

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：32666

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20667

研究課題名（和文）Cas13dを用いた両生類の四肢発生に関わる遺伝子の時期特異的ノックダウン

研究課題名（英文）Spatio-temporal genes knockdown involved in amphibian limb development using CRISPR-Cas13d.

研究代表者

柴田 侑毅 (Shibata, Yuki)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：20909569

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：アフリカツメガエルのセーフハーバー遺伝子の1つを、初めて同定することに成功した。CRISPR-Cas9を用いて同領域に外来遺伝子を導入することに成功し、組み込まれた外来遺伝子が次世代に継承する生殖細胞伝播（germline transmission）を確認した。このゲノムターゲティングを基とした新規トランスジェニック（Tg）アフリカツメガエルの作製法をNEXTTrans法と命名し、国際学術誌に論文を発表した。加えてツメガエルにおけるCRISPR-Cas13dの有効性を確認したが、これまでに報告された他の生物種と比較して標的mRNAのノックダウン効果が低いいため、更なる条件検討が必要と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により開発したNEXTTrans法により、簡便に外来遺伝子を導入したトランスジェニックカエルを作出できるようになった。今後、遺伝子のコピー数をコントロールする必要がある様々な遺伝子工学技術（Cre/loxP, Tet-On, optogenetics, DNA barcoding）を、両生類に応用できる可能性がある。さらにツメガエルにおいてもCRISPR-Cas13dを用いることで、標的mRNAの発現量が減少することを示した。本研究を通して、ツメガエルのモデル動物としての価値を高め、脊椎動物の組織形成や発生生物学への研究応用に向けた足がかりを築いた。

研究成果の概要（英文）：We have identified one of the safe harbor genes in the African clawed frog, *Xenopus laevis* and improved a transgenic *Xenopus* generation strategy based on genome targeting using CRISPR-Cas9. Furthermore, we confirmed germline transmission of the incorporated transgene to the next generation and stable the gene's expression in F1 siblings. We named this method as NEXTTrans and published a paper in an international journal. In addition, the effectiveness of CRISPR-Cas13d in *Xenopus* was confirmed. However, the knockdown efficiency of the target mRNA is lower than that of other species reported so far, and further studies are needed.

研究分野：発生生物学

キーワード：アフリカツメガエル ゲノム編集 組織形成 変態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は、古くから脊椎動物のモデルとして初期胚発生、DNA複製、細胞周期、器官形成等々の分野で広く用いられてきた。本種は幼生から成体になる過程で変態を行い、幼生型組織から成体型組織へと劇的に変化させる。この組織再構築を含む成体型組織形成は、甲状腺ホルモン (TH) および TH 受容体 (TR) により制御され、TH の生化学的な効果は TR を介して促進される。脊椎動物は二種類の TR (TR α および TR β) を有し、各 TR の発現分布や発現時期は組織間によって異なっている。しかしながら TR が各組織において、どのような遺伝子を抑制的あるいは促進的に制御することで変態や発生を制御するのか、未解明な点が多く残る。申請者の先行研究から TR α ノックアウトカエルにおいて、後肢の発生速度が促進され、早期に後肢形成が完了することが報告された (図 1: Wen L et al., 2017)。また、変態期には小腸の幼生型上皮細胞が消失し、少数の上皮細胞から成体型の幹細胞が脱分化する。そして新たに生じた成体型幹細胞から、成体型上皮細胞が分化することで小腸が再構築される。このように変態期には成体型組織を形成するために、様々な遺伝子が組織・細胞特異的に発現する事で、同調的な形態変化を生じる。この原理を解明するためには、ゲノム編集技術を用いた逆遺伝学的な解析だけでなく、時期・空間特異的な遺伝子発現制御 (*in vivo* コンディショナルノックダウン: cKD) に関わる技術開発が必要となる。特に発生に関わる遺伝子の欠損個体の多くは胎生致死を示すため、cKD 技術の確立が必須となる。

TR α KOカエルでは
後肢形成が促進される

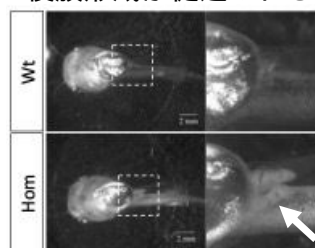


図1: ネットイツメガエル幼生
矢印は発達した後肢を指す

ゲノム編集技術の目覚ましい進歩により、哺乳類にとどまらず魚類でも容易に目的遺伝子への変異および外来遺伝子の挿入が可能となった。両生類 *X. laevis* を用いた cKD 技術 (Cre-loxP, TetOn, Optogenetic etc.) を確立するために、こうしたシステムに関わる外来遺伝子をゲノムに挿入したトランスジェニック (TG) カエルを作製する必要がある。既存の TG *X. laevis* 作製法では、標的遺伝子が *X. laevis* ゲノムにランダムに挿入されるため、外来遺伝子を挿入される領域、転写されるコピー数をコントロールできない。そのためゲノムに挿入した遺伝子が遺伝子サイレンシングを受けず安定して発現する「セーフハーバー領域」を同定し、かつ転写される遺伝子のコピー数をコントロールできる TG 作製法の開発が必要であった (研究成果 1)。

近年、標的となる遺伝子の RNA ターゲット分解を基とした新たな酵素 Cas13 が発見され、ゼブラフィッシュにおいて CRISPR-Cas13d を用いた *in vivo* ノックダウン (KD) が報告された (Kushawar et al., 2020)。しかしながら両生類においても Cas13d が効果的な手法であるかどうか、検証した研究は報告されていない。そこで cKD 技術の確立を最終的な目的として、*X. laevis* の初期胚を用いて、CRISPR-Cas13d による遺伝子ノックダウン効果を検証した (研究成果 2)。

2. 研究の目的

CRISPR-Cas13d を用いた cKD 法を確立するため、CRISPR-Cas9 を用いてセーフハーバー領域にドナー DNA を挿入し、トランスジーン の発現量をコントロールする新規 TG 動物作製法を開発することを目的とした。加えて、CRISPR-Cas13d がアフリカツメガエルにおいても標的遺伝子の mRNA を分解し、機能阻害を引き起こすことができるのか、検証を行った。

3. 研究の方法

本研究ではモデル動物として広く用いられているアフリカツメガエル *Xenopus laevis* を用いて行った。本種は一度の実験で大量の受精卵を得ることができ、CRISPR-Cas9 を用いた高効率なゲノム編集手法が確立されている。

(1) Target integration を基とした新規 TG カエル作製法の開発

アフリカツメガエルで初めてゲノム上のセーフハーバー領域を同定し、同領域に CRISPR-Cas9 を用いてドナーDNA を導入することで、高効率で Tg カエルを作製する手法を開発した (NEXTrans 法)。本手法を用いて作製した TG (F0 個体) を性成熟するまで飼育した。性成熟した F0 個体と野生型個体を交配し、F1 個体を得た。F1 個体におけるレポーター遺伝子の発現を組織特異的な蛍光発現および genomic PCR によるドナーDNA の検出を通じて、組み込んだドナーDNA が次世代に引き継がれる生殖系列伝播を確認した。

(2) アフリカツメガエルの初期胚を用いた CRISPR-Cas13d 有効性の検証

アフリカツメガエルの受精卵に、Cas13d mRNA と *pax6* を標的としたガイド RNA を導入し、その形態学的な変化を解析した。

4. 研究成果

(1) Target integration を基とした新規トランスジェニックカエル作製法 (NEXTrans 法) の開発

Xenopus laevis *tgfbr2l* 遺伝子を標的とした新たな遺伝子挿入法の概略

TGFβ の受容体として報告された *Xenopus* *tgf beta receptor 2 like* (*tgfbr2l*) 遺伝子は、*Xenopus* ゲノムの Chromosome 9_10 (サブゲノム L/S) 上に存在し、それぞれ *tgfbr2l.L* および *tgfbr2l.S* がコードされている。しかし同遺伝子をゲノム編集で破壊しても、*X. laevis* の幼生が正常に発生した。これは Human TGFβ receptor 2 とより相同性の高い *tgfbr2* 遺伝子が Chromosome 6 L/S に存在していることから、*tgfbr2l* 遺伝子の発現の有無は TGF signaling に大きな影響を与えないと考えられた。

そこで *tgfbr2l.L* 遺伝子の exon 4 に CRISPR-Cas9 single guide RNA (sgRNA) を設計し、かつ *tgfbr2l.L* exon 4 の一部断片 (665 bp) と組織特異的プロモーター/蛍光タンパク遺伝子を誘導する外来遺伝子を組み込んだドナーDNA を作製した。*X. laevis* の受精卵に Cas9 タンパク質、sgRNA およびドナーDNA を挿入することで、sgRNA はゲノム上の *tgfbr2l.L/S* 領域とドナーDNA 双方を切断出来る。直鎖化されたドナーDNA は、ゲノム上の *tgfbr2l.L* または *tgfbr2l.S* の exon 4 領域に、非相同末端修復 (NHEJ) により組み込まれる (図 2)。ただし、直鎖化したドナーDNA がどの領域 (*tgfbr2l.L* または *S* あるいは両方) に組み込まれるか、どの向き (順向あるいは逆向) でゲノムに挿入されるかは制御できないため、PCR を用いて確認を行う必要がある。

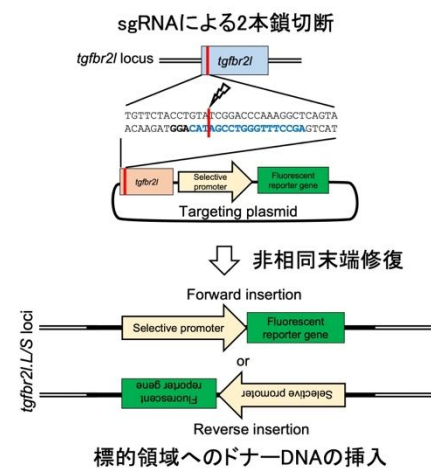


図2 NEXTrans法の概略図

NEXTrans 法による遺伝子導入効率の検証

NEXTrans 法による外来遺伝子の *X. laevis* ゲノムへの導入効率を調べるため、*tgfbr2l.L* 断片を挿入した複数のドナーDNA (NEXTrans vector) を構築した。各 NEXTrans vector には組織特異的な Promoter が組み込まれ、ゲノムにドナーDNA が挿入された際、組織特異的な蛍光シグナルを観察することで、NEXTrans 法の導入効率を解析することができる。今回、鰓と尾で特異的に発現

する Fin and gill keratin (FGK) promoter [*Tg(NEXT-fgk:egfp)*]、全身で発現する CMV promoter [*Tg(NEXT-cmv:tdtomato)*]、および水晶体特異的に発現する Crysterlin (CRY) promoter [*Tg(NEXT-cryga:tdtomato)*]を用いて *NEXTrans* vector を構築し、実験に用いた。各 *NEXTrans* vector と Cas9 RNP を *X. laevis* の受精卵に導入し、数日間培養した。その後、実体蛍光顕微鏡下で組織特異的な蛍光シグナルの有無を確認した。その結果、*Xla.Tg(NEXT-fgk:egfp)*:6.9% (33/477)、*Xla.Tg(NEXT-cmv:tdtomato)*:11.8% (40/339)、*Xla.Tg(NEXT-cryga:tdtomato)*:11.8% (115/970)と高い割合で、強い組織特異的な蛍光シグナルを発する個体が得られた。加えて、強い蛍光シグナルを発する個体から genomic DNA を抽出し、ゲノム領域側とドナーDNA 側に設計した Primer を用いて PCR を行い、ドナーDNA がホストゲノムの *tgfbr2l.L* および *tgfbr2l.S* 領域に挿入されたことを確認した。

生殖系列伝播 (Germline transmission) の確認

TG 動物をライン化する上で、次世代に外来遺伝子が受け継がれ (生殖系列伝播: Germline transmission) 安定して外来遺伝子を発現する (遺伝子サイレンシングを受けない) 必要がある。*NEXTrans* 法で作製した各 TG のオス個体を性成熟が完了するまで飼育し、野生型のメスと交配させた。交配により得られた F1 個体を数日間飼育し、各 TG の組織特異的な蛍光タンパク質発現を解析した。その結果、*Xla.Tg(NEXT-fgk:egfp)*:35.3% (82/232)、59.1% (124/210)、*Xla.Tg(NEXT-cmv:tdtomato)*:71.4% (5/7)、*Xla.Tg(NEXT-cryga:tdtomato)*:60.9% (109/179)と非常に高い生殖系列伝播効率を示した。これにより、*NEXTrans* 法により作製した個体では、外来遺伝子がサイレンシングを受けることなく、次世代でも安定的に外来遺伝子が発現できることが分かった。この知見はすなわち、遺伝子導入の標的領域とした *tgfbr2l* 領域が、*X. laevis* におけるゲノム上のセーフハーバー領域であることを示唆している。*X. laevis* ではこれまでセーフハーバー領域が発見されておらず、世界で初めての報告となる。本成果は国際科学雑誌 *Developmental Biology* 誌にて発表した。

(2) アフリカツメガエルの初期胚を用いた CRISPR-Cas13d 有効性の検証

近年、ゼブラフィッシュにおいて Cas13d を用いた *in vivo* ノックダウン動物の作出が報告され、両生類においても Cas13d が効果的な手法であることが期待される (Kushawar et al., 2020)。そこでアフリカツメガエルの受精卵に、Cas13d mRNA および目の形成を司る *pax6* 遺伝子を標的とした sgRNA を導入し、CRISPR-Cas13d の効果を評価した。その結果、2 細胞期の片側割球に Cas13d mRNA/sgRNAs を導入した際、19.5% (8/41)の個体で片側の目が小さくなる表現系が得られた (図 3)。加えて、*pax6* mRNA の発現量を real time PCR で定量したところ、受精後 24h の個体では野生型と比較して約 32%減少したことが分かった。しかしこの減少は、受精後 48h では野生型個体と同等の発現量にまで回復した。Cas13d mRNA を real time PCR で定量したところ、受精後 24h と比較して 48h の個体では約 80%減少していた。この結果は、受精後 48h 以降には Cas13d mRNA が分解され、標的 mRNA を分解する効率が低下したことを示唆している。これらの結果から、アフリカツメガエルにおける Cas13d の効率を評価するためには、受精後 48h 以内に発現し、かつ組織形成に関わる遺伝子を標的とする、あるいはより厳密に Cas13d と sgRNA の発現を時期特異的に制御する必要があると考えられる。

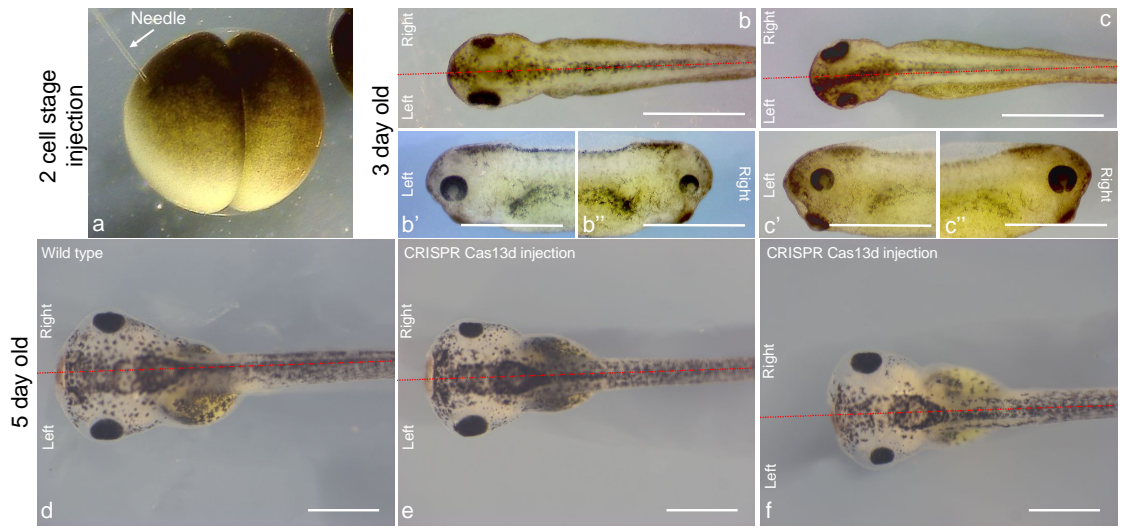


図3：2細胞期の片側割球にCRISPR Cas13d mRNA/sgRNAを注射した際に生じた目の形成不全

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shibata Yuki, Suzuki Miyuki, Hirose Nao, Takayama Ayuko, Sanbo Chiaki, Inoue Takeshi, Umesono Yoshihiko, Agata Kiyokazu, Ueno Naoto, Suzuki Ken-ichi T., Mochii Makoto	4. 巻 489
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-based simple transgenesis in <i>Xenopus laevis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 76 ~ 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2022.06.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田侑毅、餅井真、鈴木賢一
2. 発表標題 アフリカツメガエルの新たなトランスジェニック動物作製法 NEXTrans (New and Easy <i>Xenopus</i> Transgenesis at a safe harbor site)
3. 学会等名 第93回日本動物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田侑毅、餅井真、鈴木賢一
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いた新規トランスジェニックカエル作製法の開発
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会およびシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田侑毅、餅井真、鈴木賢一
2. 発表標題 新規トランスジェニックカエル作製法（NEXTrans）の開発とその応用
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会およびシンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------