

平成28年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	ゲノム編集技術を活用した細胞特異的遺伝子欠損メダカの創出とその解析	
研究者所属・氏名	研究代表者：理工学部 生命科学科 准教授 福嶋 伸之 共同研究者：理工学部 生命科学科 教授 辻内 俊文 理工学部 生命科学科 准教授 加川 尚	

1. 研究目的・内容

本課題では、メダカを用いて任意の時期に細胞特異的に遺伝子を欠損させる方法を確認し、当該遺伝子の機能を明らかにする。具体的には、メダカ個体成熟後に細胞特異的にリゾホスファチジン酸 (LPA) 受容体遺伝子を欠損させ、個体の行動を観察して LPA 受容体の機能を明らかにする。技術確立のため、メダカ細胞を用いて任意の時期に遺伝子欠損を引き起こすことができるかどうかを調べた。

2. 研究経過及び成果

本研究において必要な3種類、(1) テトラサイクリンリプレッサー (TetR) 発現細胞、(2) テトラサイクリンオペレーター (TetO) の下流に Cas9 を挿入したプラスミド (pcDNA/TetO-Cas9)、および (3) メダカ U6 プロモーターによりガイド RNA (gRNA) を産生するプラスミド (DR274-mU6/019860-Lpar1、DR274-U6/19869R3-Lpar1) の作製を試みた。

メダカ線維芽細胞(drR)にpcDNA4/TetRを導入し、ピューロマイシンにより6種類のクローン(I~VI)を得た。これらの細胞のゲノムDNAおよびRNAを精製し、ゲノムPCRおよびRT-PCRを行ったところ、クローンIIおよびVにおいてTetRがゲノムに挿入されていること、恒常的にTetRが発現されていることがわかった。続いて、クローンVの細胞にpcDNA/TetO-Cas9を導入した。Dox非添加の場合において、弱いながらCas9の発現が見られたが、Dox 3 μg/ml を添加し2日後では、顕著なCas9の発現上昇が認められた。このことから、テトラサイクリンシステムが機能していることが明らかとなった。そこで、細胞から個体レベルへ実験を進展させるため、TetR発現トランスジェニック(Tg)メダカを作製を試みた。pcDNA4/TetRをメダカ受精卵に注入し、約3ヶ月後にヒレのDNAを用いてジェノタイピングをしたが、TetRの挿入は確認されなかった。さらに、これらのメダカ約30匹に由来する受精卵を用いてジェノタイピングをしたが、いずれの卵のDNAにもTetR遺伝子は見られなかった。現在、直鎖状のpcDNA4/TetRプラスミドを用いてTg作製を継続している。

gRNAのような短鎖RNAの産生にはRNAポリメラーゼIIIを駆動するU6プロモーターが必要である。しかしながらメダカのU6プロモーターは未だ報告されていないため、これの同定を試みた。BLASTサーチにより、複数のU6プロモーター候補を見だし、これらのうち2つ(NC_019860-R1、NC_019869-R3)を選択した。GFPノックダウンアッセイにより短鎖RNAが産生されるかどうかを調べたところ、いずれのU6配列も短鎖RNAの産生することが示唆された。続いて、U6プロモーターをDR274プラスミドに挿入し、さらにその下流にLpar1のgRNAおよび足場となるscaffold RNA(scRNA)をコードする配列を組み込みDR274-mU6/019860-Lpar1を作製した(図1A)。これをdrR細胞に導入し、scRNAが産生されているかどうかをRT-PCRにより調べたところ、U6プロモーターが機能しscRNAが産生されていることが分かった(図1B)。このことから、Lpar1のgRNAも産生されていると考えられた。

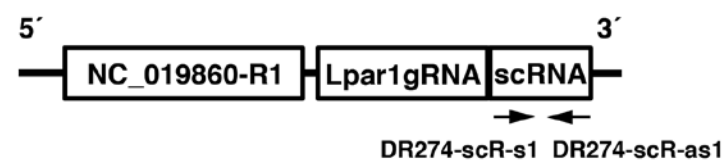
最後に、Lpar1のgRNAが機能してCas9を誘導し、Lpar1のゲノム編集が生じるかどうかを調べた。まず、ゲノム編集が生じた場合、相同組み換えによりGFPが挿入されるドナーベクターを作製した。このドナーベクターを、DR274-mU6/019860-Lpar1とpcDNA/TetO-Cas9、またはDR274-U6/19869R3-Lpar1とpcDNA/TetO-Cas9とともにTetR発現細胞に導入した。Dox処理を行い

GFP 発現細胞が検出されるかどうか調べたが、これまでのところ、GFP 発現細胞は見られていない。ゲノム編集が生じていないか、効率的な相同組み換えが生じていない可能性が考えられる。したがって、gRNA と Cas9 を同一細胞において効率よく発現させるため mU6/019860-Lpar1 と Cas9 を同一プラスミドに組み込んだ pcDNA/Cas9-R1-Lpar1 または pcDNA/Cas9-R3-Lpar1 を作製した。また、gRNA の設定領域を Lpar1 の開始コドン付近に変更することに合わせてドナーベクターの再構築も試みた。現在これらを用いて gRNA の機能性を検討している。

LPA 受容体を介したシグナルは生体の発達に重要な役割を果たすが、生物進化における役割は未だ不明である。本研究はその一端を明らかにすることができると期待されるが、現在考えられる LPA シグナルの役割について著書にまとめた (Encyclopedia of Signaling Molecules, 2nd edition, Springer, doi; 10.1007/978-1-4614-6438-9_101681-1)。

(A)

DR274-mU6/019860-R1-Lpar1



(B)

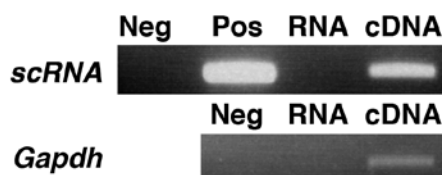


図1 メダカ U6 プロモーター候補遺伝子 (NC_019860-R1) の機能解析 (A) DR274-mU6/019860-R1-Lpar1 の構成 (B) DR274-mU6/019860-R1-Lpar1 を導入した drR 細胞における scRNA および Gapdh の発現。scRNA の PCR には (A) に示した 2 種のプライマー、DR274-scR-s1 および DR274-scR-as1 を用いた。Neg、ネガティブコントロールとして水を用いた。Pos、ポジティブコントロールとして DR274-mU6/019860-R1-Lpar1 を用いた。RNA、逆転写反応を行わない RNA 試料を用いた。cDNA、逆転写反応にはランダムヘキサマーを用いた。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

本研究によりテトラサイクリンシステムが機能すること、クローニングしたメダカ U6 プロモーターが gRNA を産生することがわかった。しかしながら、産生された gRNA が Cas9 と協調してゲノム編集を引き起こすことかどうかはまだ不明である。さらに、TetR 発現メダカも未確立である。したがって、gRNA の機能性の確認と TetR 発現メダカ系統の確立が喫緊の課題であり、現在これらの課題解決に取り組んでいる。課題解決後、gRNA と Cas9 発現メダカの樹立に取り組む計画である。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Springer 社	著書	2017 年 1 月 6 日