

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06807

研究課題名(和文) アデノウイルスベクター及びCRISPRを用いた受精卵における遺伝子組換えの効率化

研究課題名(英文) Establishment of an efficient gene knock-in method using adenoviral vector and CRISPR

研究代表者

吉田 哲 (Yoshida, Tetsu)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：00365438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：従来、ノックイン動物を用いる際はES細胞にターゲティングベクターを導入し、ノックインされたことにより薬剤耐性になったものを選択することにより選別する方法が採用されてきた。しかし、ES細胞の性質の違いにより、この方法はマウス以外の動物では不可能であるため、CRISPRとドナーDNAを受精卵に導入する方法が採用されている。非ヒト霊長類モデル動物であるマーモセットは、得られる受精卵の数が他の動物と比べて非常に少なく、ノックイン効率を上昇させる必要性が高い。そこで、マーモセットES細胞を用いて組換えの頻度を上昇させる遺伝子の探索を行った。

研究成果の概要(英文)：Knock-in animals have been made by inducing gene targeting vector with a drug-resistant gene cassette into ES cells, followed by the drug selection. Next, chimera animals are generated using the knock-in ES cells, though the method can be applicable only for mice. Thus, we have to knock-in a gene in the genome of fertilized eggs to make knock-in marmosets. Since marmoset, a non-human primate model animal, ovulates fewer eggs than other animals, it is essential to get high rate of gene knock-in. Screening of the genes, including adenoviral coding genes, enhancing homologous recombination have been performed.

研究分野：ゲノム編集

キーワード：マーモセット ノックイン

1. 研究開始当初の背景

トランスジェニック、ノックアウト動物を作製することが可能となったことにより、マーモセットはマウスに替わる新しい生命科学、特に脳神経科学のモデル動物として注目されている。しかし、遺伝子ノックインについては、未だ報告がなかった。神経変性疾患モデルの作製や、神経伝達物質特異的ニューロンのマッピングなどを行う際、ノックイン技術は必須である。そこで、申請者は遺伝子ノックインマーモセットを作製することを試みた。

2. 研究の目的

外来遺伝子がゲノムにノックインされるためには、2回の相同組換えを介するため、ノックイン効率を上げるためには、相同組換えの効率を上げることが必須となる。

ヒト iPS 細胞などで、アデノウイルスをドナーDNAとして用いることにより、ノックイン効率が高くなることが報告されている。そこで、なぜ、アデノウイルスをドナーDNAとして用いることにより組換え効率が上がるのかを解析するとともに、その機構がマーモセットの卵細胞においても有効であるかどうかを確認する必要がある。

そこで、本研究の目的は、アデノウイルスから組換え効率の上昇させる因子を単離し、それをマーモセット細胞に導入し、マーモセット細胞でも組換え効率を上昇させることを確認することとした。

3. 研究の方法

遺伝子ノックインマーモセットの作製は、卵細胞にドナーDNAとよばれるノックインしたい外来遺伝子を持つDNA断片、CRISPRとよばれるゲノム上の任意の配列を切断する酵素を導入することにより行われる。しかし、マーモセットの卵細胞は得られる数に限りがあることから、本研究では、卵細胞と性質が類似しているES細胞を用いることとした。

マーモセットの卵細胞に、ドナーDNA、CRISPRおよびアデノウイルスにコードされている組換え効率を上げることが予想させる遺伝子を発現させるDNA(発現ベクター)を導入し、その因子がノックイン効率を上げるかどうかを確かめる。

4. 研究成果

アデノウイルスにコードされる、相同組換えに関連すると考えられる因子の発現ベクターを作製し、組換え効率を上げるかどうか、確認した。その結果、非相同末端結合修復とよばれるDNA修復機構を抑制する因子にノックイン効率を上昇させる活性があることが明らかとなった。

現在、この成果を公表するために論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

1. Ogawa Y, Kakumoto K, Yoshida T, Kuwako KI, Miyazaki T, Yamaguchi J, Konno A, Hata J, Uchiyama Y, Hirai H, Watanabe M, Darnell RB, Okano H, Okano HJ. (2018) Elavl3 is essential for the maintenance of Purkinje neuron axons. Sci Rep. 査読有、8:2722. DOI:

10.1038/s41598-018-21130-5

2. Okata S, Yuasa S, Suzuki T, Ito S, Makita N, Yoshida T, Li M, Kurokawa J, Seki T, Egashira T, Aizawa Y, Kodaira M, Motoda C, Yozu G, Shimojima M, Hayashiji N, Hashimoto H, Kuroda Y, Tanaka A, Murata M, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kamiya K, Furukawa T, Fukuda K. (2016) Embryonic type Na⁺ channel α -subunit SCN3B masks the disease phenotype of Brugada syndrome. Sci Rep. 査読有、6:34198. DOI: 10.1038/srep34198

[学会発表](計 7件)

1. Tetsu Yoshida, Noriyuki Kishi, Hideyuki Okano
Screening of the factors enhancing gene recombination using marmoset ES cells
The 9th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaScience -Genome Editing Towards Medicinal Application- Center for Learning and Innovation Takeda Pharmaceutical Company, Ltd. (Osaka, Japan), 2018. 2.7-8

2. 吉田哲、岡原純子、岡野栄之
マーモセット受精卵を用いた遺伝子ノックイン胚の作製

- 第7回 日本マーモセット研究会大会、
京都大学芝蘭会館稲盛ホール（京都）、
2018年1月18-20日
3. 吉田哲、岸憲幸、岡野栄之
マーモセット ES 細胞を用いた遺伝子組
換えを亢進させる因子の探索
第2回 日本ゲノム編集学会、千里ライ
フサイエンスセンター（大阪）、2017年6
月28-30日
4. 吉田哲、岸憲幸、岡野栄之
マーモセット ES 細胞を用いた遺伝子組
換えを亢進させる因子の探索
第6回 日本マーモセット研究会大会、
東京大学農学部弥生講堂（東京）、2016
年12月12-14日
5. 吉田哲、岸憲幸、佐々木えりか、岡野栄
之
CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子ノックイン
マーモセットの作製
第1回 日本ゲノム編集学会、広島国際
会議場（広島）、2016年9月6-7日
6. Tetsu Yoshida, Noriyuki Kishi, Erika
Sasaki, Hideyuki Okano
Generation of gene knock-in marmosets
using CRISPR/Cas9 system
第22回 日本遺伝子細胞治療学会、虎ノ
門ヒルズ（東京）、2016年7月28-30日
7. 吉田哲、伊東多恵子、岸憲幸、佐々木え
りか、岡野栄之
CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子ノックイン
マーモセットの作製
第5回 日本マーモセット研究会大会、
東京慈恵会医科大学（東京）、2016年1
月27-28日

〔図書〕（計 1件）

「第7章 精神・神経疾患領域におけるモ
デル動物の作成法と最新メカニズム・創薬
応用 第2節 遺伝子改変マーモセットを
用いた精神・神経疾患研究への応用」 吉
田哲「～最新のゲノム編集/iPS細胞を含めた
～動物/疾患モデルの作成技術・病態解析・
評価手法」技術情報協会（2017）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 哲 (YOSHIDA, Tetsu)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総
合研究センター・研究員
研究者番号：00365438

(2) 研究分担者

三谷 幸之介 (MITANI, Kohnosuke)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：10270901

汲田 和歌子 (KUMITA, Wakako)
公益財団法人実験動物中央研究所・応用発
生学研究センター・研究員
研究者番号：50549128

徳永 暁憲 (TOKUNAGA Akinori)
国立研究開発法人国立長寿医療研究セン
ター・その他部局等・室長
研究者番号：70549451

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()