

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07780

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いた核膜孔構成因子レポーターマウスの作出とその機能解析

研究課題名(英文) Nucleroprin reporter mice with the genome editing technology for the nuclear pore complex research

研究代表者

秋山 耕陽 (Akiyama, Kouyou)

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・特任助教

研究者番号：20515142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：核膜孔は、核の形態維持や核-細胞質間の物質輸送に寄与する真核生物に必須の構造であるが、必ずしも核膜孔の機能がそれらに限られないことが示唆されている。特に、核膜孔構成因子Tmem48を欠損する突然変異マウスは、Tmem48がユビキタスに発現しているにもかかわらず、骨格形成と配偶子形成にのみ異常を呈する。本研究では、ゲノム編集技術を利用することでTmem48と抗体タグもしくは蛍光たんぱく質の融合遺伝子を発現するレポーターマウスを作出し、Tmem48の機能を明らかにすることで核膜孔の全く新しい役割の解明を目指した。

研究成果の概要(英文)：The nuclear pore complex has an important role in various biological natures, such as nuclear form maintenance, the nucleo-cytoplasmic transport and nuclear morphology assembly, but it is suggested that the function of the nuclear pore complex is not necessarily limited to them. It is strongly suggested that Tmem48 null mice phenotypes. Tmem48 is one of nucleoporins, which are the constituent building blocks of the nuclear pore complex. Tmem48 null mice show abnormalities of both the axial skeleton and gametogenesis, although Tmem48 is ubiquitous expression. In this study, it is proposed to elucidate the role of the nucleoporin in vivo by nucleroprin reporter mice, which expressed the fusion gene of Tmem48 and an antibody tag protein or a fluorescence protein by using the genome editing technique, such as CRISPR/Cas9 system.

研究分野：実験動物学

キーワード：実験動物学 遺伝学 発生工学

1. 研究開始当初の背景

核膜孔は、約30種の核膜孔構成因子によって構築される細胞質と核内部をつなぐ細胞小器官である。これまで核膜孔に関する研究は、主に株化培養細胞や出芽酵母を用いて進められており、核の構造維持や核-細胞質間の物質輸送に必須であることがわかっているが、必ずしも核膜孔の機能がそれらに限られないことが近年示されてきている[Capeison et al. 2009. EMBO Rep]。一方で、核膜孔の*in vivo*における機能は、核膜孔構成因子のノックアウトマウスの多くが発生初期で致死になるなどの問題から十分に解明できていない。申請者は、核膜孔構成因子の一つである*Tmem48* 遺伝子に突然変異が生じた*sks* マウスでは、骨格形成と配偶子形成に異常が生じることを見出している[Akiyama et al. 2013, Akiyama et al. 2014]。*sks*マウスは、精子形成が相同染色体の対合に異常が生じることで減数分裂第一分裂前期パキテン期以降の発生が停止するため、無精子症に至る。加えて、*sks*マウスのパキテン期精母細胞と胎仔線維芽細胞では、高頻度で核に形態異常が生じることを明らかにしている。これらことは、*Tmem48* が他の核膜孔構成因子と同様に核の形態維持に不可欠であることを示している。加えて、*sks*マウスの表現型は、核膜孔構成因子には組織および細胞特異的な機能を担っていることを明確に示していることから、*Tmem48* の機能を解明することは、生体機能を司る全く新しい制御機構を解明することに繋がるだけでなく、核膜孔が担う役割を明らかにすることにも大きく貢献できる。これまでに*Tmem48* は、申請者は*Tmem48* の機能を明らかにすることを継続的に試みているが、相互作用するタンパク質や細胞内局在など具体的には示すことができていない。その原因の一つに*Tmem48* が非常に疎水性の強いタンパク質であることから優良な抗体の作成ができていないことが挙げられる。これらのことから、蛍光タンパク質も

しくは抗体Tagと*Tmem48*の融合タンパク質を発現するレポーターマウスの作出することができれば*Tmem48*の機能をより明確なものとすることができ、核膜孔構成因子が担う全く新しい制御機構を見出すことに繋がると考えた。

2. 研究の目的

遺伝子の発現解析などに利用する融合タンパク質を発現する遺伝子改変マウスはBAC-DNAを利用したトランスジェニックマウスが利用されることが多いが、トランスジェニックマウスでは導入遺伝子のコピー数をコントロールすることが難しい。近年開発され、世界的に注目されているCRISPR/Cas9システムに代表されるゲノム編集技術を利用することができれば、1コピー/染色体の融合タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを作出することができる。CRISPR/Cas9システムは、細菌における獲得免疫系の防御システムを応用した全く新しいゲノム編集技術であり、第二世代遺伝子操作技術と呼ばれるZFNsやTALENsといった人工DNAヌクレアーゼを用いた遺伝子改変動物の作出法に続いて開発された第三世代遺伝子操作技術である。これらゲノム編集技術は、これまで不可能とされていた様々な生物種の細胞や個体における新しいゲノム編集技術として世界的に注目されている。事実、わずか数年の間に様々な生物種における遺伝子改変の報告がなされている[Peng et al. 2014. Dev., Harrison et al. 2014. Dev & Genes]。以上のことから申請者は、本研究課題『ゲノム編集技術を用いた核膜孔構成因子レポーターマウスの作出とその機能解析』を計画し、本研究において、以下の実験により、核膜孔構成因子*Tmem48*の役割を明確にすることを目指した。

3. 研究の方法

- (1) *Tmem48*の翻訳開始部位および翻訳停止部位を標的としたguide RNAの構築
ゲノム編集の標的配列探索Webツールを利用し、*Tmem48*遺伝子の翻訳開始部

位もしくは翻訳停止部位の標的配列を探索した。その後、*in vitro*転写法により guide RNAを合成した。

- (2) Cas9 mRNAの合成
pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9(A ddgene 42230)を鋳型として、プロモーター領域を含むCas9の翻訳領域の全域約4.3kbをPCRにより増幅し、PCR産物を鋳型として*in vitro*転写法によりRNAを合成することでCas9 mRNAを作成した。
- (3) ドナーベクターの構築
Tmem48_N/pUC19の作成
C57BL6/Jマウス由来の*Tmem48*遺伝子全長を含むBAC-DNA (RP23-259013)を鋳型として、Tmem48の翻訳開始部位を含むエクソン1を含む約4kbをPCRによって増幅し、pUC19のマルチクローニングサイトに挿入することでクローニングした。その後、プラスミドを単離し、シーケンス解析を実施することで塩基配列を精査した。
Tmem48-N+AcGFP1/pUC19の作成
pAcGFP1を鋳型としてAcGFP1の翻訳領域全長のみをPCRによって増幅し、で作成したTmem48_N/pUC19に含まれる*Tmem48*遺伝子の翻訳開始部位に挿入するようにサブクローニングした。その後、プラスミドを単離し、シーケンス解析を実施することで塩基配列を精査した。
Tmem48-N+3xFLAG/pUC19の作成
p3xFLAG-CMVを鋳型として3xFLAGの翻訳領域全長のみをPCRによって増幅し、で作成したTmem48_N/pUC19に含まれる*Tmem48*遺伝子の翻訳開始部位に挿入するようにサブクローニングした。その後、プラスミドを単離し、シーケンス解析を実施することで塩基配列を精査した。

4. 研究成果

- (1) Tmem48の翻訳開始部位および翻訳停止部位を標的としたguide RNAの構築
ゲノム編集の標的配列探索Webツールを利用し、*Tmem48*遺伝子の翻訳開始部位もしくは翻訳停止部位の標的配列を探索した。標的配列探索Webツールによって探索アルゴリズムが異なることから本研究では、CRISPR DESIGN (<http://crispr.mit.edu>)、ZiFiT Targeter software(<http://zifit.partners.org>)およびChapChop(<http://chopchop.cbu.uib.no>)を利用した。その結果、当該遺伝子の翻訳停止部位の周辺にはいずれの探索ツールを利用してもguide RNAが機能しうる適切な配列が存在しないことが判明した。一方で翻訳開始部位の周辺にはguide RNAが機能しうる適切な配列が多数予測された。予測された配列のうち、off-targetと呼ばれる標的配列と相似した配列を切断する可能性の低い9種の配列を利用することとした。それぞれの配列について*in vitro*転写法により合成したguide RNAは吸光度測定により濃度を調べたのち500 μ g/mlに調整し、電気泳動することで精製度を確認したのち-80にて保存した。
- (2) Cas9 mRNAの合成
*in vitro*転写法により合成したCas9 mRNAは吸光度測定により濃度を調べたのち1000 μ g/mlに調整し、電気泳動することで精製度を確認したのち-80にて保存した。
- (3) ドナーベクターの構築
Tmem48_N/pUC19の作成
Tmem48の翻訳開始部位を含むエクソン1を含む約4kbをpUC19にクローニングしたのち、シーケンス解析を実施し、目的とする配列と完全に一致したプラスミドをTmem48_N/pUC19とした。

Tmem48_N/pUC19は吸光度測定により濃度を調べたのち1000µg /mlに調整し、電気泳動することで精製度を確認したのち-80にて保存した。

Tmem48-N+AcGFP1/pUC19の作成

Tmem48_N/pUC19に含まれる*Tmem48*遺伝子の翻訳開始部位にAcGFP1が挿入するようにサブクローニングしたのち、シーケンス解析を実施し、目的とする配列と完全に一致したプラスミドをTmem48-N+AcGFP1/pUC19とした。

Tmem48-N+AcGFP1/pUC19は吸光度測定により濃度を調べたのち1000µg /mlに調整し、電気泳動することで精製度を確認したのち-80にて保存した。

Tmem48-N+3xFLAG/pUC19の作成

Tmem48_N/pUC19に含まれる*Tmem48*遺伝子の翻訳開始部位にAcGFP1が挿入するようにサブクローニングしたのち、シーケンス解析を実施し、目的とする配列と完全に一致したプラスミドをTmem48-N+3xFLAG/pUC19とした。

Tmem48-N+3xFLAG/pUC19は吸光度測定により濃度を調べたのち1000µg /mlに調整し、電気泳動することで精製度を確認したのち-80にて保存した。

本研究計画を実施するためには、実験動物や受精卵の操作を含め、その多くが毎日定時に取扱うことが必要不可欠となるだけでなく、長期の実施期間や多くの試行回数も必要とされることが予想されていたが、研究計画期間を通して、本来業務が予想以上に時間を要しただけでなく、実験動物や受精卵を取扱うことが求められる時間帯と重複することが多かったため、当初に予定していた研究成果を得ることができなかった。研究期間の延長も検討していたが、平成29年度末で任期満了退職となったため、もう一年延長して研究を実施することもできなかった。

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[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

秋山 耕陽 (Akiyama, Kouyou)
岡山大学・自然生命科学研究支援センター・特別契約職員(助教)
研究者番号：20515142

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()