

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：63801

研究種目：奨励研究

研究期間：2022～2022

課題番号：22H04263

研究課題名 ゼブラフィッシュにおける外来遺伝子の安定的発現を実現する基盤技術の開発

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） 480,000円

研究成果の概要：外来遺伝子を安定的に発現するトランスジェニック生物を作出するためには、外来遺伝子をゲノム上のセーフハーバー領域に組み込む必要がある。しかしながら、モデル脊椎動物ゼブラフィッシュにおいて、そのような手法は確立されていなかった。本研究では、CRISPR/Cas9法とphiC31インテグラーゼによる遺伝子導入法を組み合わせ、ゼブラフィッシュにおけるセーフハーバー推定領域に目的遺伝子を導入する手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外来遺伝子をゲノムに導入したトランスジェニック生物は、個体レベルでの遺伝子機能解析やヒト疾患モデル作製などに広く利用されており、生命科学や医学研究において、重要な役割をもつ。本研究では、外来遺伝子を安定的に発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製する手法を開発した。本手法は、有用なトランスジェニックゼブラフィッシュの作出に活用できるため、多岐にわたる研究の発展に貢献すると期待される。

研究分野：遺伝子工学、分子生物学

キーワード：トランスジェニックゼブラフィッシュ CRISPR/Cas9法 phiC31インテグラーゼ

1. 研究の目的

外来遺伝子をゲノムに導入したトランスジェニック生物は、個体レベルでの遺伝子機能解析やヒト疾患モデル作製などに広く利用されており、生命科学や医学研究において、重要な役割をもつ。しかしながら、生体内に組み込まれた外来遺伝子は、位置効果によるサイレンシングを受けやすく、確実に安定して発現させることは難しい。これを解決するためには、トランスジェニック生物作製の際に、外来遺伝子をゲノム上のセーフハーバー領域に組み込む必要がある。モデル脊椎動物ゼブラフィッシュは、世界中の研究室で盛んに利用されているが、そのような手法は未だ確立されていない。

研究代表者の所属研究室で、過去に作出された UAS:GFP トランスジェニックゼブラフィッシュは、十数世代にわたり Gal4 存在下で GFP を高発現し続けてきた。これに着目し、本研究では、UAS:GFP トランスジェニックゼブラフィッシュにおける UAS:GFP 配列の導入部位をセーフハーバー領域と推定し、この領域に目的遺伝子を組み込む手法の開発を目指した。

2. 研究成果

本研究では、CRISPR/Cas9 法による遺伝子ノックインと部位特異的組換え酵素 phiC31 インテグラーゼによる遺伝子導入法を組み合わせ、上述のセーフハーバー推定領域に目的遺伝子を導入する手法を開発することとした。

まず、CRISPR/Cas9 法により、phiC31 インテグラーゼ認識配列 attP とレポーター遺伝子として EF1 α プロモーターにつないだ GFP をセーフハーバー推定領域に組み込んだノックインフィッシュを作製した。GFP 配列は除去できるよう、EF1 α プロモーターの上流及び GFP 配列の下流に loxP 配列を配置した。

次に、このノックインフィッシュと筋肉特異的に Gal4 を発現する系統を交配して得られた受精卵に、phiC31 インテグラーゼ認識配列 attB と UAS 配列の下流につなげた赤色蛍光タンパク質遺伝子 mScarlet を有するドナープラスミドを phiC31 インテグラーゼ mRNA とともに顕微注入した。注入胚の中から筋肉特異的に mScarlet を発現する個体を選抜し、これらを成魚になるまで育て、野生型と掛け合わせた結果、筋肉特異的に mScarlet を高発現する次世代が得られた。PCR とシーケンス解析により、mScarlet を発現する次世代において、attP-attB 配列間に組換えが起こり、ドナープラスミドが attP 配列、すなわちセーフハーバー推定領域に組み込まれていることが明らかとなった。興味深いことに、この系統から Cre-loxP システムにより EF1 α プロモーターと GFP 配列を除去したところ、mScarlet の発現量が更に増加することが示された。発現量が増加する要因については、現在解析中である。

この手法を用いて、ニトリリダクターゼ (NTR)/メトロニダゾール (Mtz) システムを利用した、特定の組織を狙って破壊することが可能なトランスジェニックゼブラフィッシュを作出した。NTR は Mtz を活性化させ、活性化した Mtz は細胞死を誘導する。したがって、組織特異的に NTR を発現させ、Mtz を投与すれば、その組織は破壊されることになる。

phiC31 インテグラーゼ認識配列 attB と UAS 配列の下流に NTR 遺伝子及び mScarlet 遺伝子を配置したドナープラスミドを作製し、上述の方法により筋肉特異的に NTR と mScarlet を発現する系統を得た。この系統に受精後 2 日目から 10 mM の Mtz を投与したところ、24 時間後に筋肉において異常が認められた。

これらの結果から、本手法によって、目的遺伝子を高発現するトランスジェニックゼブラフィッシュが作出されることが示された。本手法は、有用なトランスジェニックゼブラフィッシュの作出に活用できるため、多岐にわたる研究の発展に貢献すると考えられる。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 坂 季美子	4. 巻 34
2. 論文標題 ゼブラフィッシュにおける外来遺伝子の安定的発現を実現する基盤技術の開発	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生物学技術研究会報告	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 坂 季美子、川上 浩一
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおける外来遺伝子の安定的発現を実現する基盤技術の開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂 季美子
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおける外来遺伝子の安定的発現を実現する基盤技術の開発
3. 学会等名 第34回生物学技術研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kimiko Saka, Koichi Kawakami
2. 発表標題 Development of the method to generate transgenic zebrafish stably expressing a transgene
3. 学会等名 12th European Zebrafish Meeting（国際学会）
4. 発表年 2023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
川上 浩一	(KAWAKAMI Koichi)