

令和元年6月18日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17773

研究課題名(和文)改良型CRISPR依存的ノックイン法を用いた長鎖非翻訳RNAの生理機能の解明

研究課題名(英文)The analysis of the function of long non-coding RNA by reporter gene knock-in via improved CRISPR/Cas9

研究代表者

泰松 清人(TAIMATSU, Kiyohito)

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号：10755482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：長鎖非翻訳RNAデータベースを利用し、50種類を候補遺伝子として選別し、胚発生期において造血・心血管を含む組織において特異的に高い発現が認められる長鎖非翻訳RNA16種類を解析候補遺伝子として選別した。これらの標的遺伝子座位に対してCRISPR/Cas9によるノックインを行い、遺伝子破壊と同時に標的遺伝子の発現を蛍光タンパク質レポーターの発現でモニタリングできるトランスジェニックゼブラフィッシュ系統の作製を試みたが、ノックインされたF1世代は得られなかった。遺伝子破壊された系統の作製には成功し、表現型解析の結果を現在論文にまとめている。この研究過程で開発したノックイン法は論文として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAのうちタンパク質をコードするmRNAは数%に過ぎず、RNAの機能の全容解明のために大部分を占める非翻訳RNAの理解は大変重要である。これまでの変異体作成技術では非翻訳RNAの変異体の単離が困難だった。非翻訳RNAの変異体作製のために開発したゲノム編集技術は、これまでに変異体の作製が困難であった遺伝子の改変を容易にし、今後の遺伝子研究の推進に役立つものと期待される。本研究で作製された長鎖非翻訳RNAの変異体のうち2系統は性分化の異常を示した。性決定機構は生殖医療の高まりもあり解明が重要視されている。作製中の論文は長鎖非翻訳RNAの性決定機構における機能に光を当てているものである。

研究成果の概要(英文)：To analyze long non-coding RNA (lncRNA) in zebrafish, I chose target genes to generate mutants by checking the genomic location in lncRNA database. I detected target gene's expression by whole-mount in situ hybridization, and picked up 50 genes which expressed in circulatory system. I performed knock-in of a reporter gene in target loci to generate mutants and visualize target gene's expression. Unfortunately, I failed to generate the stable knock-in lines, but I achieved to generate mutant lines. Two lines showed the abnormality in sex determination. Now I am writing the paper to report the phenotype of mutants and the function of target genes. This study will shed light on the function of lncRNA in sex determination. On the other hand, I published the paper about knock-in technology developed via this study.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：ゼブラフィッシュ ゲノム編集 ノックイン 長鎖非翻訳RNA lncRNA CRISPR/Cas9 発生遺伝学

1. 研究開始当初の背景

(1) RNAにはタンパク質をコードする mRNA とコードしない非翻訳 RNA があるが、mRNA は全 RNA のわずか数%にすぎず、非翻訳 RNA が大多数を占める (C Ponting, 2009)。非翻訳 RNA には、アミノ酸を輸送する tRNA、リボソームを構成する rRNA、RNA 干渉により対象遺伝子の発現を低下させる miRNA、そして 200bp 以上の長さがあるもののタンパク質をコードしない長鎖非翻訳 RNA (lncRNA) などがある。lncRNA には、X 染色体の不活性化を担う Xist がよく知られているが、多くはその機能が未解明である (CM Clemson, 1996)。lncRNA は mRNA に比べると短く、またナンセンス変異やフレームシフト変異のように 1 塩基の変異で遺伝子機能を喪失するということが非常に起きにくいいため、変異体の単離が困難であることが大きな理由として挙げられる。このように、lncRNA はその種類の豊富さから機能が興味深いものの、機能解析が行われている lncRNA は少なく、解析技術の発展が望まれていた。

(2) 近年、ゲノム編集技術の進展が著しい。筆者らは、小型魚類のモデル生物であるゼブラフィッシュにおいて、標的座位におけるレポーター遺伝子のノックイン法を報告した (S Ota and K Taimatsu et al., 2016) が、このようにゲノム編集技術は標的遺伝子座全体を欠損させることが可能となっていた。そのため、lncRNA 遺伝子座を欠損させる、あるいはレポーター遺伝子をノックインし、遺伝子機能の破壊および遺伝子発現の可視化を行うことが可能な状況となっていた。

2. 研究の目的

lncRNA は、その多様性にもかかわらず、変異体を得難いために解析が進んでいなかった。しかし、これまでに機能が明らかにされたものは X 染色体の不活性化や減数分裂制御といった生体制御の非常に重要な位置を占めるものが知られていた。本研究は、ゼブラフィッシュにおいて、ゲノム編集技術を活用して lncRNA の遺伝子破壊と発現の可視化を行うことで脊椎動物の発生に共通した lncRNA を発見し機能を解明することを目的としていた。

3. 研究の方法

(1) 本研究のモデル生物としてゼブラフィッシュを用いた。ゼブラフィッシュは体外発生し胚体が透明であることから、ゲノム編集による効果の検出が容易である。

(2) 標的 lncRNA の選定においては、既に公表されている lncRNA データベースを用いた (H Dhiman et al., 2015)。遺伝子発現の検出には whole-mount *in situ* hybridization 法 (WISH 法) を用いた。

(3) 標的座位特異的なノックインのために、標的 lncRNA 剤の 5' 側および 3' 側の騒動配列をレポーター配列の 5' 側および 3' 側に付加したレポーターベクターを作製した。これまでの筆者らの研究で、このようなレポーターベクターを標的 lncRNA 座位及びレポーターベクターを標的とした crRNA、gRNA および Cas9 タンパク質と共にインジェクションすることで、標的座位にレポーターベクターがノックインされることが明らかとなっている (図 1, S. Ota and K. Taimatsu et al., 2016)。

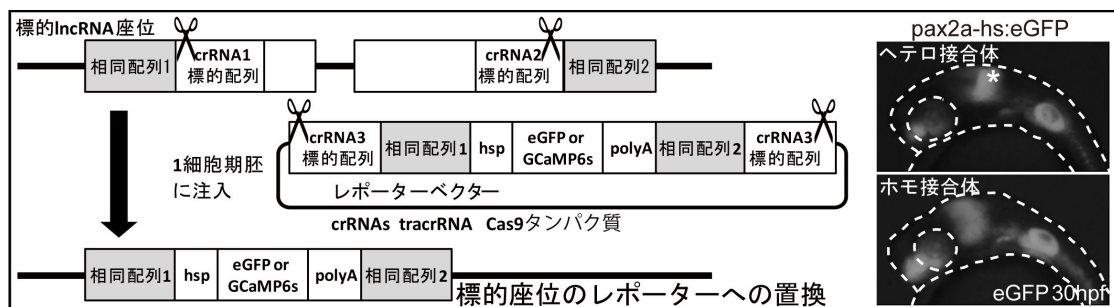


図 1, 標的座位のレポーターへの置換

標的座位を CRISPR/Cas9 によって切断し、その切断面と相同な配列を有するレポーターベクターを同時にインジェクションすると、レポーターベクターを標的座位にノックインすることができる。

(4) 変異体の切片作成においては、プラスチック切片法を用い、ヘマトキシリン・エオシン染色を行った。

4. 研究の成果

(1) 公表されている lncRNA データベースを用いて (Y Liu et al., 2013) 標的 lncRNA の選定を行った。コード領域の近傍において、発生に重要とされる遺伝子がコードされている lncRNA を中心にピックアップし、70 の遺伝子を解析候補とした。解析候補 lncRNA をクローニングし、WISH 法により発生期の遺伝子発現を検出し、明瞭な発現が認められる 9 つの遺伝子を最終的な解析候補とした。

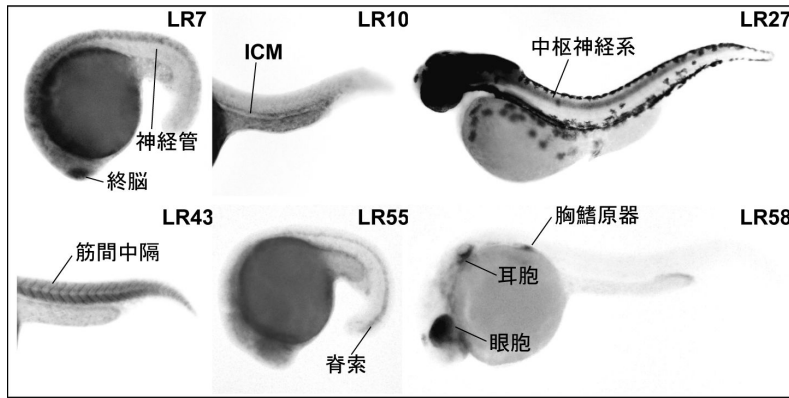


図2 解析候補 lncRNA の発現検出
70 種類の解析候補 lncRNA を WISH 法により発現を検出した結果、9 つの遺伝子において明瞭な発現が検出された。

(2) 解析候補の lncRNA がゲノム上にコードされた領域の 5' 側と 3' 側を標的とした crRNA を設計し、gRNA、Cas9 タンパク質とともにインジェクションし、ゲノム編集活性の評価を行った。活性の高い crRNA を選定し、レポーター遺伝子とともにインジェクションを行った。しかし、F1 世代において、遺伝子破壊がされた系統は樹立されたが、ノックインされた系統を樹立することは出来なかった。

(3) 解析候補遺伝子 3 つの変異体は、候補 1: 成体の 9 割がオスになる、候補 3: 成体がオスのみになる、候補 1 と 2 の二重変異体: 神経形成の異常、を示した。解析候補 1 の変異体について解析を進めた。ゼブラフィッシュは、生まれた段階では雌雄はなく、受精後 2-3 週で後天的に雌雄に分化する。また、メス化に必要な遺伝子の変異体は成体がオスばかりになることが知られている。そのため、全身の性分化に影響を及ぼす始原生殖細胞から成熟生殖細胞系列への分化に異常があるものと推測された。

(4) 解剖の結果、変異体は成熟卵母細胞が全く無く、未熟な卵母細胞のみしか存在しなかった。WISH 法により卵母細胞の分化マーカーの卵巣における発現を検出した結果、やはり未熟な卵母細胞のマーカーが高発現していた。卵巣の切片を作製し観察した結果、卵巣の早い発達段階から卵母細胞の発達異常が検出された。このことから解析候補 1 の変異体は、卵母細胞が発達しないために、正常にメスに分化しきることができないため、成体がオスばかりになってしまうものと結論付けられた。

(5) ゲノム編集技術による標的座位へのノックイン技術について、本研究における試行錯誤と、これまでの研究による技術開発も含めて、Hitoshi Morita, Kiyohito Taimatsu, Kanoko Yanagi and Atsuo Kawahara, Exogenous gene integration mediated by genome editing technologies in zebrafish, *Bioengineere*, 査読有, 2017, 287-295 として発表した。作製した変異体の表現型解析については、現在論文を執筆中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hitoshi Morita, Kiyohito Taimatsu, Kanoko Yanagi and Atsuo Kawahara, Exogenous gene integration mediated by genome editing technologies in zebrafish, *Bioengineere*, 査読有, 2017, 287-295
DOI:10.1080/21655979.2017.1300727

〔学会発表〕(計 3 件)

Kiyohito Taimatsu, Satoshi Ota, Shin-ichi Higashijima, Atsuo Kawahara, CRISPR/Cas9-mediated eGFP reporter integration into zebrafish genome for functional visualization and disruption of target genes (oral), ZEBRAFISH DISEASE MODELS SOCIETY ANNUAL MEETING (国際学会), 2017

Kiyohito Taimatsu, Functional visualization and disruption of target genes by CRISPR/Cas9-mediated eGFP reporter integration into zebrafish genome (poster), ZEBRAFISH DISEASE MODELS SOCIETY ANNUAL MEETING (国際学会), 2017

Kiyohito Taimatsu, Satoshi Ota, Shin-ichi Higashijima, Atsuo Kawahara, CRISPR/Cas9-mediated eGFP reporter integration into zebrafish genome for functional visualization and disruption of target genes (oral), JAPANESE SOCIETY OF DEVELOPMENTAL BIOLOGISTS ANNUAL MEETING (国際学会), 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：川原 敦雄

ローマ字氏名：KAWAHARA, Atsuo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。