

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号： 63904
研究種目： 奨励研究
研究期間： 2021 ~ 2021
課題番号： 21H04157
研究課題名 領域特異的な新規遺伝子改変技術の開発

研究代表者

水谷 健 (Mizutani, Takeshi)

基礎生物学研究所・技術課・技術職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 470,000 円

研究成果の概要：昨年度、非モデル昆虫であるカブトムシにおいて、新規の領域特異的なRNAi効果による遺伝子機能抑制法を開発した。これにより解析する遺伝子が生命の維持に重要な機能を持つ場合でも、致死となるのを回避することが可能となった。今回はこの技術を応用した、領域特異的ゲノム編集技術（ノックアウト法）の開発に取り組んだ。その結果、ゲノム編集ツールとしてCRISPR/Cas9を利用し、ゲル化によって体内での拡散を防ぎ、その濃縮状態を保つことが可能な試薬を用いることで、新規の領域特異的ゲノム編集技術の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規の領域特異的なCRISPR/Cas9を用いた、遺伝子ノックダウン法の開発に成功した。一般的な遺伝子のノックダウンは全身に作用するが、ゲル化によって体内での拡散を防ぎ、その濃縮状態を保つことが可能な試薬を用いることにより、これまで遺伝子機能解析が困難であった、発生過程で致死となる遺伝子に対しても、領域特異的な遺伝子のノックダウンによって致死性を回避した詳細な機能解析が可能になった。本手法は、特殊な技術が必要としないため、他の生物への応用も期待される。

研究分野： 昆虫の発生と進化

キーワード： 領域特異的 遺伝子機能解析 ノックダウン CRISPR/Cas9 昆虫 カブトムシ ゲル化 トランスフェクション

1. 研究の目的

近年次世代シーケンス技術の急速な発展により、網羅的な比較トランスクリプトーム解析があらゆる生物で可能となった。その結果、特定の生命現象を制御する遺伝子の推定（候補遺伝子）が格段に容易になった。さらに、全身性 RNAi や CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集等の遺伝子機能解析法を活用することで、従来の非モデル昆虫において、次々と候補遺伝子の機能解明が進められてきている。しかし、これらの機能解析法では、発生過程で致死となる遺伝子の機能解析ができないことが問題となっている。これを克服するために昨年度は、非モデル昆虫であるカブトムシ *Trypoxylus dichotomus* において、局所組織における RNAi 法（領域特異的 RNAi 法）を開発し、致死性回避につながる基盤技術を整えた。本年度は、本技術を応用した新たな領域特異的ゲノム編集技術の開発に取り組んだ。

2. 研究成果

(1)方法

昨年度開発した領域特異的 RNAi 法では、注入試薬の体内での拡散を防ぐと同時に、試薬の濃縮状態を保つ働きを持つトランスフェクション試薬を用いて二本鎖 RNA (dsRNA) の局所導入に成功した。本年度は、この手法を応用した、領域特異的ゲノム編集技術（ノックアウト法）の開発に取り組んだ。ゲノム編集ツールとして CRISPR/Cas9 に着目し、ゲノム編集に必要な RNA/タンパク質複合体 (RNP) の局所組織への導入を目指した。この手法は、転写・翻訳が不要なため、短時間で効率よくゲノム編集ができる。また RNP は細胞内で迅速に分解されるため、オフターゲット変異の減少が期待できる。

モデル昆虫とマーカー遺伝子

モデル昆虫には入手が容易であり、低温飼育法により一年中実験に使用可能で、体サイズが大きく領域特異的な解析が容易に行えると考えられる、カブトムシ *Trypoxylus dichotomus* を使用した。

特定遺伝子の DNA に変異を導入するノックアウト法を開発するにあたり、明確な表現型を示すマーカー遺伝子の選出が必須である。所属研究室では、領域特異的 RNAi 法の開発過程で、外骨格の着色に重要な機能を有する遺伝子 (RNAi により体色が黒から赤茶色に変化) が有用なマーカー遺伝子であることを見出した。この遺伝子を活用して技術開発を進めた。またネガティブコントロールには *GFP* 遺伝子を選択した。

領域特異的なゲノム編集

カブトムシ終齢幼虫に、ゲル化することで体内での拡散を防ぎ、その濃縮状態を保つことが可能なトランスフェクション試薬に内包された RNP (リボヌクレオタンパク質) をインジェクションし、成虫での表現型を解析することで遺伝子ノックアウトの成否を評価した。Cas9 タンパク質は、Cas9 (IDT 社) および細胞透過性ペプチド (CPP) を付加した CPP-Cas9 を使用した。ガイド RNA (gRNA) のデザインは、Web ツールの CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) を用いた。gRNA を合成するために、遺伝子特異的な標的配列に T7 プロモーター配列を付加した dsDNA を鋳型とし、AmpliScribe T7-Flash Transcription Kit (Lucigen) を用いて RNA への転写を行うことで gRNA を調製した。

それぞれ終濃度を Cas9 が 1 µg/µl、gRNA が 0.5 µg/µl となるよう混合し、室温で 10~20 分インキュベートすることで RNP を得た。RNP は比較的安定している為、数日なら 4℃、長期なら -80℃ 保管可能である。

氷上のエッペンチューブに、トランスフェクション試薬:トランスフェクションバッファー:RNP 溶液 = 4.5 : 4.5 : 1 の比率で溶液を入れタッピングで混和、ロータリーミキサーで 12 rpm, 10 min, 4℃ でさらに混和後、10,000 rpm, 1 min, 4℃ でスピンドウンし、50 µl (RNP 量は、100 pmol または 50 pmol) を標的領域にインジェクションした。

(2)結果

羽化したカブトムシ成虫の表現型を確認した。CRISPR/Cas9 を用いた個体では、やや赤茶色に見えるが明瞭な表現型は見られなかった。これに対し CPP- CRISPR/Cas9 を用いた個体では、明確に標的領域を含む領域が赤茶色となる表現型があらわれた (図 1)。

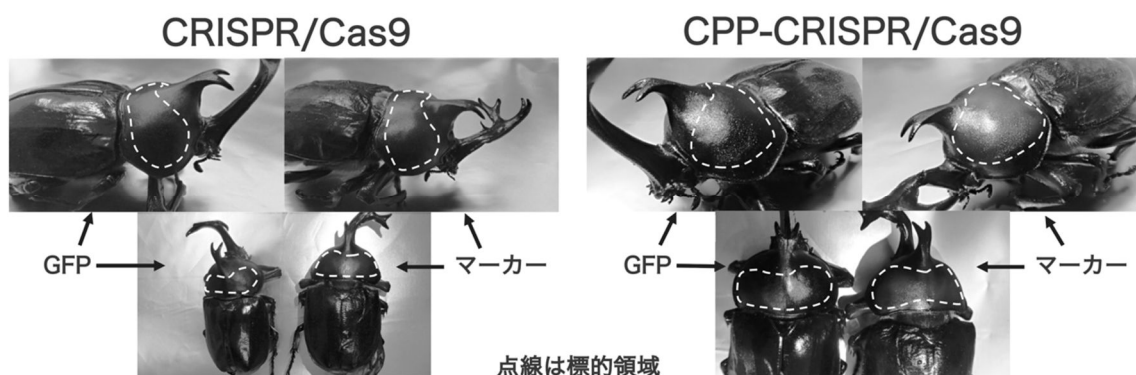


図 1. 成虫外骨格の表現型

カブトムシ幼虫に対する領域特異的 RNAi では、dsRNA をインジェクションした場合、43 匹中 24 匹が、明確に領域特異的の外骨格が赤茶色になった。今回カブトムシ幼虫 2 匹に 50 pmol または 100 pmol RNP をインジェクションしたが、CPP-CRISPR/Cas9 で、50 pmol、100 pmol とともに 1 匹に明確な領域特異的な効果が確認できた。(表 1)

	標的遺伝子	n	領域特異的な効果
CRISPR/Cas9 (50 pmol, 100 pmol)	<i>GFP</i>	2	0
	マーカー	4	0 (わずかに効果を示した)
CPP-CRISPR/Cas9 (50 pmol, 100 pmol)	<i>GFP</i>	2	0
	マーカー	4	2 (50 pmol, 100 pmol 各1個体)
dsRNA (5 μg)	<i>GFP</i>	15	0
	マーカー	43	24 (残り19 個体は全身に効果が及んだ)

表 1 成虫外骨格の表現型

インジェクションした幼虫を解剖し、標的領域からゲノム抽出を行って Ampli-con-Seq によって標的領域の欠失を確認した。予備的なデータではあるが、CRISPR/Cas9、CPP-CRISPR/Cas9 のいずれでも標的領域での欠失があり、CPP-CRISPR/Cas9 ではフレームシフトが生じていた (図 2)。

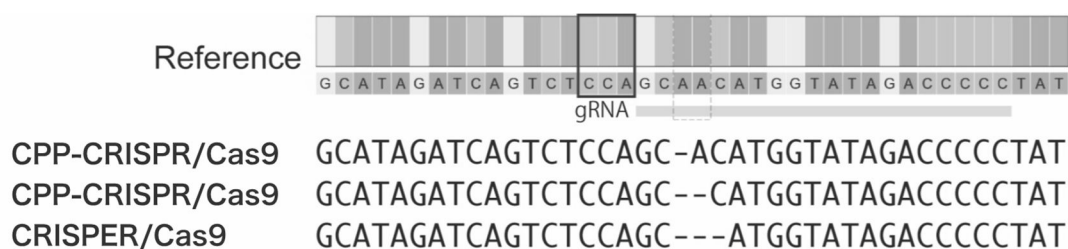


図 2. Ampli-con-Seq による欠失の確認

(3)考察

領域特異的な RNAi 技術を応用することにより、CRISPR/Cas9 法を利用した領域特異的な遺伝子ノックアウト法の開発を試みた結果、目的とする表現型を持つ個体を得ることに成功した。細胞透過性ペプチドを付加した Cas9 (CPP-Cas9) を使用することで、ノックアウト効率が上昇した。これにより、これまで遺伝子機能解析が困難であった、発生過程で致死となる遺伝子に対しても、領域特異的なノックアウトによって致死を回避して機能解析が可能になった。領域特異的 RNAi と同様に、この手法は、特殊な技術を必要としないため、他の生物への応用も期待される。今後はこの技術を応用して、CRISPR/Cas9 法による領域特異的なノックインの技術開発を行うことを予定している。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水谷健
2. 発表標題 領域特異的な新規遺伝子改変技術の開発
3. 学会等名 第33回生物学技術研究会・第44回生理学技術研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------