

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号： 6 3 8 0 1

研究種目： 奨励研究

研究期間： 2021 ~ 2021

課題番号： 2 1 H 0 4 1 4 0

研究課題名 ゼブラフィッシュバイオリソースを利用した細胞・組織を自在に操作する技術の開発

研究代表者

坂 季美子 ( SAKA, Kimiko )

国立遺伝学研究所・技術課・技術職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 470,000 円

研究成果の概要：本研究では、研究代表者の所属研究所が保有する、様々な細胞・組織で転写因子Gal4を発現するゼブラフィッシュバイオリソース(Gal4系統)に着目し、Gal4系統におけるGal4遺伝子を他の有用な遺伝子へ変換し、目的とする細胞・組織を自由自在に操作・改変する技術の開発を目指した。CRISPR/Cas9法による遺伝子ノックインを応用した方法により、脳特異的Gal4系統におけるGal4遺伝子の赤色蛍光タンパク質遺伝子mScarletへの置き換えを検討したところ、脳特異的にmScarlet遺伝子を発現するF1フィッシュを得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、ゼブラフィッシュバイオリソースを用いて、目的とする細胞・組織を操作する系統を開発する技術が実現可能であることが示された。この技術は、組織のイメージングや遺伝子機能解析、ヒト疾患モデル作製等に活用できる。また、ゼブラフィッシュは基礎研究だけでなく医学研究にいたるまで広く利用されているため、本技術は多様な分野の研究の発展につながることを期待される。

研究分野： 遺伝子工学、分子生物学

キーワード： ゼブラフィッシュ バイオリソース CRISPR/Cas9法 遺伝子ノックイン

## 1. 研究の目的

ゼブラフィッシュは大量飼育が容易なうえ、発生が早く、発生期間を通して胚が透明であるため、生きたまま発生過程を観察するのに適したモデル脊椎動物である。また、遺伝子の約70%がヒトと共通し、ヒトと似た器官・臓器を備えていることから、基礎生物学研究のみならず、医学・創薬研究にいたるまで、世界中でさかんに利用されるようになってきた。そのため、目的とする細胞・組織を自由自在に操作・改変する技術の開発が急務となっている。

本研究では、研究代表者の所属研究所が保有する、様々な細胞・組織で転写因子 Gal4 を発現する世界最大規模のゼブラフィッシュバイオリソース (Gal4 系統) に着目し、CRISPR/Cas9 法を用いた Gal4 遺伝子挿入部位への有用遺伝子のノックインによって、目的の細胞や組織の操作・改変を可能にする技術の開発を目指す。

## 2. 研究成果

Gal4 系統における Gal4 遺伝子とその上流を標的とする gRNA を複数設計し、その中から切断効率が良い gRNA1 と gRNA2 を選定した(図 1)。次に、EF1 $\alpha$  プロモーター下に配置した赤色蛍光タンパク質 mScarlet 遺伝子、Gal4 系統が Gal4 遺伝子の外側にもつ Tol2R 及び Tol2L 配列をホモロジーアームとして有するドナープラスミドを作製した(図 1)。

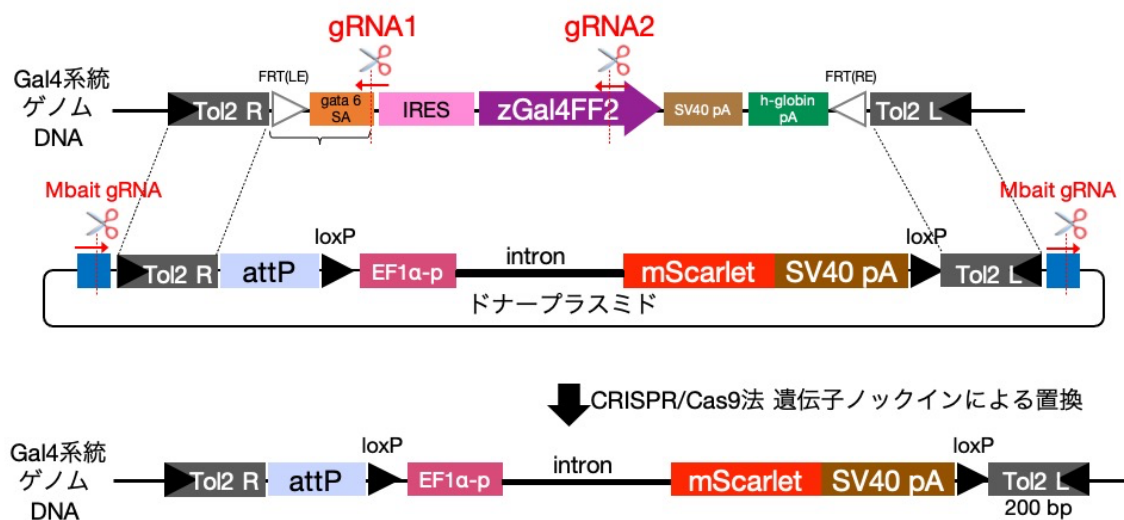


図 1. CRISPR/Cas9 法遺伝子ノックインによる Gal4 遺伝子の置き換え

脳で Gal4 を発現する系統 gSAIzGFFD2269A; UAS:GFP(図 2 左)と野生型を掛け合わせて得られた受精卵に、Cas9 mRNA、gRNA1、gRNA2、ドナープラスミドを切り出すための Mbait gRNA 及びドナープラスミドを顕微注射した。受精後 5 日目において全身で mScarlet を発現する稚魚からゲノム DNA を抽出し、PCR とシーケンス解析を行った結果、非相同末端結合、もしくは、相同組換えによってドナープラスミドが標的配列に導入されていることが確認された。

更に、全身で mScarlet を発現する稚魚を成魚になるまで育て、掛け合わせたところ、全身及び脳特異的に mScarlet を発現し、かつ Gal4 の発現が認められない次世代(F1)が得られた(図 2 右)。現在ドナープラスミドの挿入部位を解析中であるが、片側は非相同末端結合により gRNA2 の標的配列へ導入されていることが明らかとなった。

本研究成果により、バイオリソースである Gal4 系統を用いて、目的とする細胞・組織を操作する系統を開発する技術が実現可能であることが示された。この技術は幅広い分野の研究の発展につながる事が期待される。

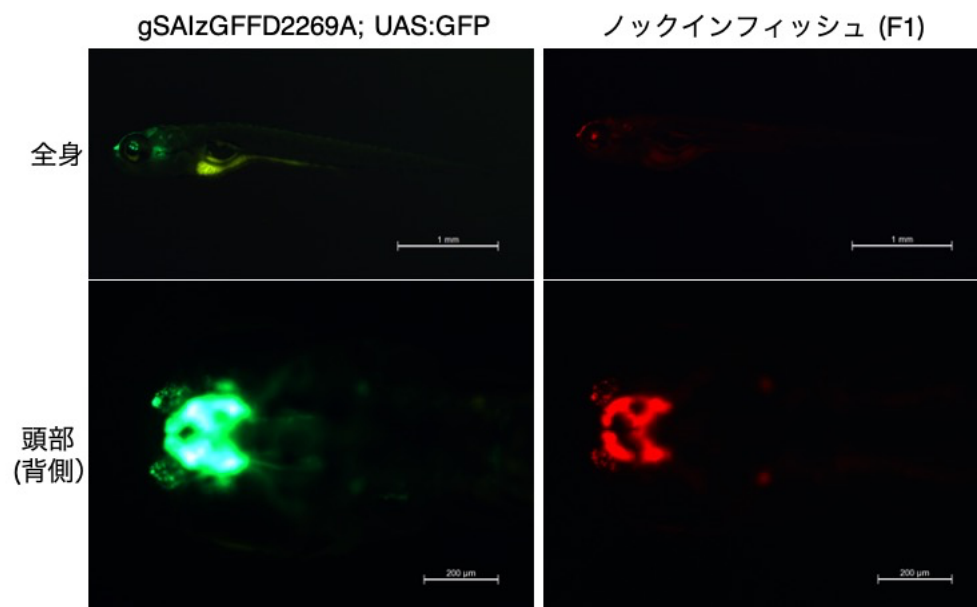


図 2. 脳特異的に mScarlet を発現する 5 日齢の稚魚  
 (左) gSAIzGFFD2269A; UAS:GFP (右) ノックインフィッシュ (F1)

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

| 氏名    | ローマ字氏名            |
|-------|-------------------|
| 川上 浩一 | (KAWAKAMI Koichi) |