

機関番号：32610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650079

研究課題名（和文） ZFNとrecombineeringを利用した遺伝子機能解析法の開発

研究課題名（英文） Analysis of a gene function using ZFN and recombineering

研究代表者

大迫 俊二 (OHSAKO SHUNJI)

杏林大学・保健学部・教授

研究者番号：50152103

研究成果の概要（和文）：人工的亜鉛ジンクフィンガー・ヌクレース(ZFN)と、Bacterial Artificial Chromosome (BAC)をベースとしたP[acman]をrecombineeringによって自在に改変し、これらを組み合わせて目的の遺伝子機能を自在に制御できる解析法を、ショウジョウバエをモデル動物として確立することを目的として研究を行った。

研究成果の概要（英文）：A method for studying a gene function with complete control has been tried to develop by combinatorial use of a ‘zinc finger nuclease’ (ZFN), which is a designed, sequence-specific endonuclease that can be customized to cleave a user-chosen DNA target, and recombineering, which is able to engineer large segments of genomic DNA of P[acman] for transgenesis in *Drosophila melanogaster*,

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	330,000	3,330,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：ZFN、recombineering、CaMKII、dNZF

1. 研究開始当初の背景

胚性幹(ES)細胞と標的遺伝子改変ベクターを使った相同遺伝子組換え(HR)を利用したマウスの標的遺伝子組換え法の進展によって、目的の遺伝子機能を時間的空間的に解析することが可能となった。そのため、神経科学においてもマウスが最も有用なモデル動物として幅広く使われている。一方、ショウジョウバエは遺伝学において最も有用なモデル動物として利用され、P因子等「動く遺伝子」トランスポゾンによる染色体への挿入を利用した様々な手法が開発されてきた。標的遺伝子をHRによって改変する方法も開

発されたが、効率が悪いいため広く使われるには至っていない。最近MengらとDoyonらは、ゼブラフィッシュにおいて亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)を使って標的遺伝子改変を高効率にできることを報告した。ZFNは理論的に全てのDNA配列の特定の部分で結合や切断を行うように改変することができる。遺伝子のコード領域のDNA二本鎖切断が非同末端結合で修復されれば、タンパク質の機能は阻害される。また、ZFNによるDSBによって外来改変標的遺伝子DNAの存在下に、標的遺伝子でのHRの効率が飛躍的に高まることが知られている。さらに、Maederらは高性

能の ZFN を作製できるオープンソース Oligomerized Pool Engineering (OPEN)を報告した。申請者は、ショウジョウバエの可塑性酵素 CaMKII の解析を長年行っているが、未だに CaMKII の null 変異体は得られていない。このようにショウジョウバエにおいても機能解析が困難な遺伝子が未だに多く存在する。この状況を打破できる可能性のある方法は、ZFN を使った標的遺伝子改変法であると考えた。ZFN に関しては、これまでの知見を最大限に利用して、試行錯誤によってノウハウを学び、初期胚への ZFN RNA の注入の条件検討を行なう必要があり、これまでの経験を活かせると考えた。ZFN による標的遺伝子改変に成功し、recombineering による attB-P(acman)の改変によって、変異体の機能回復ができれば、ノックインと同様の遺伝子改変が自在できるようになる。さらに、ショウジョウバエで開発された GAL/UAS システム、温度感受性 GAL80、Geneswitch と Flippase 等をうまく組み合わせれば、コンディショナル・ノックアウトを行なうことができると考えた。これを利用して、広く脳神経系で発現している CaMKII の機能を様々な脳の部位で欠失させ、求愛行動条件付け行動を指標にした長期記憶のアッセイを行い、長期記憶に重要な脳の CaMKII 発現部位の特定することができると考えた。これらの解析によって、ZFN と P(acman)を組み合わせた新しい遺伝子機能解析法を提示することができ、ショウジョウバエをモデル動物としてより完璧なものにすることができると考えた。

2. 研究の目的

遺伝子の機能を明らかにするために様々な研究方法が開発されてきたが、人工的に設計された亜鉛ジンクフィンガー・ヌクレース (ZFN) を使った遺伝子改変技術は動植物に関係なく応用可能な方法として最近特に注目されている。本研究で申請者はこの ZFN と、Bacterial Artificial Chromosome (BAC) をベースとした attB-P(acman) を recombineering 法によって自在に改変し、これらを組み合わせて目的の遺伝子機能を時間的空間的に制御できる解析法を、ショウジョウバエをモデル動物として確立することを目的とする。ショウジョウバエでは様々な遺伝学的機能解析法が確立されてきたが、申請者が取り組んできた CaMKII のように未だに null 変異体は得られていない例も少なく、機能解析が困難な遺伝子が未だに多く存在している。この状況を打破するために、CaMKII コード領域の ZFN 標的配列の選択とオープンソース OPEN (Oligomerized Pool Engineering) を最大限に利用して最適な ZFN の作製し、CaMKII の null 変異体の作製を試みる。この際に NHEJ による遺伝子破壊と改

変外来標的遺伝子存在下の HR による遺伝子改変の両方を試み、どちらがより有効か明らかにする。recombineering によって、N 端 C 端の両方にタグ (GFP や FLAG 等) を付け FRT 配列で開始コドンを含んだ CaMKII 遺伝子 P(acman) を作製しショウジョウバエに導入し、CaMKII null 変異体の表現型を回復させる。タグを生体での可視化、CaMKII 複合体の単離に利用する。GAL4 と温度感受性 GAL80 か Geneswitch および UAS-Flippase を使って時間的空間的に CaMKII の機能を様々な脳部位で欠失させ、求愛行動条件付けによる長期記憶アッセイを使って長期記憶に重要な脳の CaMKII 発現部位を特定する。さらに、他の遺伝子についての汎用性を示し、ショウジョウバエにおける遺伝子操作をさらに発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CaMKII コード領域の ZFN 標的配列の選択 : OPEN を利用するために、3 つの ZF モチーフからなる 2 つの ZFN の標的配列を選択する必要がある。1 つの ZF モチーフは 3 bp を認識するので、9 bp の ZFN 標的配列と 6 bp のスペーサーともう一つの逆向きの 9 bp の ZFN 標的配列合計 24 bp を選択しなければならない。CaMKII コード領域の ZFN 標的配列の選択に、Web ツールの ZiFiT と Zinc Finger Tools および Meng 等によって記述されたアルゴリズム PERL script 利用して最適な配列を選んだ。BLAST によって選んだ配列 24 bp が CaMKII に特異的な配列であることを確認した。

(2) OPEN を利用した標的配列を認識する ZFN の選択 : OPEN を利用して、先ほどの標的配列を持つレポーター遺伝子を組み込んだ大腸菌で、感染可能な複数の組み合わせ持つプールの ZF アレイをアッセイする B2H (大腸菌 2 ハイブリッド) を行い、実験的に最適な ZF タンパクを選択した。

(3) ZFN による CaMKII null 変異体の作製 : ショウジョウバエの初期胚で ZFN を働かせるためには NLS が必要とされているので、2 つの ZFN をそれぞれ NLS を含む発現ベクター pCS-NLS に in-frame に組み込んだ。定法に従って、in vitro でキャップ付き RNA を合成した。遺伝子改変のためにこれらの RNA を初期胚の生殖細胞が形成される前の後方部にフェムトジェットを使って注入した。多くの初期胚に注入し、成虫になったものを別個に交配ライン化した。CaMKII は第 4 染色体に存在するので、区別するために ciD を持つハエを使った。ZFN による遺伝子破壊は、PCR によって標的配列を挟む部分にプライマーを作製し PCR を行い、電気泳動によって DNA の

欠失・付加を 1 bp の違いでも検出できる方法を使ってスクリーニングを行っている。ZFN による DSB が起きる時に、ZFN 標的配列周辺の改変 CaMKII DNA 断片を存在させて高効率で HR を起こさせる方法も試みた。すなわち、自己リン酸化部位スレオニンをアラニンに変えた CaMKII DNA 断片を ZFN RNA と一緒に注入し、1 アミノ酸の置換も試みた。上記同様に、スクリーニングを行っている。

(4)P(acman)のrecombineeringによる改変：CaMKIIの遺伝子破壊は進行中であるので、申請者が作製したdNZF変異体を使って、dNZF遺伝子全体を含む22 kbpのattB-P(acman)を導入したショウジョウバエを作製したが、変異体の表現型を回復することはできなかった。30 kbpのattB-P(acman)を作製してトランスジェニックフライを作製したが、これでも表現型を回復することはできなかった。ストックセンターに100 kbpのP(acman)が導入されたトランスジェニックフライがあったので、これを使ったところ表現型が回復した。これと併行して80 kbpのattB-P(acman)を導入したショウジョウバエを作製した。これによっても表現型が回復することがわかった。そこで、recombineeringによって、翻訳開始をなくし酵母GAL遺伝子を挿入したattB-P(acman)を作製しようと、galK選択を使って試みた。しかし、予想外に相同組み替えによって期待したコンストラクトを作製することができなかった。原因は相同組み替えに使ったホモロジー領域50 bpでは不十分であったためだと考えられた。ホモロジー領域を500 bpにすることによって、80 kbpのattB-P(acman)をrecombineeringによって翻訳開始をなくし酵母GAL遺伝子を挿入したコンストラクトを作製することができたので、ライン化を試みている。生体での可視化、CaMKII複合体の単離に利用するために、CaMKIIのN端とC端の両方にタグ (GFPやFLAG等) を付けFRT配列で開始コドンを含んだCaMKII遺伝子P(acman)の作製を行っている。

4. 研究成果

(1)WebのツールZiFiTと Zinc Finger Tools およびMeng等によって記述されたアルゴリズム PERL scriptを利用して最適な配列の選択を試みた。結果的にZiFiTを使ってCaMKIIコード領域の最適なZFN標的配列を選択した。BLASTによって選んだ配列24 bpがCaMKIIに特異的な配列であることを確認した。

(2)OPENを利用して標的配列を持つレポーター遺伝子を組み込んだ大腸菌を使って、感染可能な複数の組み合わせを持つプールのZFアレイをアッセイする大腸菌2ハイブリッドを行い、実験的に最適なZFタンパクの選択を試み

た。試行錯誤の末によりやく最適と思われるZFタンパクを選択できた。

(3)2つのZFNをそれぞれNLSを含む発現ベクターpCS-NLSにin-frameに組み込み、in vitro でキャップ付きRNAを合成した。NHEJ (非相同末端結合) による遺伝子改変に、これらのRNAを初期胚初期胚に注入し、成虫になったものを別個に交配しライン化した。ZFNによる遺伝子破壊を、標的配列を挟む部分にプライマーを作製しPCRを行い、DNAの欠失・付加を検出できる方法を使ってスクリーニングを行っている。ZFNによるDSBが起きる時に、ZFN標的配列周辺の改変CaMKII DNA断片を存在させて高効率でHRを起こさせる方法も試みた。すなわち、自己リン酸化部位スレオニンをアラニンに変えたCaMKII DNA断片をZFN RNAと一緒に注入し、1アミノ酸の置換も試み、上記同様にスクリーニングを行っている。

(4)CaMKIIの遺伝子破壊は進行中であるので、まず申請者が作製したdNZF変異体についてP(acman)を使って表現型を回復することができるとか調べた。dNZF遺伝子全体を含む22 kbpのattB-P(acman)を入手してトランスジェニックフライを作製した。しかしながら、これによつては、dNZF変異体の表現型を回復することはできなかった。次に30 kbpのP(acman)を自分自身で作製しトランスジェニックフライを確立した。残念ながら、これでも表現型を回復できなかった。ストックセンターに100 kbpのP(acman)を持つラインがあったので、これを取り寄せて使ったところ表現型を回復することができた。これと併行して80 kbpのattB-P(acman)を持つトランスジェニックフライの作製も行った。これもまたdNZF変異体の表現型を回復することができたので、これをrecombineeringによって改変することにした。dNZF遺伝子の翻訳開始をなくし酵母GAL遺伝子を挿入したattB-P(acman)をgalK選択を用いて作製を試みた。しかし、設計通りのコンストラクトを作製することはできなかった。原因としては、相同組み替えに使ったホモロジー領域50 bpでは不十分であることが考えられた。ホモロジー領域を500 bpにすることによって目的のコンストラクトを作製することが可能になった。現在ライン化を試みている。このラインが内因性の発現パターンを再現できることが確認できれば、dNZF変異体と野生型でdNZF発現ニューロンの形態と機能について、詳細に比較検討する。CaMKII遺伝子をrecombineeringによって改変しZFNと組み合わせた遺伝子機能解析法を確立する。

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

大迫 俊二 (OHSAKO SHUNJI)

杏林大学・保健学部・教授

研究者番号：50152103

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：