けて検討を行った。その結果、Cas9 タンパク質を crRNA および tracrRNA と共にインジェクションを行っ

た場合において、オリゴ DNA のノックイン効率が 63.0%となり、極めて高いレベルにまで引き上げることができた。さらに、TALPITCh 法あるいは 2-hit-2-oligo 法によって、マーモセット受精卵における AAVS1 遺伝子座への GCaMP/RCaMP2 ドナーのノックイン実験を試みた。継続的にインジェクションを行い、遺伝子型を解析したが、ノックイン胚を得るには至らなかった。

研究開発項目②マーモセット受精卵の凍結保存技術の開発

マーモセットの発生工学技術のセットアップを行うために、東京大学医学部内にマーモセット飼育施設を整備した。メスマーモセット個体の性周期を人工管理し、卵巣より未受精卵を採取した。オス個体より採取した精子と体外受精を行うことによって、マーモセット受精卵を定期的に作出するシステムを構築することができた。作製した受精卵は凍結保存技術の条件検討に用いるとともに、上記のゲノム編集を用いた変異胚の作製および顕微授精技術の開発に用いた。

凍結保存した 8 細胞期胚を融解した結果、割球の形状は維持されていたが、その後の胚発生を確認することができなかった。また、凍結融解胚を用いて割球除去実験を行い、割球よりゲノム DNA を抽出することに成功した。

研究開発項目③顕微授精による繁殖の効率化と世代短縮技術の開発

遺伝子改変マーモセットの世代短縮のために、マーモセットの顕微授精技術の開発を行った。「新鮮精子および精子細胞を用いた顕微授精の技術開発」では、マーモセット後期精子細胞以降に卵子活性化能を持つことをマウス未受精卵への顕微注入実験により明らかになった。さらに幼若精巣組織観察により、12 ヶ月齢で十分な数の後期精子細胞から精子が出現することを確認した。実際に 12 ヶ月齢凍結伸長精子細胞および精巣精子をマーモセット卵子に顕微注入した結果、それぞれ 8 細胞期および胚盤胞期までの発生を認めた。「幼若精細管のマウスへの移植後の精細胞発生の観察」では性成熟の早いマウスへ精巣組織を移植して精子発生の迅速化を目標としている。同種移植（マウス→マウス）により陰嚢内が最適移植部位であることを明らかにした。異種移植（ウサギ→マウス）において生体より 1 週間ほど早い円形精子細胞の発生を確認した。マーモセット→マウスでは免疫不全マウスである NOD/Scid よりさらに重度の免疫不全を示す NSG マウスがレシピエントとして最適であることを明らかにした。

研究開発項目④プロジェクトの総合的推進

分担機関の理化学研究所バイオリソースセンターとは、スカイプなどによる頻繁なディスカッションを通して、プロジェクトの方向性に関する意思決定を行った。また、必要に応じて、マーモセット卵子や精巣組織を提供することによって、プロジェクト全体の推進を図った。

マーモセット発生工学実験を遂行するうえで、岡野栄之教授（慶応義塾大学）・佐々木えりか教授（慶応義塾大学・実験動物中央研究所）・中村克樹教授（京都大学）・尾藤晴彦教授（東京大学）と密接に連携を行った。

Research 1. Generation of knock-in marmosets by genome editing

In this project, we attempted technical development to generate knock-in marmosets by genome editing. We tried to knock-in Cre recombinase into *CAMKIIA* and *GAD1* gene loci, or GCaMP/RCaMP2 Ca²⁺ indicator into *AAVS1* safe harbor. CRISPR/Cas9 or platinum TALEN was designed for each gene locus, and high efficiency of DNA double strand break was confirmed for *GAD1* and *AAVS1* loci using marmoset fibroblasts

and fertilized eggs. Meanwhile, we tried to quantify knock-in efficiency using mouse embryos. Through a trial and error process, we have succeeded to maximize knock-in efficiency (63.0%), when purified Cas9 protein was injected with crRNA/tracrRNA and donor DNA. Next, we performed knock-in experiments using marmoset embryos, in which GCaMP/RCaMP2 donor is designed to integrate AAVS1 locus. Despite repetitive injection and genotyping, knock-in embryos have not been obtained to date.

Research 2. Cryopreservation of marmoset embryos

Firstly, we have set up animal care facility and embryo engineering apparatus in The University of Tokyo. Female marmosets were introduced and habituated to our facility. Their estrous cycles were artificially controlled, and oocytes were picked up from their ovary. Obtained oocytes were *in vitro* fertilized, and fertilized eggs were routinely produced. We have cryopreserved 8-cell embryos by vitrification technique, and stored in liquid nitrogen. Frozen embryos were thawed and subjected to blastomere ablation experiments. After ablation, we succeeded in extracting genomic DNA from blastomeres for genotyping.

Research 3. Efficient production of offspring and acceleration of the generation turnover by microinsemination

This study was undertaken to develop new microinsemination (ICSI) techniques that will accelerate the generation turnover in marmosets. First, to see the stage at which marmoset spermatogenic cells acquire the oocyte-activating capacity, we injected them into mouse oocytes. The activation pattern of mouse oocytes indicated that the oocyte-activating capacity appeared at the late round spermatid stage. In prepubertal testes, these spermatids first appeared by 12 month of age. When frozen-thawed elongated spermatids and testicular spermatozoa obtained from a 12-month-old testis were injected into marmoset oocytes, they developed into the 8-cell and blastocyst stage, respectively. We also examined the possibility of early development of marmoset spermatogenic cells by transplanting immature testicular tissues into mice. We found that intra-scrotal transplantation gave the best results. In a preliminary experiment using rabbit testes, round spermatids appeared 1-week earlier than that of the normal condition. We found that marmoset testes survived in NSG mice, but not in NOD/Scid mice.

Research 4. Project management

We continuously made effort to discuss with Dr. Ogura's group (RIKEN) for smooth progress of our project. We also provided biomaterials such as eggs and sperms upon request. For conducting marmoset experiments, we have closely kept in touch with Prof. Hideyuki Okano (Keio Univ.), Prof. Erika Sasaki (Keio Univ. and Central Institute for Experimental Animals), Prof. Katsuki Nakamura (Kyoto Univ.), and Prof. Haruhiko Bito (Univ. Tokyo).

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 2 件)

1. Nakao H, Harada T, Nakao K, Kiyonari H, Inoue K, Furuta Y, Aiba A. A possible aid in targeted insertion of large DNA elements by CRISPR/Cas in mouse zygotes. *Genesis*. 2016, 54(2):65-77.
2. Ueda J, Murata Y, Bundo M, Oh-Nishi A, Kassai H, Ikegame T, Zhao Z, Jinde S, Aiba A, Suhara T, Kasai

K, Kato T, Iwamoto K. Use of human methylation arrays for epigenome research in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neurosci Res.* 2017, in press

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ゲノム編集による変異マウス作製, 口頭, 饗場篤, 第 38 回日本神経科学会 (教育講演), 2016/7/29, 国内.
2. マーモセット精子細胞を用いた顕微授精技術の開発, 口頭, 越後貫成美, 葛西秀俊, 井上弘貴, 饗場篤, 小倉淳郎, 第 109 回日本繁殖生物学会, 2016/9/13, 国内.
3. 発生工学的手法を用いたマーモセット世代短縮技術の開発, ポスター, 越後貫成美, 葛西秀俊, 井上弘貴, 饗場篤, 小倉淳郎, 第 6 回日本マーモセット研究会大会, 2016/12/13, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし