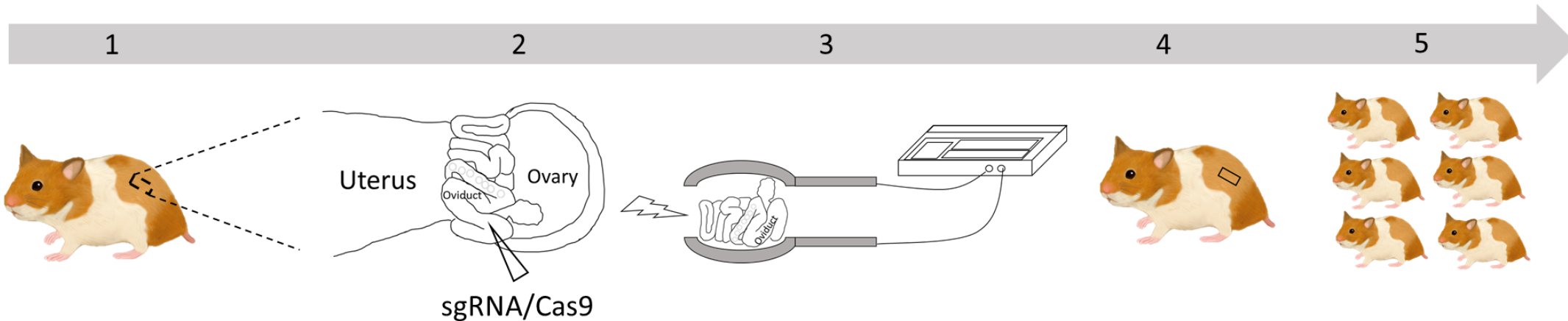


i-GONAD法による ゲノム編集動物作成法

バイオリソース研究センター
遺伝工学基盤技術室プロトコール #4

Graphical Abstract



i-GONAD法は、東海大学の大塚正人先生らが開発された、優れた *in vivo* ゲノム編集法です。受精卵の採取、体外操作、胚移植を必要としないことが大きな特長です。

本プロトコルでは、理研BRC遺伝工学基盤技術室においてルーティンで進めているゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*) を用いた*i*-GONAD法によるノックアウトハムスターの作出法について解説します。ゴールデンハムスターは、その受精卵が体外での操作に極めて脆弱なため、*i*-GONAD法がその威力を発揮する動物種の一つです ([文献1, 2](#))。

なお、マウスではオリジナルのGONAD法(Takahashi *et al.* Sci Rep 2015)でもゲノム編集が可能です。ハムスターではCas9 mRNA が透明帯を通過しないため (原因不明)、*i*-GONAD法が必須となります。

目次

- 説明
- 試薬
- 機器
- 方法
 1. 注入液および妊娠雌の用意
 2. ガラスピペットの作製
 3. sgRNA+Cas9の注入
- 補足
- 作成者

説明

目的

体外での胚操作や胚移植を介さずにゲノム編集ハムスターを作成する。

説明

受精卵を含む卵管内に直接ゲノム編集試薬を注入し、卵管ごと電気穿孔を行うことにより、ゲノム編集ハムスターが得られる。



ハムスターの尻尾は短くて持てません。まずは取り扱いに慣れましょう

試薬と機器

sgRNA	自作または外注	A29377
Cas9-protein	IDT	1081058
PBS(-)	自作または購入	
ガラスピペット(芯入り)	NARISHIGE	GD-1.2
プーラー	Sutter Instrument	P-97/IVF
エレクトロポレーター NEPA21	NEPAGENE	
Sピンセット円型白金電極	NEPAGENE	直径は動物種による (ハムスターは5Φ CUY650P5)
キムワイプ	クレシア	

方法

1. 注入液および妊娠動物の準備

- sgRNA

sgRNAの合成についてはThermo FisherのPrecision gRNA Synthesis Kitにあるプロトコルを参照。-80°Cで保存。使用直前に融解。濃度は、1つのガイドにつき1-3 μ g/ μ l必要。

- Cas9-protein

注入直前にsgRNAと混和しておく。10 μ g/ μ lのものを0.5-1 μ l使用。

- 妊娠雌の準備

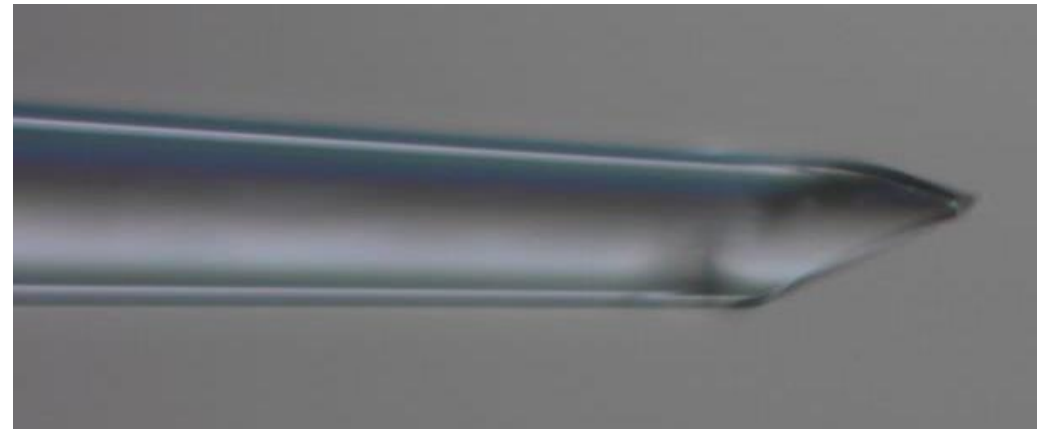
ハムスター雌は、排卵翌朝に、膣から粘性の高い分泌物(discharge)を分泌する。この分泌日をDay1としてDay4の夜に発情するので雄と同居させ交配させる。翌日(Day1)のdischarge内の精子の有無を確認し、交配成功の可否とする。

過排卵誘起をする場合は、従来の方法では、Day1の午前中にPMSG (10-40IU)を注射し、そのまま維持される性周期によって、上記同様にDay4の晩に交配を行う。交配時は、雌1匹に対し雄2匹を交配する。ケンカしてしまう場合は1対1とする。

方法

2. 卵管注入用ガラスピペットの作製

ガラスピペットをプーラーで引く。その際に先の細い部分が長くないようにする。細い部分が長いとガラスが撓んで卵管に刺しにくい。先端は注入直前にピンセットで鋭利に折る。



鋭利に折った先端

方法

3. gRNA+Cas9-proteinの注入

完全麻酔下*で卵管を出す。ガラスピペットの先端をピンセットで折った後に注入液を吸う。卵管をピンセットで摘まみながら膨大部の上部(卵巣側)からガラスピペットを刺し、注入液を静かに出す。PBS(-)に浸した四角片(卵管を覆う程度の大きさ)のキムワイプで卵管を覆い電極で卵管を挟み電気をかける**。

最初は色の付いた生食などで注入の練習をしておくが良い。

* 麻酔は、三種混合あるいはキシラジン-ケタミンで行う。キシラジンは使用期限に注意（古いと毒性が出ることがある）。

**電気穿孔の条件は[文献3](#)参照。



結果

遺伝子、gRNAの設計および数、電気穿孔条件などによって効率は異なるが、これまでに試みた8種類の遺伝子すべてにおいてノックアウト系統の作出に成功している。

- 最初の技術確立用には、Tyrosinase ノックアウトが良い。
アルビノが生まれることで確認できる。
- 目的の遺伝子の実験で、4-5腹の産子にゲノム編集個体がない場合は、gRNAの設計、注入するgRNAの濃度など条件を再検討する。最新のハムスターゲノム情報は[文献4](#)参照。
- F0個体の多くはモザイクのために、その2-3世代の交配を重ねて系統を樹立する。
- ゴールデンハムスターは性成熟が早く、妊娠期間も短い（16日）ので、順調に繁殖できれば、実験開始後4-5ヶ月でホモノックアウトを含む系統が樹立できる。



Tyrosinaseノックアウトハムスター

参考文献

1. Ohtsuka M, Sato M, Miura H, Takabayashi S, Matsuyama M, Koyano T, Arifin N, Nakamura S, Wada K & Gurumurthy CB. *i*-GONAD: a robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases. *Genome Biology*. 2018; 19, Article number: 25
2. Channabasavaiah B. Gurumurthy, Masahiro Sato, Ayaka Nakamura, Masafumi Inui, Natsuko Kawano, Md Atiqul Islam, Sanae Ogiwara, Shuji Takabayashi, Makoto Matsuyama, Shinichi Nakagawa, Hiromi Miura & Masato Ohtsuka. Creation of CRISPR-based germline-genome-engineered mice without ex vivo handling of zygotes by *i*-GONAD. *Nature protocol*. 2019; 14, 2452–2482
3. Hirose M, Honda A, Fulka H, Tamura-Nakano M, Matoba S, Tomishima T, Mochida K, Hasegawa A, Nagashima K, Inoue K, Ohtsuka M, Baba T, Yanagimachi R, Ogura A. Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2020; 117 (5) 2513-2518
4. Ishino K, Hasuwa H, Yoshimura J, Iwasaki YW, Nishihara H, Seki NM, Hirano T, Tsuchiya M, Ishizaki H, Masuda H, Kuramoto T, Saito K, Sakakibara Y, Toyoda A, Itoh T, Siomi MC, Morishita S, Siomi H. Hamster PIWI proteins bind to piRNAs with stage-specific size variations during oocyte maturation. *Nucleic Acids Res.* 2021 Mar 18;49(5):2700-2720.

補足

- ゴールデンハムスターは、1960年代より受精の研究に使われている小型実験動物です (Yanagimachi and Chang, Nature 1963)。その当初より、安定した4日性周期や、それに基づく過排卵処理による効率的な卵子および受精卵の採取が知られています。しかし、最近のゴールデンハムスターは過排卵処理による性周期の乱れ、受精率の低下等が観察されることが多いようです（複数の研究室の調べ）。今後、各研究室でノウハウを蓄積し、これらが共有できるようにする必要があるかもしれません。

作成者

- 遺伝工学基盤技術室
- 質問などの連絡先
廣瀬 美智子 michiko.hirose@riken.jp