

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2年 6月 8日現在

機関番号：13901
研究種目：奨励研究
研究期間：2019
課題番号：19H00415
研究課題名：尾索動物ホヤにおける生殖細胞マーカー系統の作製

研究代表者 白江 麻貴
(SHIRAE, Maki)
名古屋大学・理学部・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：

尾索動物カタユレイボヤは、哺乳類における生殖細胞形成のモデル動物として注目されている。本研究では、本種の生殖細胞マーカー系統をゲノム編集により作製しようと試みた。生殖細胞関連遺伝子 *TDRD7* を標的とした人工ヌクレアーゼ TALEN を作製し、*TDRD7* 上下流領域約 1kbp を増幅し蛍光タンパク質遺伝子 *gfp* に繋げた DNA 断片とともにホヤ卵に注入した。TALEN による *TDRD7* 標的配列の DNA 二重鎖切断と相同組換え修復により *TDRD7* が *gfp* に置き替わるノックインを期待した。結果として始原生殖細胞に GFP が発現し、また *gfp* のノックインを確認した。系統作製実現には、さらに効率をあげる必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義：

尾索動物ホヤは海産の無脊椎動物であるが、系統学的に脊椎動物の姉妹群として知られており学術的に重要な動物である。中でもカタユレイボヤには哺乳類に類似した生殖細胞形成システムが存在することが示唆されており、本種の生殖細胞形成メカニズムの解明はヒトを含む哺乳類生殖細胞の研究にも有用である。本研究成果はノックインによるホヤ生殖細胞マーキング系統作製の可能性を示せたという意味で意義がある。

研究分野：生物学

キーワード：生殖細胞、マーカー系統、ゲノム編集、ノックイン、人工ヌクレアーゼ、TALEN

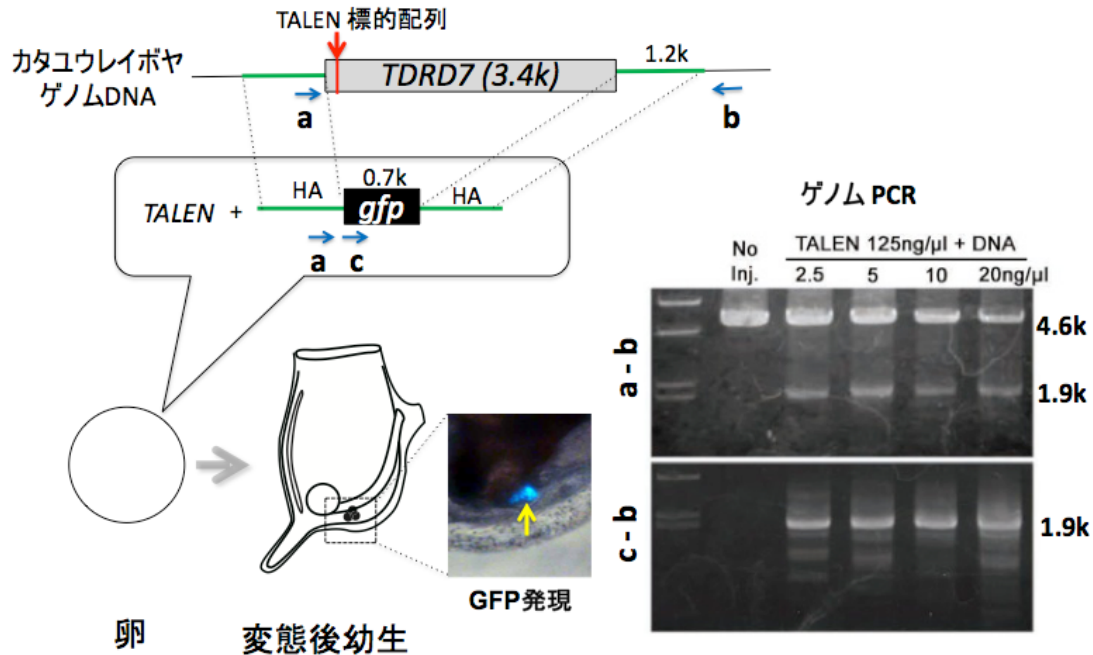
1. 研究の目的

生殖細胞の分子生物学研究には、大多数の体細胞の中から少数の生殖細胞を検出・単離する技術が不可欠となる。多くのモデル動物には生殖細胞特異的蛍光タンパク質などを発現させたマーカー系統が作製されているが、ホヤではこれまでその作製には成功していなかった。この理由としては①生殖細胞特異的な発現を導くための遺伝子プロモーターが見つかっていなかったこと、そして②外来遺伝子を効率的にホヤゲノム中に導入する技術がなかったことがあげられる。そこで本研究の目的は、生殖細胞特異的発現プロモーター同定とノックインを実現することにより、ホヤの生殖細胞特異的発現を示す *gfp* マーカー系統を作製することとした。

2. 研究成果

(1) ホヤにおける生殖細胞特異的遺伝子 *TDRD7* 研究の背景

今回、生殖細胞特異的遺伝子として *TDRD7* に注目した。これまでの研究で、カタユレイボヤ *TDRD7* は卵精原細胞、始原生殖細胞などほとんどの生殖系列細胞に特異的に発現していることがわかっていた。さらに、*TDRD7* 遺伝子にはイントロンが存在せず、そのゲノム上流と下流には比較的近い位置に他の遺伝子が配置されている。従って、*TDRD7* の発現を制御するシス領域はゲノム上の限られた場所に存在すると考えられた。しかしこれまで *Minos* トランスポゾンを用いた *TDRD7* プロモーター解析では生殖細胞に特異的な GFP 発現をもつ系統の作製はできなかった。そこで、ホヤゲノム中の *TDRD7* 遺伝子領域に *gfp* 遺伝子を挿入するノックインを試みた。



本研究内容と成果の概要

(2) *TDRD7* 遺伝子を標的とした人工ヌクレアーゼ TALEN の変異導入効果

カタユウレイボヤでは、ゲノム標的領域に高効率に DNA 二重鎖切断 (DSB) を誘導する手段として人工ヌクレアーゼ TALEN を用いる。そこで *TDRD7* 遺伝子の翻訳開始点直下から下流域まで、4 種類の配列を標的とする TALEN を作製した。これらの TALEN の mRNA をカタユウレイボヤ卵に注入し、媒精した。幼生 10 個体からゲノムを抽出し変異導入効率を調べると、翻訳開始点直下の TALEN の導入効率は 97% と高く、遺伝子下流域ほど効率が低かった。そこで *TDRD7* 遺伝子の翻訳開始点直下 (図左上、赤矢印) を標的とした TALEN (*TDRD7* TALEN) を用いて以下の実験を行った。この *TDRD7* TALEN を導入した個体は性成熟するが、成体の精子産生が少なかった。しかしこの成体から得られた配偶子を自家受精させると、*TDRD7* のホモ欠損変異体 (*TDRD7*^{-/-}) が得られた。*TDRD7*^{-/-} は一見正常な成体に育ったが、精子産生をほとんど行わなかった。一方で卵産生は正常だった。またヘテロ個体 *TDRD7*^{+/-} の配偶子形成は正常であった。

(3) *TDRD7* 遺伝子領域への *gfp* 遺伝子ノックイン

次に、ノックインに必要な DNA 断片の作製を行った。*gfp* 遺伝子に *TDRD7* のシス領域上流および下流 1.2 base をホモロジーアーム (HA) として融合させた (図左吹き出し内、緑線)。この断片を *TDRD7* TALEN mRNA と同時にホヤ卵中に挿入して媒精した。すると、尾芽胚期からオタマジャクシ型幼生期に一度全体に GFP 発現が現れ、変態期に消えた。その後、変態後 5 日の幼生に再び局所的な GFP 発現が認められた (図中央写真、黄矢印)。免疫染色によって、この GFP が Vasa 陽性の始原生殖細胞特異的に発現していることが確認された。この始原生殖細胞における GFP 発現は、変態後 5 日から 21 日の間に見られたが、その後失われた。この GFP 発現は注入した DNA 断片の HA 中に存在するプロモーター領域による可能性があるが、DNA 断片がゲノムに挿入されているかどうかは分からない。そこで DNA 断片がホヤゲノムの *TDRD7* 領域に挿入されているかどうかを調べるため、以下のプライマーを用いてゲノム PCR を行った。上流 HA 中の配列 (a)、下流 HA の外側のゲノム中配列 (b) *gfp* の 5' 末端配列 (c) である (図左上青線)。野生型個体では、プライマー a と b を用いた PCR では *TDRD7* 遺伝子を含む 4.6k bp のみ増幅される。しかし TALEN と DNA 断片を挿入した場合にはもう一つ 1.9k bp のバンドが検出された (図右上泳動像)。これはノックインによって一部ゲノムにおいて *TDRD7* の代わりに *gfp* が挿入されたことを示す。また、プライマー c, b の組み合わせで PCR を行ったところ、同様に 1.9 kb のバンドが検出された (図左下泳動像)。このバンドの配列解析を行うと *gfp* と下流 HA の配列が確認できたため、*gfp* のノックインが起こっていることが確認できた。従って、本手法によりホヤゲノム中の *TDRD7* 領域に *gfp* を挿入することに成功したといえる。

(4) 成果と課題

本研究では、カタユレイボヤ始原生殖細胞での GFP 発現に成功し、また *TDRD7* ゲノム領域へのノックインも成功した。しかし、始原生殖細胞での GFP 発現は変態後 3 週間で消滅し、系統の作製には至らなかった。この原因としてノックインの効率が低い可能性が考えられる。変態後幼生の始原生殖細胞における GFP 発現は、ゲノムに挿入されていない DNA 断片に存在する *TDRD7* プロモーターによるものであると考えられる。本研究においては、実際にゲノム標的中へのノックイン効率を調べられていない。生殖細胞での GFP 発現が成長につれて失われることを考えると。数少ない始原生殖細胞へのノックイン効率は体細胞よりもはるかに低いと予想できる。今後は実際のノックイン効率を検証する手段と、始原生殖細胞に高効率にノックインを生じさせるための工夫が必要である。

3. 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〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

4. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：

※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。