

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：63801

研究種目：奨励研究

研究期間：2019

課題番号：19H00313

研究課題名：ゼブラフィッシュにおける CRISPR/Cas9 法を用いた遺伝子ノックインの最適化

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）：540,000 円

研究成果の概要：ゼブラフィッシュにおける CRISPR/Cas9 法による遺伝子ノックインの効率向上を目指し、研究代表者の所属研究所が保有するゼブラフィッシュバイオリソースを用いて遺伝子ノックインの最適化を検討した。しかしながら、いずれの条件でも標的配列への遺伝子ノックインは認められなかった。標的配列の切断効率が低いことが原因であると考えられたため、標的配列を変更し、引き続き遺伝子ノックインの最適化を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゼブラフィッシュにおいて、CRISPR/Cas9 法による遺伝子ノックアウトの効率は非常に高い。しかし一方で、遺伝子ノックインの効率が低いことが問題となっている。そのため、この問題が解決できれば、幅広い分野の研究の発展が期待される。研究期間内で効率的な遺伝子ノックインの実現には至らなかったが、その要因を見出すことできたため、検証を続ければ遺伝子ノックインの最適化は可能と考える。

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 遺伝子ノックイン バイオリソース

1. 研究の目的

CRISPR/Cas9 法は DNA 切断酵素 Cas9 の mRNA もしくは Cas9 タンパク質と、標的配列に結合する gRNA を受精卵に微量注入するだけで、遺伝子の破壊（遺伝子ノックアウト）や外来遺伝子の挿入（遺伝子ノックイン）を行うことができる。モデル脊椎動物ゼブラフィッシュにおいて、CRISPR/Cas9 法による遺伝子ノックアウトの効率は非常に高い。しかし一方で、遺伝子ノックインの効率が低いことが問題となっている。遺伝子ノックインの技術はヒト疾患の遺伝子変異をもつ疾患モデル作製に必要であるため、効率の向上が求められている。

本研究はこの問題を解決するために、研究代表者の所属研究所がバイオリソースとして保有するトランスジェニックゼブラフィッシュを用いてノックインの最適化を図り、効率の向上を目指す。

2. 研究成果

トランスジェニックゼブラフィッシュのゲノム上の任意の DNA 配列へ任意の遺伝子を導入することを計画し、効率的なノックインを可能にする条件を検討した。実際の実験では、1 日齢胚の脳で GFP を発現する系統 (HGn12C) を使用し、ToI2 配列間へ視覚化が容易な赤色蛍光タンパク質 mScarlet 遺伝子の挿入を試みた (図 1)。

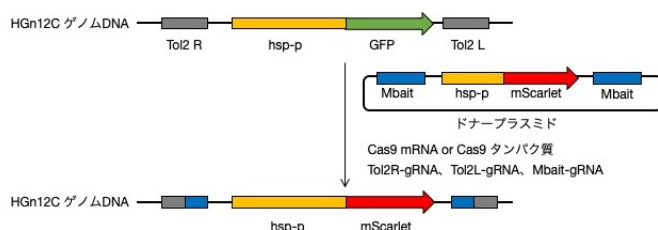


図 1. HGn12C 系統への遺伝子ノックイン

(1) T7 RNA ポリメラーゼで作製した gRNA と化学合成した gRNA の活性比較

切断活性が高いことがすでにわかっているアルビノ原因遺伝子 *slc45a2* の gRNA を、T7 RNA ポリメラーゼを用いて作製したものと、化学合成したもの (invitrogen 製) の 2 種類を用意し、それぞれ Cas9 mRNA とともに受精卵に微量注入した。注入胚 8 個からそれぞれゲノム DNA を抽出し、ヘテロ二本鎖移動度解析によって、標的配列の切断活性を比較した (図 2、図 3)。切断活性は全バンド中のヘテロ二本鎖のバンドの割合から求めた。その結果、T7 RNA ポリメラーゼにより作製した gRNA と化学合成した gRNA の平均の切断活性に差はほとんどなかったものの、T7 RNA ポリメラーゼで作製した gRNA を注入した胚では、個体間で切断活性にばらつきが見られることが明らかとなった (図 3)。

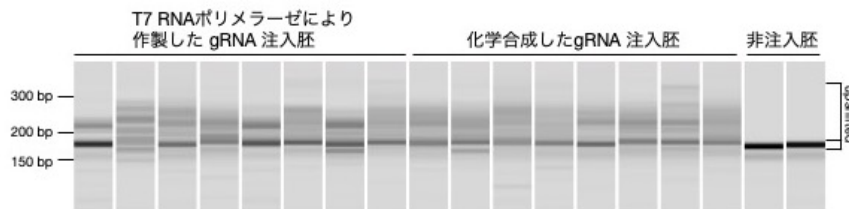


図 2. ヘテロ二本鎖移動度解析

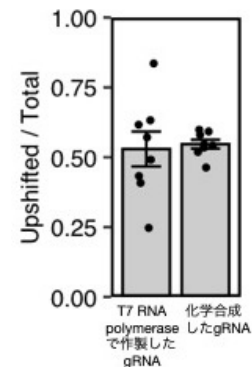


図 3. gRNA の活性比較

(2) 遺伝子ノックインの検討

① Cas9 mRNA と Cas9 タンパク質の比較

HGn12C 系統の受精卵に、Cas9 mRNA、To12L-gRNA、To12R-gRNA、mScarlet 遺伝子を含むドナープラスミド、ドナープラスミドを切断するための Mbait-gRNA を微量注入した。受精後 1 日目と 5 日目に蛍光顕微鏡観察した結果、103 個体中 3 個体において、脳で mScarlet の発現が認められた。これら 3 個体を成魚になるまで育て、野生型と掛け合わせたところ、脳で mScarlet を発現する次世代を得ることができなかった。

そこで、Cas9 mRNA に代わって Cas9 タンパク質を使用し、同様の微量注入を行った。1 日目と 5 日目に蛍光顕微鏡観察した結果、99 個体中 4 個体において、脳で mScarlet の発現が認められた。しかしながら、この場合も脳で mScarlet を発現する次世代は得られなかった。

② gRNA の変更

上述の顕微注入胚からゲノム DNA を抽出し、ヘテロ二本鎖移動度解析を実施したところ、To12L 配列を標的とする gRNA の切断効率が低いことが明らかになった。そのため、To12L 配列を標的とする gRNA を複数作製し、それぞれ Cas9 mRNA とともに受精卵に微量注入し、ヘテロ二本鎖移動度解析により切断効率を調べたが、いずれも切断効率は低かった。そのため、To12 配列以外の配列を標的配列とし、遺伝子ノックインを検討することにした。

これまでに得られた結果をふまえ、現在、様々な細胞や組織で転写因子 Gal4 を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を用いて、Gal4 配列への任意の遺伝子のノックインを試行している。Gal4 配列を標的とする切断効率が高い gRNA を選定するとともに、ドナープラスミドにゲノムと相溶性をもつ DNA 配列を付加する等の検討を行っている。

この系統における効率的な遺伝子ノックインが可能になれば、目的とする細胞や組織を自由自在に改変できるため、多岐にわたる研究の発展に貢献することが期待される。

3. 主な発表論文等

なし

4. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：川上 浩一

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。