

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：63801

研究種目：奨励研究

研究期間：2020～2020

課題番号：20H00973

研究課題名 有用ゼブラフィッシュ作製のための新しい遺伝子改変技術の開発

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） 480,000 円

研究成果の概要：国立遺伝学研究所では、細胞・組織特異的にGal4を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを2000系統以上作製し、国内外の研究者に役立ててきた。本研究はそれらに着目し、Gal4系統がゲノム上にもつGal4遺伝子を標的として、CRISPR/Cas9法を用いた部位特異的ノックインによる有用遺伝子への置き換えを目指した。予備実験として、Gal4系統におけるGal4遺伝子へのmScarlet遺伝子を含むドナーDNAのノックインを試みたところ、291個体中15個体がmScarletを発現した。そのうち3個体を解析したところ、3個体ともにドナーDNAのGal4遺伝子への導入が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゼブラフィッシュGal4系統は、Gal4-UAS法によって目的とする遺伝子を様々な細胞や組織において発現するための系統である。本研究ではCRISPR/Cas9法によって、Gal4系統がゲノム上にもつGal4遺伝子への外来遺伝子のノックインに成功した。本研究で得られた知見を発展させることで、Gal4系統がもつGal4遺伝子を他の遺伝子発現制御システム、TetONシステムやCre-loxPシステム等の有用遺伝子へ置き換えることができると考えられる。これにより標的とする細胞・組織を多種多様な条件下で操作できる可能性が広がる。

研究分野：分子生物学、遺伝子工学

キーワード：ゼブラフィッシュ 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、基礎研究のみならず医療、創薬研究にいたるまで幅広く用いられる優れたモデル脊椎生物である。これらの多岐にわたる研究において、目的とする臓器や組織を自由自在に操作・改変できる技術が求められている。本研究は、研究代表者の所属研究所が遺伝子トラップ法により作製してきた様々な細胞・組織で転写因子 Gal4 を発現する世界最大規模のトランスジェニックゼブラフィッシュバイオリソース (Gal4 系統) を活用し、目的とする細胞や組織を改変するための新技術の開発を目指す。

2. 研究成果

CRISPR/Cas9 法を用いた遺伝子ノックインによって、Gal4 系統がもつ Gal4 遺伝子を他の有用遺伝子へ置き換えることで、様々な細胞・組織において、その有用遺伝子を発現させることが可能となる。まず予備実験として、Gal4 系統である gSAIzGFFD2921B と gSAIzGFFD2930B を用いて、Gal4 遺伝子への赤色蛍光タンパク質 mScarlet 遺伝子のノックインを検討した(図 1)。

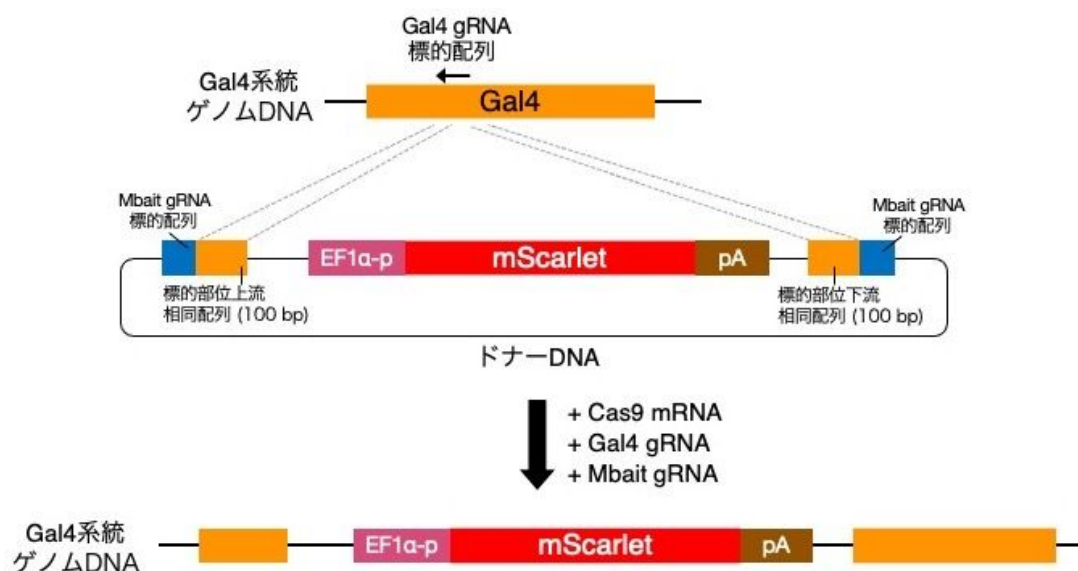


図 1. Gal4 遺伝子へのノックイン

これまでに得た知見から、遺伝子ノックインの効率は gRNA の切断活性に依存することが示されているため、まず、切断活性が高い gRNA を選定した。Gal4 遺伝子を標的とする gRNA を 7 つ作製し、それぞれを Cas9 mRNA とともに受精卵に顕微注入後、翌日、注入胚からゲノム DNA を抽出し、ヘテロ二本鎖移動度解析により各 gRNA の切断活性を比較した(図 2)。この結果から、切断活性が最も高い gRNA 7 をノックインに使用することにした。

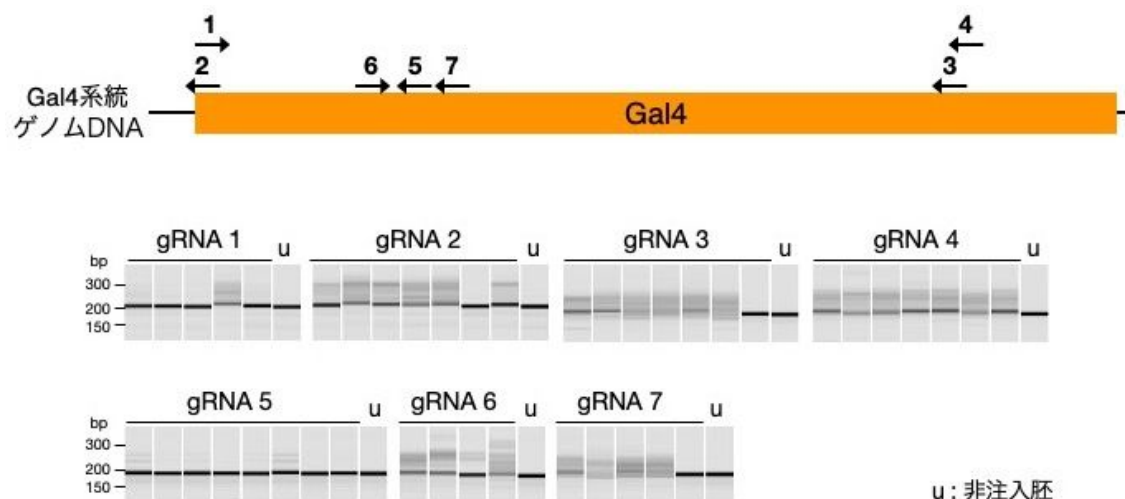


図 2. Gal4 遺伝子を標的とする gRNA の切断活性の比較

ドナーDNAとして、EF1 α プロモーター下につなげた mScarlet 遺伝子、その前後に標的部位の上流及び下流各 100 塩基の相同配列、さらにその外側に Mbait gRNA の標的配列を付加したコンストラクトを構築した(図 1)。

gSAIzGFFD2921B もしくは gSAIzGFFD2930B 由来の受精卵に、Cas9 mRNA、Gal4 gRNA 7、ドナーDNA、Mbait gRNA を顕微注入した。その結果、注入胚 291 個体のうち 15 個体が受精後 5 日目において、全身で mScarlet を発現した。そのうち 3 個体からゲノム DNA を抽出し、シーケンス解析したところ、3 個体ともにドナーDNA が標的部位に導入されていることが認められ、ドナーDNA の Gal4 遺伝子へのノックインに成功したことが示された。

本研究で得られた成果をもとに、今後、Gal4 系統における Gal4 遺伝子とその近傍の配列を CRISPR/Cas9 法によって有用遺伝子へ置き換える手法を確立する。

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)