

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670098

研究課題名(和文) IR-LEGOとTALEN法による時空間特異的遺伝子発現制御の試み

研究課題名(英文) An attempt to produce a transgenic medaka that express a cilia-related gene in a spatiotemporally regulated manner

研究代表者

小林 大介 (KOBAYASHI, DAISUKE)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：60376548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：嚢胞腎を発症する繊毛関連遺伝子を時空間特異的に発現コントロールするために、当該遺伝子のノックアウト系統、Cre/loxP、ヒートショックプロモーターをくみ合わせるにより当該遺伝子発現のON/OFFを行う系統の作成を試みた。これまでにノックアウト個体の作出が終了している、作出したノックアウト個体における嚢胞腎の発症を経時的に観察したところ、人の嚢胞腎と同様成長するに従い嚢胞が拡大することが観察された。当該遺伝子発現のON/OFFを行う系統は現在作成中である。

研究成果の概要(英文)：I have attempted to produce a transgenic medaka that express a cilia-related gene in a spatiotemporally regulated manner by combination of Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) method, Cre/loxP system and heat-shock promoter. I have already achieved that a TALEN knockout medaka in which a cilia-related gene is knocked out. This fish line developed a polycystic kidney as expected. Cystic dilation was already detected at hatching and gradually increased in size as fish grew. This phenotype resembles that of human polycystic kidney disease. Construction of a transgenic line using kidney specific promoter is in progress.

研究分野：発生

キーワード：発生 繊毛 嚢胞腎

1. 研究開始当初の背景

遺伝子産物の機能を解析する方法として、その機能を阻害するためのノックアウトやノックダウンといった手法が用いられてきた。しかしながらマウスで用いられる古典的なノックアウトの手法では、発生初期に致死となる場合には後期の遺伝子機能を解析することができない(図1A)。この問題を克服するために、マウスではCre/LoxPシステムを利用して、組織特異的なノックアウト技術が一般化している。しかしながらこの手法は解析対象とする時期・部位特異的にCreの発現をコントロール出来るプロモーターが得られるか否かに大きく依存している(図1B)

一方研究開始当初、小型魚類等において遺伝子昨日阻害のための一般的な手法は、アンチセンスオリゴヌクレオチド(AS)を用いたノックダウンであった。しかし導入したASの寿命により長期間は解析不可能であり、任意の部位や時期で特異的にASを導入することも難しい(図1A)と、これらの実験的制約が無くなれば、もっと多くの発生現象が解析できるはずであると考えられた。

従来、遺伝子のノックアウトはES細胞を用いたマウスの系が一般的で、その他の脊椎で応物では効率よく遺伝子を破壊する方法は知られていなかった。研究開始当初、様々な生物で人工ヌクレアーゼを用いた遺伝子編集の技術が報告され注目を集めていた。この手法を用いれば、目的の遺伝子を自由にノックアウトできることが期待出来た。

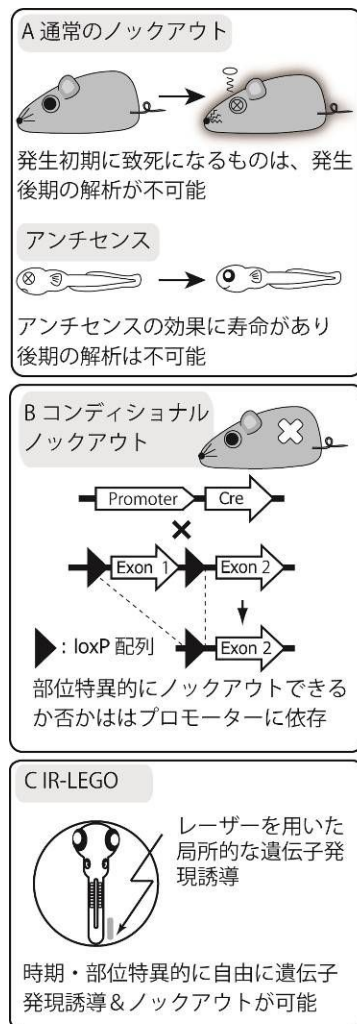


図1 従来のノックアウトと本研究で開発を目指したノックアウト法の比較

クアウトできることが期待出来た。

IR-LEGO (InfraRed Laser Evoked Gene Operator)法は顕微鏡下で赤外線レーザー照射によって、一定の領域や単一細胞を加熱し、ヒートショック応答により目的遺伝子を発現させる方法である。即ちヒートショックに反応するヒートショックプロモーターに目的遺伝子をつないだコンストラクトを用いたトランスジェニック生物を作出し、これに対し顕微鏡下で赤外線レーザーを用いて加熱することにより、目的遺伝子を任意の場所と時期で発現させることができる。

上記の人工ヌクレアーゼ法、Cre/loxPのシステム、IR-LEGOと組み合わせれば、より自由に任意の場所と時期で遺伝子の操作が可能になると期待された(図1C)

2. 研究の目的

実験生物学において、遺伝子ノックアウト(KO)やノックダウン(KD)の技術はその進展に大きく貢献している。しかし既存の技術では解析できない現象があるのも事実である。例えば単純なKOでは、発生初期に致死となる場合には後期の遺伝子機能を解析することができない。その解決の為に、Cre/loxPを用いたコンディショナルなKOが行われている。しかしこの方法は、解析したい時期に発現する適当なプロモーターが必須であり、必ずしも目的にあった遺伝子改変マウスを作れるわけではない。本研究の目的は、新たな遺伝子ノックアウト技術である人工ヌクレアーゼ法と、Cre/loxPのシステム、IR-LEGOを組み合わせ、任意の遺伝子の発現を時空間特異的にコントロールすることである。この方法により、従来解析が難しかった生命現象を解明することが期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝子時空間特異的な制御を行うために3つの系、(1)遺伝子のノックアウト法としてTALEN(Transcription Activator-Like Effector Nuclease)法を、(2)遺伝子の時期特異的な発現を制御するための方法としてCre/LoxPのシステムを、(3)時空間特異的なCreの発現を行うためのIR-LEGO、を利用する。

- (1) TALEN法は人工ヌクレアーゼであるTALENを利用したゲノム配列を直接に操作する方法である。任意の標的配列の選択が可能であることから次世代のノックアウト技術として注目され、小型魚類においては非常に高い効率を持つことが報告されている。本研究では解析対象とする遺伝子を本方法によりノックアウトすることとした(図2A)。
- (2) ノックアウトした遺伝子のレスキュー方法として(a)内在性のプロモーターを同定し、対象遺伝子をこのプロモーターの

制御下で発現させるコンベンショナルな方法、(b)BAC (Bacterial Artificial Chromosome) を用いた方法を用いることとした。(a)の場合には通常のコストラクションの際に、(b)の場合には相同組換えを利用してレスキュー遺伝子(の一部)を挟むように loxP 配列を挿入し、Cre 依存的にこの遺伝子の機能を欠失させることが出来るようにした(図 2B)。

(3) 任意の場所で Cre を発現させる方法として IR-LEGO とヒートショックプロモーターを利用することとした。IR-LEGO は赤外線レーザーにより、顕微鏡下において細胞レベルでヒートショックをかけることができる。このことによりヒートショックをかけた細胞のみで Cre の発現を誘導できる。

(1) のノックアウト個体に(2, 3)のコストラクトを導入した個体に対して、IR-LEGO によってヒートショックを誘発すれば、

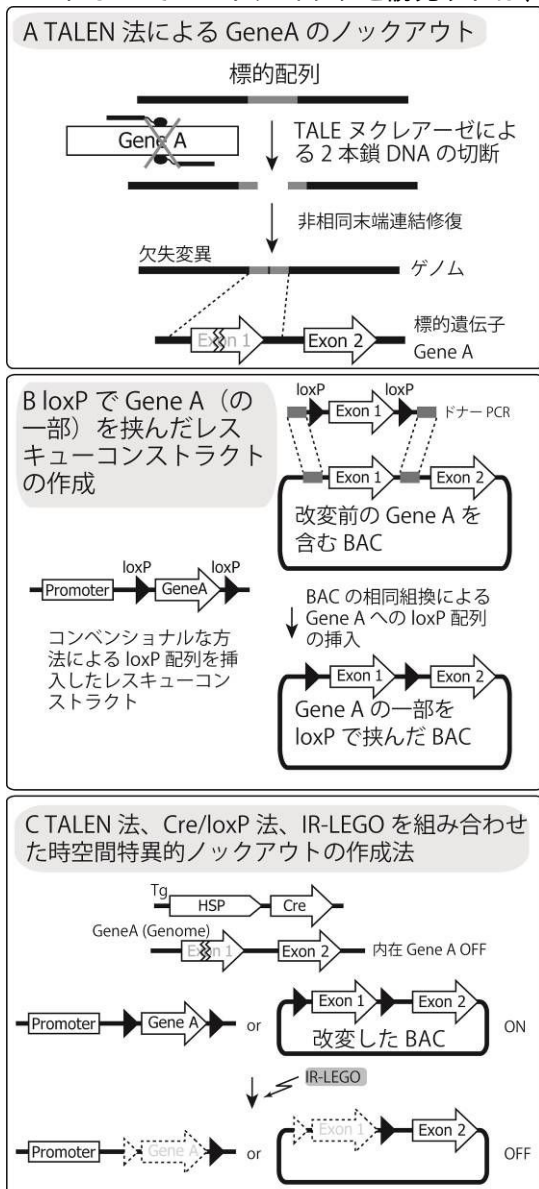


図 2 時空間特異的ノックアウトの作成法

ヒートショックをかけた部分でのみ Cre が発現し、(2)で作成したコンストラクトの loxP で挟んだ領域を抜き取り、その遺伝子を破壊することができる(図 2C)。ゲノム中の当該遺伝子は(1)により破壊済みなので、ヒートショックをかけた細胞では当該遺伝子の機能が特異的に破壊されることになる。

4. 研究成果

繊毛機能の異常に起因する嚢胞腎発症機構の解析のために、TALEN 法を用い、繊毛関連遺伝子のノックアウトシステムを作成した。このシステムを観察したところ、導入された変異がホモの場合において、期待されたとおり嚢胞腎を発症した(図 3)腎の発症は緩やかで、成魚においてもその症状が外面から判断できるのは、孵化後 5~6 ヶ月を要したが、切片を作成し観察したところ、既に孵化の段

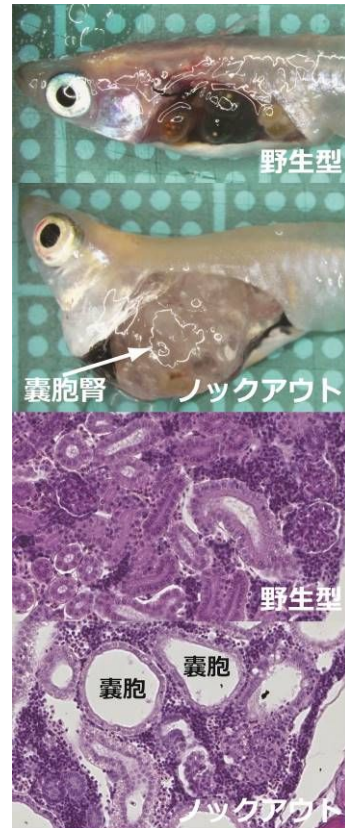


図 3 ノックアウトメダカにおいて観察された嚢胞腎

階で明らかな嚢胞の形成が観察された。またこの緩やかな症状の進行はヒトの嚢胞腎の症例とよく似ている。

これまでのところ、発現をコントロールするためのコンストラクトづくりは遅れているが、腎臓特異的ではないものの、腎臓にも発現するプロモーターを同定しており(図 4)、これらを利用して軸間特異的なノックアウトシステムの作成を目指したい。

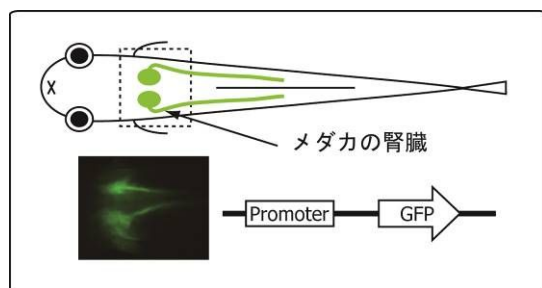


図 4 腎臓における発現をドライブするプロモーター

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 1 件)

・小林 大介、横山 尚彦 (2013) 繊毛は体の「右と左」を決める。
京都府立医科大学雑誌 第 112 巻 第 6 号
371-379 頁 査読なし

[学会発表](計 4 件)

・小林 大介、浅野 安信、中倉 敬、塚原達也、武田 洋幸、萩原 治夫、横山 尚彦
小型魚類発現データベースを利用した運動性繊毛関連遺伝子の同定と解析
第 119 回日本解剖学会 (2014 年 3 月 29 日
(土) 下野市)

・Daisuke Kobayashi, Anshin Asano, Takashi Nakakura, Tatsuya Tsukahara, Hiroyuki Takeda, Haruo Hagiwara, Takahiko Yokoyama
A Novel factor required for ciliary motility in Kupffer 's vesicle
19th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting
(2013 年 9 月 21 日(土) 仙台市)

・Daisuke Kobayashi, Dai Shiba, Takahiko Yokoyama
A Novel Candidate Cilia-Related Factor Involved in Left-Right Determination in Kupffer 's Vesicle
46th Annual meeting of JSDB (2013 年 5 月 30 日(木) 島根市)

・Daisuke Kobayashi, Tetsuaki Kimura, Kiyoshi Naruse, Hiroyuki Takeda and Takahiko Yokoyama
Identification of the causal gene of gastrointestinal atresia using medaka mutant
第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会 合同大会 (2015 年 3 月 22 日(日) 神戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

京都府立医科大学 医学研究科 助教
小林 大介 (KOBAYASHI, Daisuke)
研究者番号: 60376548