

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15552

研究課題名(和文) CRISPR/Casシステムを用いた5-HT受容体ノックアウト法の確立への挑戦

研究課題名(英文) Challenge for establishing tools to knock out 5-HT receptor genes using CRISPR/Cas9

研究代表者

大村 優 (Ohmura, Yu)

北海道大学・医学研究科・助教

研究者番号：80597659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：セロトニン(5-HT)受容体の種類は14種類もあり、従来の遺伝子操作法では全種類を網羅するにはコストが大きすぎる。そこで本研究ではCas9を発現する遺伝子改変マウスの脳に5-HT1A受容体の配列に対応したgRNAを発現するウイルスベクターを注入することで低コストな5-HT受容体遺伝子ノックアウト法を確立することを目的とした。ウイルスベクター投与マウスにおいて、5-HT1A受容体作動薬投与に対する体温低下反応が減弱した。また、ミスマッチ切断酵素による解析を行い、変異を誘発できていることを確認した。しかし、パッチクランプ法を試みた際には細胞の状態が悪く、記録を長時間取得することができなかった。

研究成果の概要(英文)：Because there are 14 subtypes of 5-HT receptor, conventional gene manipulations will require us to pay too much cost for examining all the subtypes. The purpose of this study was to establish a low-cost method for knocking out 5-HT receptor genes by injecting virus vector to the brain of Cas9-expressing mice. The hypothermic effect of serotonin 5-HT1A receptor agonist was attenuated in virus-injected mice. Analysis using DNA mismatch cleavage enzyme confirmed mutation of 5-HT1A receptor gene. However, we failed to obtain electrophysiological evidence using patch clamp methods because the condition of cells was not good.

研究分野：精神薬理学

キーワード：ゲノム編集 セロトニン 体温

1. 研究開始当初の背景

代表的抗うつ薬であるセロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)は細胞外セロトニン(5-HT)濃度を増加させ、非定型抗精神病薬はセロトニン 5-HT_{2A} 受容体拮抗作用を持ち、抗不安薬のタンドスピロンは 5-HT_{1A} 受容体の部分作動薬である。このように 5-HT 受容体に作用する薬が広く使用されているにも関わらず、これらの薬の正確な作用機序は未だ明らかではなく、各 5-HT 受容体の正確な生理学的役割も不明な点が多い。多くの研究者がこの問題に取り組んできたにも関わらず、未だ解明に至らない理由は主に以下の4点であると考えた。

- (1) 5-HT 受容体は種類が多い上に構造も類似しているため、薬理学的手法による選択的操作に限界がある(例: 5-HT_{1A} 受容体に作用する薬が 5-HT₇ 受容体にも作用してしまう、など)。
- (2) 従来遺伝子操作法は選択性が高い一方で 5-HT 受容体の全種類を網羅するには時間的・人的・金銭的コストが大きすぎる。
- (3) 2. より派生する問題として、遺伝子改変動物が一部の研究者のほぼ専有となっているため、再現性の問題がある。
- (4) 従来遺伝子改変動物では脳部位、細胞種選択的に受容体発現を操作するのが難しい、もしくは時間的・人的・金銭的コストが大きい。

これらの問題は技術的な問題であり、当時の研究者には他に手段がなかった。しかし近年、CRISPR/Cas9 システムの発展により、これらの問題を全て解決できる可能性が生じた(Jinek et al. 2012, Science)。この方法は真正細菌や古細菌が有する獲得免疫(ファージなどを介した外来 DNA の排除機構)を応用した遺伝子編集技術である。標的とする遺伝子配列に対応するガイド配列と sgRNA, Cas9 タンパクといった少数のモジュールによって、PAM 配列(NGG)さえ含めばどの遺伝子配列も切断できるため、理論上は遺伝子ノックアウトが低コストで可能である(下図1参照)。

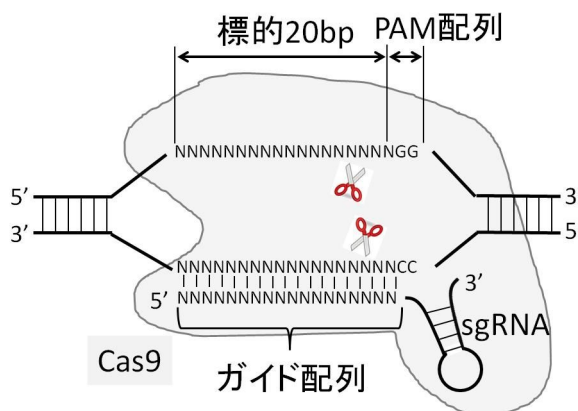


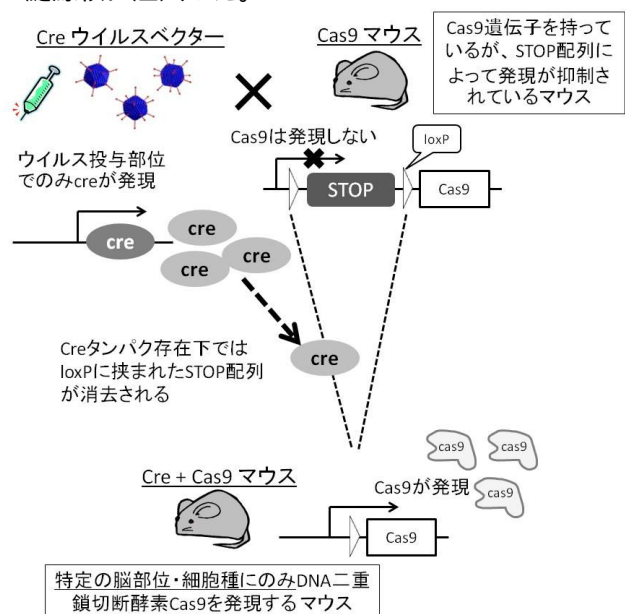
図1: CRISPR/Cas9による遺伝子切断様式の模式図

2. 研究の目的

本研究の目的はこの新技术を用いた 5-HT 受容体のノックアウト法を確立することである。少なくとも1つの受容体について十分な機能欠損を引き起こすことを目標とし、できる限り多くの 5-HT 受容体についてノックアウト法確立を目指す。本研究ではごく最近作製された, cre タンパク発現依存的に DNA 二重鎖切断酵素である Cas9 タンパクを発現する遺伝子改変マウスを用いる(Platt et al. 2014, Cell)。このマウスとウイルスベクター投与を組み合わせることにより、前述のコストの問題を解決することを試みる。この方法であれば系統維持が必要な Cas9 マウスのみで、後はウイルスベクターを各 5-HT 受容体について用意すればよい。また、成熟動物の体細胞にゲノム編集を起こすので、誘導した変異は次世代に受け継がれず、倫理的問題をあまり考えなくて良くなる点もこの方法の利点である。

3. 研究の方法

DNA 二重鎖切断酵素である Cas9 タンパクを cre タンパク存在下で発現する遺伝子改変マウス(Platt et al. 2014, Cell)を用いる。5-HT 受容体遺伝子ノックアウト法確立に当たり、まずは表現型が捉えやすい 5-HT_{1A} 受容体を標的として、アデノ関連ウイルス(AAV)ベクターを連携研究者の協力を得て作製する。Plattらが使用した AAV ベクターのコンストラクトが addgene より入手可能なので、コンストラクトはそのまま既報告のもの(AAV:ITR-U6-sgRNA(backbone)-hSyn-Cre-2A-EGFP-KASH-WPRE-shortPA-ITR)を利用する。Backbone を標的配列に置き換えた上で、ウイルスベクターをマウス脳内に投与する(図2参照)。今回は 5-HT_{1A} 受容体発現の多い背側縫線核に注入した。



特定の脳部位・細胞種にのみDNA二重鎖切断酵素Cas9を発現するマウス

図2. Cas9マウスとウイルスベクターの組み合わせによる脳部位・細胞種特異的ゲノム編集法の概略図。実際にはウイルスベクターにsgRNAとガイド配列も同時に搭載し、図1で示した状況を脳内で生じさせる。

(1) Cas9 によって遺伝子を切断できたかどうかは、ミスマッチ検出酵素によるアッセイを用いて評価する。Cas9 によって目的遺伝子の塩基配列が切断されたならば、その後 DNA 修復機構によって非相同末端結合が高確率で生じるはずである。その結果として生じるミスマッチを認識して酵素（今回は Guide-it Resolvase を使用。Guide-it mutation detection kit の説明に従い実施した）が二本鎖のミスマッチ部位を切断する。その後電気泳動にかければ、(Cas9 による切断→非相同末端結合があったならば)切断バンドを得ることができる。

(2) 5-HT_{1A} 受容体機能欠損の評価には、1) 5-HT_{1A} 受容体作動薬投与による体温低下効果の減弱、2) 縫線核 5-HT 神経細胞の発火率低下などを指標として用いる (Richardson-Jones et al. 2010, Neuron)。1)の体温測定は覚醒下で行い、Microcomputer Thermometer (Physitemp, Model 7001H)を直腸に挿入することで実施した。直腸挿入の際はプローブにワセリンを塗ることで滑りを良くし、マウスに過度のストレスを与えないよう配慮した。体温測定は 10 分ごとに実施した。5-HT_{1A} 受容体作動薬は 8-OH-DPAT を用いた。2)の発火率評価には脳スライスを用いたパッチクランプ法を適用し、主に分担者が実施した。

4. 研究成果

(1) Cas9 による遺伝子切断の確認
脳スライスからウイルスベクターを投与した脳領域（今回は背側縫線核）をメスで切り出し、ゲノム抽出後 PCR にて増幅した。今回のプライマー設計では増幅産物はおよそ 640bp であり、目的の配列に変異が導入されると 370bp と 270 bp の位置に切断バンドが観察されるはずである。下図のように、予測通りの位置に切断バンドを観察することができた（図 3 参照）。

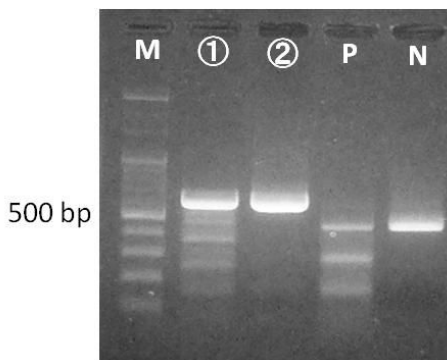
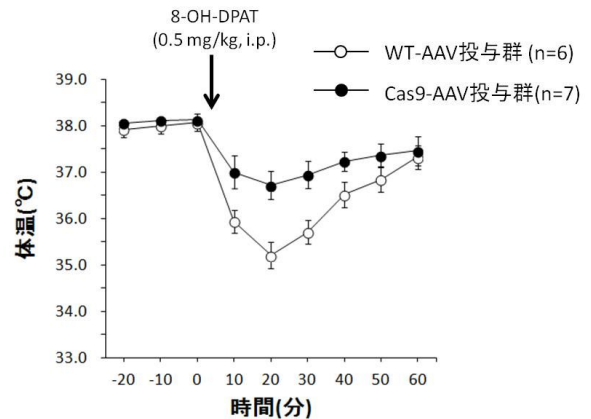


図3. Guide-it Resolvaseによる遺伝子切断の確認。M: DNAマーカー(100 bpごとにバンド), ①:脳サンプル(resolvase有),②:脳サンプル(resolvase無し),P: ポジティブコントロール, N: ネガティブコントロール

(2) 5-HT_{1A} 受容体機能欠損の評価

5-HT_{1A} 受容体作動薬投与による体温低下効果の減弱
Cas9 マウスにウイルスベクターを投与した場合において、野生型マウスと比べて 5-HT_{1A} 受容体作動薬である 8-OH-DPAT の腹腔内投与(0.5 mg/kg)に対する直腸温の低下反応が有意に減弱した（図 4）。

図4. CRISPR/Cas9による背側縫線核5-HT_{1A}受容体ノックアウトは5-HT_{1A}受容体作動薬による体温低下作用を減弱する



両群とも背側縫線核にAAV_{DJ}:ITR-U6-sgRNA(htr1a)-hSyn-Cre-2A-EGFP-KASH-WPRE-shortPA-ITRを300 nL投与し、5週間後に覚醒下で直腸温を10分ごとに測定。

縫線核 5-HT 神経細胞の発火率低下

背側縫線核を含む脳スライスにパッチクランプ法を試みた際にはウイルスを投与した場合に神経細胞の状態が悪く、記録を長時間取得することができなかった。短時間の記録は可能であったが、5-HT_{1A} 受容体作動薬を還流した後に wash out するという一連の実験を完了するまで神経細胞の状態を良好に保つことができなかった。この問題については、スライスの切り方、培養溶液の変更など様々な対処方法を試みたが上手くいかなかった。最終的にはウイルスベクターの濃度を薄めることで若干の改善が見られたが、十分な証拠を得ることができないまま助成期間が終了した。

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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

大村 優、吉田隆行、山中章弘、吉岡充弘、Cas9 発現マウスを用いたセロトニン受容体遺伝子編集方法の確立に向けて、第 1 回日本ゲノム編集学会、2016 年 9 月 6 日、広島

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 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 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

大村 優 (OHMURA Yu)
北海道大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：80597659

(2) 研究分担者

吉田 隆行 (YOSHIDA Takayuki)
北海道大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：60374229

(3) 連携研究者

山中 章弘 (YAMANAKA Akihiro)
名古屋大学・環境医学研究所・教授
研究者番号：60323292

(4) 研究協力者

()