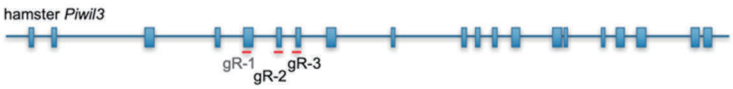
31　ヒト生物学の理解に寄与するゲノム編集ハムスター	塩見　春彦

【目的】マウスは生命科学研究における中心的な実験動物であり、多くのヒトの生物学の理解に貢献してきた。一方で、近年、ヒトとマウスの遺伝学的、生理学的違いも明確になってきており、このため、単純にマウスで得られた知見をヒトに外挿することが困難であることも広く理解され始めている。ゴールデンハムスター（Golden Syrian hamsters/golden hamster : *Mesocricetus auratus*）はヒトの生理学的および薬理学的反応に似た多くの特徴を示すため、ヒトの病気、特に癌や感染症の発症研究や生殖研究に早くから実験動物として用いられてきた歴史がある。今回の Covid-19 パンデミックに際しても、感染・発症機構の解析に広くモデル動物として使用されている。しかしながら、マウスやラットのように近交系が十分に樹立されていないこと、ゲノム情報が不足していること、卵子や初期胚が光、温度、pH などの影響を極めて受けやすく発生工学技術の応用が難しいことから、遺伝子機能を解析するモデル動物として利用されることはなかった。本研究はゴールデンハムスターをヒト疾患モデル動物として利用するため、正確なゲノム DNA 配列情報の取得とゲノム編集技術の開発を目的とした。

【方法】ゴールデンハムスターDNA のショートリード（イルミナ）とロングリード（PacBio）を組み合わせた解析を行い、高品質のゲノム配列情報を取得した。さらに、HiC（MesAur1.0_HiC、DNA Zoo）データを用いることで、これらを染色体レベル（2n＝24）にまで組み立て、精巧な遺伝子のアノテーションを達成した。このゲノム配列情報を利用し、CRISPR-Cas9 システムを用いることで特定の遺伝子を不活化した（ノックアウト／KO）ゴールデンハムスターの作出に成功した。この際、ゴールデンハムスターの卵や初期胚が光の影響を極めて受けやすいため、暗室における胚操作技術を確立した。

【結果】*PIWI* 遺伝子は哺乳類だけでなく多くの動物に保存された遺伝子群であり、それらがコードするタンパク質は生殖細胞特異的小分子 RNA（25～33 塩基長）である piRNA と複合体を形成し、転移因子（トランスポゾン）が引き起こすゲノム配列・構造変異を抑制している。マウスでは 3 種の *Piwi* 遺伝子が存在し、それらが精巣でのみ機能していることが明確になったため、PIWI-piRNA 経路は哺乳類の卵子形成における機能はないと考えられてきた。一方、ヒトを含む多くの哺乳動物は 4 種の PIWI 遺伝子を有しており、このことから多くの哺乳動物は、マウスとは異なる PIWI-piRNA 経路による遺伝子の発現制御を有する可能性が提唱された。これを検証するために、ゴールデンハムスターの 4 種の *PIWI* 遺伝子の内、卵子で強く発現している 2 種類の *PIWI* 遺伝子（*PIWIL1*、*PIWIL3*）の KO ハムスターを作製した。その結果, 作製した *PIWI* KO ハムスター雌は不妊を示した。これらの結果はマウスを用いた研究では得られないものであり、哺乳動物の遺伝子解析におけるゴールデンハムスターの価値が示された。

遺伝子 KO ゴールデンハムスターの作製



	number of founder pups	number of mutant pups	mutant hamster lines
gR-1	10	1	-
gR-2	4	4	#25A^{del89}, #25B^{del4}, #25C^{del300}, #26A^{del192}, #26B^{del41}, #26C^{del2}, #26D^{del39}, #26E^{+4}
gR-3	4	3	#33A^{del8}, #33B^{del72}, #33C^{del329}, #36A^{del8}, #36B^{del4}

31. ヒト生物学の理解に寄与するゲノム編集ハムスター

塩見　春彦

慶應義塾大学 医学部 分子生物学教室

Key words：ゴールデンハムスター，PIWI，piRNA，トランスポゾン

緒　言

ゲノム改変が容易なマウスはヒト生物学の理解に大きく貢献してきた。しかし、近年、ヒトとマウスの生理学的、遺伝学的な違いが明確になってきており、必ずしもマウスで得られた知見をそのままヒトに外挿し応用することができないことも明らかになってきた。したがって、マウスに替わる、またはマウスと併用するモデル動物が求められる。もちろん、ヒトを理解する上で理想的なモデルは霊長類であるが、その使用に掛かる経費や時間を考えると他の選択肢が提供されることが望ましい。

ゴールデンハムスター（*Mesocricetus auratus*）はその生理学的及び薬理学的反応がヒトに似ているため、ヒト疾患研究の重要なモデル動物として早くから利用されてきた。特に、癌や感染症の発症機構、生殖、そして感染症研究においては重要な実験動物である。たとえば、哺乳類 IVF（*in vitro* fertilization）の初めての成功例はゴールデンハムスターを用いてなされた。また、最近では COVID-19/SARS-Cov-2 研究に頻繁に利用されている。一方、ハムスターはゲノム配列情報の不足、さらには卵や初期胚の操作が非常に難しい（光毒性を示すため、暗室での胚操作が必要）ことから、ゲノム改変による遺伝子機能を解析するモデル動物として利用されることはなかった。

マウスが生命科学研究の中心的な実験動物となったのは、飼育管理面から遺伝子改変技術など多岐にその理由があるが、その中の 1 つにゲノム配列情報が充実していることが挙げられる。このため、任意のゲノム配列を簡単に PCR で増幅し利用でき、ノックアウト（KO）マウス作製が加速し、多くの研究者が KO マウスをヒト生物学、特にヒト疾患研究のモデルとして利用してきた。このように、ゲノム配列情報は遺伝子機能と生命現象の関わりを解析するために必要不可欠な情報である。私達はゴールデンハムスターをマウスのようにゲノム改変が可能なモデル動物にするため、まず、ゲノムの再解読を行い、得られた高品質のゲノム配列の情報を用いて、ゲノム改変ハムスターの作製に成功した［1，2］。

方　法

1. ゲノム配列解析

ゴールデンハムスターの染色体数は 2n＝44 で全長は 2.4Gb である。ゴールデンハムスターのドラフトゲノム配列解析は Broad Institute で実施され、2013 年に公開されている。このゲノム配列はその 17%がギャップ（N：解読不能）となっており、2 万以上の断片に分断された配列となっている。私達は PacBio による長鎖配列解析と HiC データを組み合わせ、ギャップ配列を 0.25%まで減少させ、しかも 22 染色体に再構成したゴールデンハムスターのゲノム配列を構築した（DDJB: PRJDB10770）［1］。

2. ゲノム改編ハムスター作製

私達はこの新しいゲノム配列情報を用いてゴールデンハムスターの PIWI-piRNA 分子経路の解析を行った。この経路は生殖細胞特異的なトランスポゾン抑制系であり、哺乳類における本経路の解析はこれまでマウスを用

いて行われてきた。マウスには 3 種類の *PIWI* 遺伝子（*PIWIL1*、*PIWIL2*、*PIWIL4*）が存在し、これらは精巣で高発現しているが卵巣ではほとんど検出できない。それぞれの *PIWI* KO マウスは精子形成不全による雄不稔を示すが、雌では異常は見られない。このため、哺乳類 PIWI-piRNA 経路は精巣でのみ機能し、卵形成過程には関与しないと結論されていた。しかし、マウスは例外であり、ヒトを含む他のほぼすべての哺乳類は 4 種類の *PIWI* 遺伝子（*PIWIL1*、*2*、*3*、*4 : PIWIL3* はマウスには存在しない）を有し、しかも、これらが卵巣においても発現していることが明らかになった［2〜4］。哺乳類卵巣における PIWI 機能を理解するため、私達は *PIWI* KO ハムスター（*PIWIL1* KO, *PIWIL3* KO）の作製を行った（図 1）。ハムスターの卵や初期胚は光毒性を示すため、暗室での胚操作が必要である。このため、暗室における（>600 nm light）胚操作技術を確立し、ゲノム情報を用い正確にデザインした CRISPR gRNA と Cas9 タンパク質を受精卵に注入し、それを偽妊娠ハムスターに移植した。その結果、高効率でゲノム改変ハムスターを取得できる系を確立することができた［5］。



	number of founder pups	number of mutant pups	mutant hamster lines
gR-1	10	1	-
gR-2	4	4	#25A^{del89}, #25B^{del4}, #25C^{del300}, #26A^{del192}, #26B^{del41}, #26C^{del2}, #26D^{del39}, #26E^{+4}
gR-3	4	3	#33A^{del8}, #33B^{del72}, #33C^{del329}, #36A^{del8}, #36B^{del4}

図 1. 遺伝子 KO ゴールデンハムスターの作製

結　果

1. ゴールデンハムスターのゲノム解析

私達が構築した高品質ゲノム配列情報はトランスポゾンや他のリピート配列のマッピングも可能とし、SINE、LINE、LTR レトロトランスポゾン、および DNA トランスポゾンがハムスターゲノムの 9.2%、16.9%、12.1%、1.3%を占めることが明らかになった。ゲノム全体に対するトランスポゾンの割合は、マウスと同等である。これらリピート配列の多くはこれまでギャップとして未解読領域の配列に多く含まれていたことがわかり、新しく再構築したゴールデンハムスターゲノムはエピジェネティクスや小分子 RNA 解析にも対応できるものである。また、Broad Institute のドラフトゲノム配列を用いた場合、ほぼ全てのトランスポゾンが変異を多数有する転移能を既に失った因子として同定される。一方、私達が構築した高品質ゲノム配列情報を用いた場合、完全長のトランスポゾンが多数見いだされた。この結果は、ハムスターにおいてもマウス同様にトランスポゾンが活発に転移していることを示唆する。興味深いことに、これら完全長トランスポゾンの多くがハムスター特異的な内在性レトロトランスポゾン（特に、ERV2 ファミリー）であった。今回、再構築したゴールデンハムスターゲノムは UCSC ゲノムブラウザで利用できるようにしたものを公開している（http://siomilab.med.keio.ac.jp/hamster）［1］。

2. *PIWI*KO ゴールデンハムスター表現型解析

ゴールデンハムスターの *PIWIL1* と *PIWIL3* は卵子で強く発現しており、それぞれに特徴的な長さの piRNA が結合していることが明らかとなっている［1］：排卵前の卵巣では PIWIL1 に結合している piRNA のサイズは 29～30nt、一方、この時期 PIWIL3 には piRNA が結合していない。排卵後の未受精卵では PIWIL1 には 22～23 塩基長の piRNA が、また、PIWIL3 には 18～20 塩基長の piRNA が結合している。したがって、卵子や胚では PIWI タンパク質と piRNA は時期特異的な変化を起こし、これが標的の変化や標的抑制機構の変化を作りだしていることが推測される。実際に、私達は *PIWIL1* および *PIWIL3* をそれぞれ欠損したゴールデンハムスターの卵子由来の胚は初期発生異常を示すことを明らかになった（図 2）。*PIWIL1* を欠損した卵子由来の胚は 2 細胞期までしか発生せず、*PIWIL3* を欠損した卵子由来の胚は初期発生の遅延や卵割異常を示した［5］。また、チェコの Svoboda と理研バイオリソースセンターの小倉のグループも piRNA 生合成に必須の *MOV10L1* 遺伝子を欠損したゴールデンハムスターを作製し、*PIWIL1* と同様の表現型を示すことを報告している［6］。

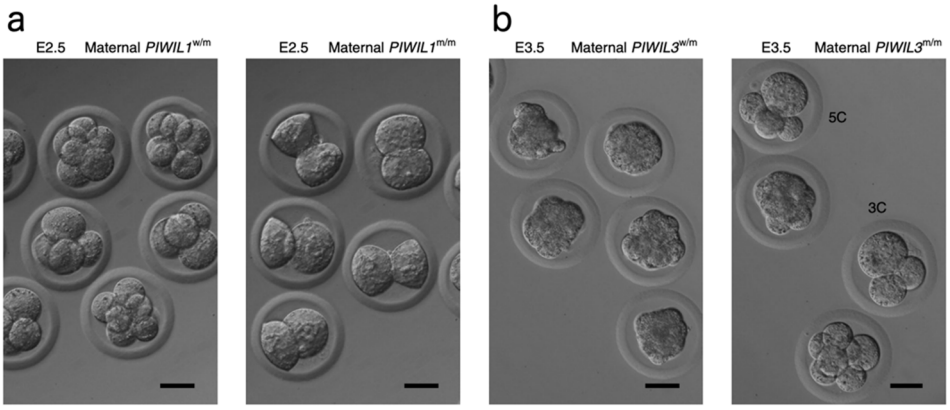


図 2. *PIWI*KO ハムスター胚の表現型

PIWIL1 と *PIWIL3* 欠損ハムスターは雌不稔を示す。その原因を調べたところ、卵は外見上正常に見えるが、それを正常な雄との交配により生じる受精卵はいずれも初期胚発生の異常を示した（スケールバー：50μm）。

a) *PIWIl1*KO 雌と正常な雄の交配により生じる受精卵は 2 細胞期胚で分裂が停止する。

b) *PIWIl3*KO 雌と正常な雄の交配により生じる受精卵は細胞分裂異常を示す。

考　察

以上例を示したように「マウスでは達成が困難な研究がハムスターを用いることで可能になる」例が他にも多々あると予想される。これらには *PIWI* 遺伝子のようにパラログ遺伝子数の違いや発現している組織・細胞の特異性の違いのみならず、冬眠のようにマウスでは観察できない生理学的特徴も含まれる（ハムスターは人工的に冬眠を誘導できる）。また、ハムスターは、霊長類に比べ、格段にその使用に掛かる経費や時間が少なくて済む。さらに、既存のマウス飼育施設を利用できる利点もある。また 4 番目の *PIWI* 遺伝子（*PIWIL3*）のようにマウスには存在しないがヒトを含む他の哺乳類には存在する遺伝子の機能解析もできる。現在、KO マウスが期待の表現型を示さない有名な例である Werner 症候群の原因遺伝子 *WRN*（RecQ 型 DNA ヘリケース）の KO ハムスターを作製し、その解析を進めている。Werner 症候群は、希少だが比較的日本人で発症頻度の高い、常染色体劣性の代表的遺伝的早老症である。*WRN*KO マウスは期待された早老（premature aging）を示さず、テロメラーゼ変異体と掛け合わせることで初めてある程度の早老の表現型を示す［7］。

ゴールデンハムスターはその生理学的及び薬理学的反応がヒトに似ているため、ヒト疾患の研究の重要なモデル動物として早くから利用されてきた歴史がある。私達が構築した高品質のゲノム配列情報とゲノム編集技術を用いることで、癌化、老化、感染症、さらには冬眠や初期胚の光毒性等の興味深い生体反応に関与する遺伝子の大規模スクリーニングも可能である（図 3）。

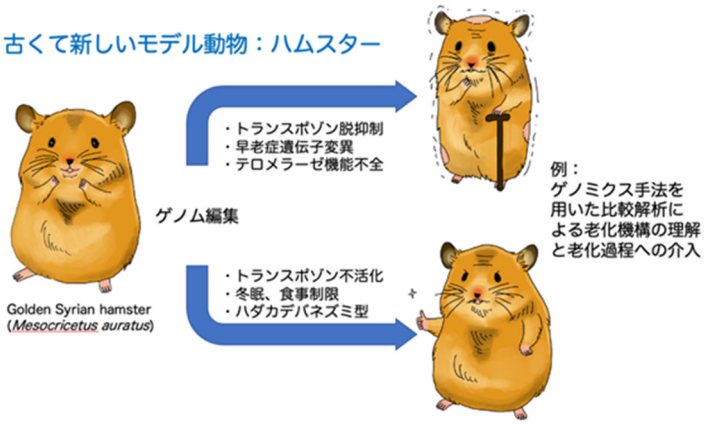


図 3. 新しいモデル動物としてのハムスターの可能性
高品質のゲノム配列情報とゲノム編集技術が整ったゴールデンハムスターは今後、様々な生命科学分野で利用されることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京工業大学の伊藤武彦教授、東京大学の森下真一教授、そして、遺伝学研究所の豊田敦教授である。

文　献

1) 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. doi: 10.1093/nar/gkab059. PMID: 33590099; PMCID: PMC7969018.

2) Roovers EF, Rosenkranz D, Mahdipour M, Han CT, He N, Chuva de Sousa Lopes SM, van der Westerlaken LA, Zischler H, Butter F, Roelen BA, Ketting RF. Piwi proteins and piRNAs in mammalian oocytes and early embryos. Cell Rep. 2015 10(12):2069-82. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.062. Epub 2015 Mar 26. PMID: 25818294.

3) Williams Z, Morozov P, Mihailovic A, Lin C, Puvvula PK, Juranek S, Rosenwaks Z, Tuschl T. Discovery and Characterization of piRNAs in the Human Fetal Ovary. Cell Rep. 2015 13(4):854-863. doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.030. Epub 2015 Oct 17. PMID: 26489470.

4) Yang Q, Li R, Lyu Q, Hou L, Liu Z, Sun Q, Liu M, Shi H, Xu B, Yin M, Yan Z, Huang Y, Liu M, Li Y, Wu L. Single-cell CAS-seq reveals a class of short PIWI-interacting RNAs in human oocytes. Nat Commun. 2019 Jul 29;10(1):3389. doi: 10.1038/s41467-019-11312-8. PMID: 31358756; PMCID: PMC6662892.

5) Hasuwa H, Iwasaki YW, Au Yeung WK, Ishino K, Masuda H, Sasaki H, Siomi H. Production of functional oocytes requires maternally expressed PIWI genes and piRNAs in golden hamsters. Nat Cell Biol. 2021 Sep;23(9):1002-1012. doi: 10.1038/s41556-021-00745-3. Epub 2021 Sep 6. PMID: 34489571.

6) Loubalova Z, Fulka H, Horvat F, Pasulka J, Malik R, Hirose M, Ogura A, Svoboda P. Formation of spermatogonia and fertile oocytes in golden hamsters requires piRNAs. Nat Cell Biol. 2021 Sep;23(9):992-1001. doi: 10.1038/s41556-021-00746-2. Epub 2021 Sep 6. PMID: 34489573; PMCID: PMC8437802.
7) Chang S, Multani AS, Cabrera NG, Naylor ML, Laud P, Lombard D, Pathak S, Guarente L, DePinho RA. Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome. Nat Genet. 2004 36(8):877-82. doi: 10.1038/ng1389. Epub 2004 Jul 4. PMID: 15235603.