

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430089

研究課題名(和文) ノックアウト効率の改善による初代完全ノックアウト動物の作成技術開発

研究課題名(英文) Highly efficient gene knockout by injection of TALEN mRNA into oocytes and host transfer in *Xenopus laevis*

研究代表者

中島 圭介 (Nakajima, Keisuke)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60260311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：F0世代で完全なノックアウトホモ個体を得るために本研究では卵母細胞にTALENを注入し、これを数日後に雌の腹腔に戻してから排卵・受精させる方法を用い、遺伝子発現の始まる前の発生段階であるstage 8において100%の変異導入効率を記録した。また、TALENとmCherryの融合タンパク質をコードするmRNAを卵母細胞に注入し、mCherryのタンパク質の発現量をWestern blottingで調べたところ、卵母細胞では受精卵と比較してタンパク合成が殆ど行われていない事が判明した。

研究成果の概要(英文)：Zinc-finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases (TALENs) and the CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins) system are potentially powerful tools for producing tailor-made knockout animals. However, their mutagenic activity is not high enough to induce mutations at all loci of a target gene throughout an entire tadpole. In this study, we present a highly efficient method for introducing gene modifications at almost all target sequences in randomly selected embryos. In our method, the efficiency is further improved by injecting TALEN mRNAs fused to the 3' UTR of the *Xenopus* DEADSouth gene into oocytes, which are then transferred into a host female frog, where they are ovulated and fertilized. The addition of the 3' UTR of the DEADSouth gene promotes mRNA translation in the oocytes and increases the expression of TALEN proteins to near-maximal levels three hours post fertilization (hpf).

研究分野：発生生物学

キーワード：Host-transfer TALEN Genome editing Targeted gene knockout *Xenopus*

1. 研究開始当初の背景

遺伝子ノックアウト技術は表現型の変化により標的とする遺伝子の機能を明らかにする極めて効果的な実験技術であるが、近年までは ES 細胞が確立されたマウスやラットなど一部のモデル動物でのみ行える方法であった。他の生物種ではゼブラフィッシュで行われた TILLING 法など、ランダムに変異を起こさせたライブラリーをスクリーニングする手間と時間のかかる方法しか使えなかったために、これらの動物以外では遺伝子ノックアウトを行うことは事実上できなかった。また、アンチセンスモルフォリンによるノックダウン法はインジェクションから数日間しか有効でないために、両生類の変態など受精から数ヶ月後に起るイベントを解析することはできなかった。

アフリカツメガエルはヒトと同じ脊椎動物であり、モデル動物としてこれまで多くの研究が行われて来た。しかもヒトとは異なり体外受精なので、その発生を顕微鏡下で容易に観察できるだけでなく、移植や薬剤処理などの操作が容易なため、特に初期発生の分野において様々な研究成果があげられて来た。当研究室ではこれまで主に幼生から成体への変態のメカニズムを研究してきており、変態期における組織感受性が甲状腺ホルモン受容体の発現量によって制御されていること、この受容体の発現が 5' -UTR によって抑制されていること、変態期の尾の退縮に MMP-9TH という遺伝子が重要な役割を果たしていることなどを明らかにして来た。しかしアフリカツメガエルはゲノムが 4 倍体であることと有効な遺伝子ノックアウト技術が無かったためにリバースジェネティクスを用いた解析を行うことはできなかった。

近年開発された Zinc-finger nuclease (ZFN) 法は標的遺伝子を認識する部位を制限酵素 Fok I の DNA 切断活性部位と融合させたものであり、標的遺伝子を切断することができる。切断された遺伝子は非相同末端結合や相同組換えにより修復される。非相同末端結合では塩基の挿入や欠失・変異などが起り、修復後の配列が ZFN で切断されなくなるまで、切断と修復が繰り返されるものと考えられている。この結果フレームシフトや重要なアミノ酸の欠失・変異などが起こり、遺伝子産物の機能が失われる。ZFN が任意の標的遺伝子を認識するように設計できるため、ハエ、線虫、ゼブラフィッシュ、メダカ、カエルなど様々な動物種で ZFN が標的遺伝子破壊の手法として有効に機能することが報告されて来た。しかし、ZFN は設計と作製が困難であるという欠点があり、更にその活性も十分に強いとは言えない。

新たなモデル動物として近年注目を集める Nettai Tsuメガエルはゲノムが 2 倍体なので遺伝子ノックアウトによる表現型が現れやすいのみならず、これまで両生類のモデル動物として研究されてきた 4 倍体のアフリカツメ

ガエルが性成熟に 2 ~ 3 年要するのに対し、僅か 1 年で次の世代を得られるというリバースジェネティクスを行う上で絶大な利点がある。この利点を生かし当研究室でも ZFN を用いて Nettai Tsuメガエルのチロシナーゼ遺伝子を破壊して世界初の完全なアルビノ個体 (F1) を作製した。インジェクションを行った F0 個体では体の一部に白斑が見られ、部位ごとに様々な変異が観察された。このことは ZFN による標的遺伝子の切断が時間的・空間的に多発的に起ったことを示しており、逆の見方をすれば 1 細胞期や 2 細胞期といった発生のごく初期には遺伝子破壊が行われなかったことを示唆している。

2. 研究の目的

Nettai Tsuメガエルはアフリカツメガエルで長年蓄積されてきた様々な実験技術を利用することが可能であり、しかもゲノムが 2 倍体なので遺伝子ノックアウトの表現型が得られやすい優れた実験動物である。本研究はこのような利点を持つ Nettai Tsuメガエルを実験材料とし、近年急速に発展しつつある TALEN 法を用いて、インジェクションを行った F0 個体でほぼ完全な遺伝子ノックアウト動物を得ることを可能とする技術の開発を目的とする。

3. 研究の方法

インジェクションを行った F0 個体でほぼ完全なノックアウト個体を作製するために、本研究ではこれまでの TALEN よりも数倍活性の強い GoIdyTALEN の mRNA を卵母細胞にインジェクションし、TALEN の翻訳・蓄積が充分に行われると考えられる 2 ~ 3 日後にプロゲステロンで卵を成熟させ、その後、受精を行わせる。この方法では TALEN の発現を充分に待つことができるために、TALEN の活性が最大となる時期に受精させることが可能となる。この結果、卵母細胞のゲノムのみならず精子のゲノムも 1 細胞期に切断されることが期待される。

4. 研究成果

本研究は TALEN によるゲノム編集効率を F0 世代で 100% まで向上させる事を目的とする。TALEN を用いた実験は受精卵に TALEN mRNA を注入する方法が一般的であるが、注入を行った F0 世代での変異導入効率は 70-90% の場合が多い。大部分の遺伝子が変異導入されているとはいえ、わずかな野生型の遺伝子も残っておりこれらの働きを無視する事はできない。完全なノックアウトホモ個体を得るためには F0 同士を交配させ F1 を得る必要が有るが、アフリカツメガエルでは 2 ~ 3 年、Nettai Tsuメガエルでも 1 年の成熟期間を必要とする。F0 世代で完全なノックアウトホモ個体を得るために本研究では卵母細胞に TALEN を注入し、これを数日後に雌の腹腔に戻してから排卵・受精させる方法を用い、遺伝子発

現の始まる前の発生段階である stage 8 において 100%の変異導入効率を記録した。また、TALEN と mCherry の融合タンパク質をコードする mRNA を卵母細胞に注入し、mCherry のタンパク質の発現量を Western blotting で調べたところ、卵母細胞では受精卵と比較してタンパク合成が殆ど行われていない事が判明した。卵母細胞でのタンパク合成を促進するために DEADSouth 5' UTR を TALEN に付加したところ、卵母細胞でのタンパク合成を促進する事が判明した。

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7件)(全て査読有り)

(1)K. Nakajima, T. Nakajima and Y. Yaoita
Generation of albino *Cynops pyrrhogaster* by genomic editing of the tyrosinase gene
Zoological Science 2016 in press

(2)Y. Nakai, K. Nakajima, J. Robert and Y. Yaoita
Ouro proteins are not essential to tail regression during *Xenopus tropicalis* metamorphosis
Genes to Cells 2016 March; 21(3): 275-286

(3)T. Nakayama, M. Fisher, K. Nakajima, A. O. Odeleye¹, K. B. Zimmerman, M. B. Fish, Y. Yaoita, J. L. Chojnowski, J. D. Lauderdale, P. A. Netland and R. M. Grainger
Xenopus pax6 mutants affect eye development and other organ systems, and have phenotypic similarities to human aniridia patients
Developmental Biology 2015 December; 408(2): 328-344

(4)K. Nakajima and Y. Yaoita
Development of a new approach for targeted gene editing in primordial germ cells using TALENs in *Xenopus*
Biology Open 2015 March; 4(3): 259-266

(5)K. Nakajima and Y. Yaoita
Highly efficient gene knockout by injection of TALEN mRNAs into oocytes and host transfer in *Xenopus laevis*
Biology Open 2015 February; 4(2): 180-185

(6)K. Nakajima and Y. Yaoita
Comparison of TALEN scaffolds in *Xenopus tropicalis*
Biology Open 2013 November; 2: 1364-1370

(7)K. Nakajima, Y. Nakai, M. Okada and Y. Yaoita

Targeted gene disruption in the *Xenopus tropicalis* genome using designed TALE nucleases
Zoological Science 2013 June; 30(6): 455-460

[学会発表](計24件)

(国際学会)

招待講演

(1)Two unique TALEN methods for the highly efficient mutagenesis and genomic editing preferentially in germ cell using *Xenopus*
Keisuke Nakajima and Yoshio Yaoita
BIT's 6th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology-2016, Dalian, China (2016, 4.25-28)

(2)The role of the thyroid hormone receptor during *Xenopus* metamorphosis
Keisuke Nakajima, Kenta Fujimoto and Yoshio Yaoita
8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology, Okazaki, Japan (2014, 11.7-9)

(3)*Xenopus tropicalis*, a model organism for the new genetics era: from forward to reverse genetics and now to gene targeting
Takuya Nakayama, Margaret B. Fish, Marilyn Fisher, Keisuke Nakajima, Yoshio Yaoita and Robert M. Grainger
International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, Hiroshima, Japan (2014, 3.27-28, 100)

講演

(4)The exploitation of genome editing in *Xenopus tropicalis*
Keisuke Nakajima and Yoshio Yaoita
International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, Hiroshima, Japan (2014, 3.27-28, 100)

ポスター発表

(5)The development of TALEN methods to enhance the mutation efficiency and to perform genome editing preferentially in germ cells using *Xenopus*.
Keisuke Nakajima and Yoshio Yaoita
15th International Xenopus Conference, Pacific Grove, CA, USA (2014, 8.24-28, 300)

(6)National BioResource Project (NBRP) *Xenopus (Silurana) tropicalis*: Standard

High Quality Inbred Strain for Biological Research

Akihiko Kashiwagi, Keiko Kashiwagi, Hideki Hanada, Atsushi Suzuki, Kimiko Takebayashi, Atsushi Kurabayashi, Kenichi Suzuki, Nubuaki Furuno, Ichirou Tazawa, Keisuke Nakajima, Takashi Yamamoto and Masayuki Sumida.

International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, Hiroshima, Japan (2014, 3.27-28, 100)

(7) National BioResource Project (NBRP) *Xenopus tropicalis* Mass Production of High Quality Standard Inbred Strains.

Akihiko Kashiwagi, Keiko Kashiwagi, Hideki Hanada, Kenichi Suzuki, Atsushi Suzuki, Kimiko Takebayashi, Keisuke Nakajima, Nubuaki Furuno, Ichirou Tazawa, Atsushi Kurabayashi, Takashi Yamamoto and Masayuki Sumida.

The 5th ANRRC International Meeting, Hayama, Japan (2013, 10.30-11.1)

(国内学会)

(8) TALEN mRNA を注入した卵母細胞にホストトランスファー法を適用した高効率遺伝子破壊法

中島圭介、矢尾板芳郎

第 38 回日本分子生物学会、神戸市 (2015, 12/1-3)

(9) ツメガエルの変態における尾の退縮に Ouro 蛋白質は関係していない

中井裕也、中島圭介、矢尾板芳郎

第 38 回日本分子生物学会、神戸市 (2015, 12/1-3)

(10) TALEN mRNA の卵母細胞への注射と host transfer による高効率遺伝子破壊法

中島圭介、矢尾板芳郎

第 86 回日本動物学会、仙台市 (2015, 9/17-19)

(11) TALEN 法による高効率遺伝子破壊法：*Xenopus laevis* 卵母細胞への mRNA 注入とホストトランスファー法の応用

中島圭介、矢尾板芳郎

第 9 回日本ツメガエル研究集会、秋田市 (2015, 9/14-15)

(12) 致死遺伝子のノックアウト問題の解決を目指して：TALEN による生殖細胞優先的標的遺伝子破壊法の開発

中島圭介、矢尾板芳郎

第 9 回 XCIJ-MA・第 8 回ツメガエル研究会ジョイント研究集会、相模原市 (2014, 11/28)

(13) TALEN を用いたネットイツメガエル生殖細胞優先的ゲノム編集技術

中島圭介、矢尾板芳郎

第 37 回日本分子生物学会、横浜市 (2014, 11/25-27)

(14) 近交系ネットイツメガエルを用いた生命科学

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、鈴木賢一、鈴木厚、竹林公子、古野伸明、田澤一朗、倉林敦、中島圭介、小林里美、竹中純子、杉原麻美、山本卓、住田正幸

第 37 回日本分子生物学会、横浜市 (2014, 11/25-27)

(15) TALEN による生殖細胞特異的ゲノム編集法の開発

中島圭介、矢尾板芳郎

第 85 回日本動物学会、仙台市 (2014, 9/11-13)

(16) ツメガエルにおける *ouro* 遺伝子ノックアウト

中井裕也、中島圭介、矢尾板芳郎

第 85 回日本動物学会、仙台市 (2014, 9/11-13)

(17) 重要な実験動物 ツメガエル

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、鈴木賢一、鈴木厚、古野伸明、田澤一朗、倉林敦、中島圭介、竹林公子、小林里美、竹中純子、杉原麻美、山本卓、住田正幸

第 85 回日本動物学会仙台大会 動物学ひろば、仙台市 (2014, 9)

(18) 高品質な近交系ネットイツメガエルを用いた生物学の研究

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、鈴木賢一、鈴木厚、古野伸明、田澤一朗、倉林敦、中島圭介、竹林公子、小林里美、竹中純子、杉原麻美、山本卓、住田正幸

第 61 回日本実験動物学会総会、第 48 回日本実験動物学会技術者協会総会 日本動物科学技術さっぽろ 2014、札幌市 (2014, 5)

(19) *Xenopus tropicalis* における各種 TALEN の比較

中島圭介、矢尾板芳郎

第 36 回日本分子生物学会、神戸市 (2013, 12)

(20) ネットイツメガエルの近交化・標準系統の樹立・提供

柏木昭彦、柏木啓子、花田秀樹、鈴木賢一、鈴木厚、竹林公子、倉林敦、中島圭介、田澤一朗、井川武、小林里美、竹中純子、玉城ゆうな、古野伸明、山本卓、住田正幸

第 36 回日本分子生物学会、神戸市 (2013, 12)

(21) *Xenopus tropicalis* における各種 TALEN の比較

中島圭介、矢尾板芳郎

第 84 回日本動物学会、岡山市(2013, 9)

(22)ツメガエルを知っていますか？

柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 田澤一郎,
小林里美, 竹中純子, 鈴木厚, 竹林公子, 古
野申明, 倉林敦, 中島圭介, 住田正幸
第 84 回日本動物学会、動物学ひろば、玉野
市(2013, 9)

(23)*Xenopus tropicalis* における各種
TALEN の比較

中島圭介、矢尾板芳郎

XCIJ 研究集会、美祿市(2013, 9)

(24)新しい実験動物としてのネッタイツメ
ガエル

柏木昭彦, 鈴木厚, 古野申明, 柏木啓子, 花
田秀樹, 田澤一郎, 倉林敦, 中島圭介, 竹林
公子, 小林里美, 竹中純子, 住田正幸
第 60 回日本実験動物学会、つくば市(2013,
5)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 圭介 (NAKAJIMA KEISUKE)

広島大学・理学研究科・助教

研究者番号：60260311

(2)研究分担者

矢尾板 芳郎 (YAOITA YOSHIO)

広島大学・理学研究科・教授

研究者番号：00166472