

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：15101
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26650082
 研究課題名(和文) コンディショナルノックアウトシステムの導入によりイモリの再生能力を解明する

 研究課題名(英文) Technological development of conditional knockout system in newts for investigation of cardiac regeneration

 研究代表者
 竹内 隆 (Takeuchi, Takashi)

 鳥取大学・医学部・教授

 研究者番号：70197268
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：代表者らはイモリの心臓再生を遺伝子レベルで解明するための研究基盤を構築することを目的とした研究を行い、以下の成果を得た。(1) CDK1遺伝子のコンディショナルノックアウトイモリの作製に取り組み、TALENによりCDK1のアレルを効率的に切断できること、未だ不完全ではあるがloxP配列を挿入できることを示した。(2) IR-LEGO法による遺伝子の局所的誘導法を確立した。(3) 遺伝子の発現データベース構築と効率的なゲノミッククローニング法を示した。(4) イモリにおけるCRISPR/Cas9 systemの条件を決定した。

これらの成果を原著論文3報、総説2報を発表した。学会発表を17件行った。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to establish a research base to elucidate cardiac regeneration of the newt at the gene level and obtained the following results, and obtained the following results. (1) We tried to generate a conditional knockout newt of the CDK1 gene, showed that TALENs can efficiently cleave CDK1 allele, and that incomplete but loxP sequence can be inserted to the CDK1 allele. (2) Local induction of genes by IR-LEGO method was established. (3) Construction of gene expression database and efficient genomic cloning method. (4) The conditions of CRISPR / Cas 9 system in newts were determined.

Based on these results, we published 3 articles of the original paper and 2 reviews of the review. We also made 17 presentations at academic conferences.

研究分野：発生生物学

キーワード：イベリアトゲイモリ 心筋細胞 再生 トランスジェニック 細胞系譜 コンディショナルノックアウト CRE-loxP IR-LEGO

1. 研究開始当初の背景

有尾両生類であるイモリは、既知の脊椎動物の中で最も強い再生能力を持ち、四肢や尾に加えて脳や網膜、さらには心臓までも再生することができる。しかしながら、イモリの再生能力を支える機構は、遺伝子のレベルではほとんど解明されていない。そこで研究代表者らは、イモリの再生現象を遺伝子のレベルで解析可能な実験系の構築を目指して、研究室での繁殖が容易なイベリアトゲイモリ (*Pleurodeles waltl*) を見だし、効率のよい遺伝子導入を確立した(図1)。本報告書においては、イベリアトゲイモリを以下「イモリ」と呼ぶ。また、作製されたトランスジェニック個体から約半年で次世代が得られること(Dev. Growth Differ., 2013)、タモキシフェン依存的にCRE-loxPの組換えができることなどを示してきた(図1)。

これらの成果により、遺伝子の強制発現や発現誘導によってイモリの再生機構を解析することは可能になった。しかし、外部から遺伝子やその転写産物を加えるだけでは、その遺伝子が真に必要なか否かは分からない。また、再生に関与する多くの遺伝子に対する通常のノックアウトでは胚性致死となることが予想される。そのためには、目的とする遺伝子を再生時にコンディショナル

性成熟に要する期間	♂ 6ヶ月～ ♀ 9ヶ月～
1回の産卵数	150～600個 (3000個/年)
産卵期	通年

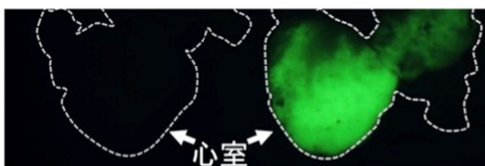


図1 イベリアトゲイモリの繁殖に関わる性質(上段)

遺伝子導入イベリアトゲイモリを用いたCRE-loxP組換えの例(下段)。タモキシフェンにより、心筋特異的にGFPを誘導した心臓(右)と対照(左)の蛍光写真。破線は心臓の輪郭。

ノックアウト(cKO)して、影響を解析することが強力な手段となる。しかし、マウス以外の脊椎動物でのcKOは困難であった。これに対して応募者らは、任意のDNA配列を切断する人工ヌクレアーゼ(TALEN)がイベリアトゲイモリでは極めてよく機能する

こと、さらにTALENによる遺伝子の破壊部位にloxPサイトを挿入できることも示した(Dev. Growth Differ., 2014)。これらの新しい手法を組み合わせることで、コンディショナルノックアウトイモリの作製が期待できる。これらの背景から、cKOイモリの作製とそれを用いた再生機構の解明に向けた研究を着想した。cKOイモリの作製を推進するため、および構築されたイモリの実験モデルをより広い範囲の研究に利用するためには、イモリのゲノム情報が必要となる。しかし、イモリはゲノムサイズがヒトの約10倍と巨大であるため、その配列情報は未整備である。従って、イモリのゲノム情報を効率的に取得できるクローニング法を確立することも、cKO技術と併せて求められていた。

本研究によってイモリに導入されるcKOイモリとそれに関連する実験技術は、心臓再生にとどまらず、様々な組織の再生研究に利用可能である。さらには胚の発生生物学や細胞生物学、生理学など広範な分野への応用が強く期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、イモリを用いた遺伝子コンディショナルノックアウト(cKO)システムや遺伝子発現誘導システムを確立することにより、イモリの強力な再生能力が如何なる遺伝子の機能により成立するのかを解明するための研究基盤を構築することにある。さらに構築した実験系を用いて、心臓再生に対する心筋細胞の増殖の寄与を明らかにすることを目指した。

イモリが心筋組織を再生する際には、既存の心筋細胞の増殖が重要であると考えられている。しかし、心筋細胞の肥大により再生が起こる可能性や、幹細胞が寄与する可能性も排除できない。そこで、再生時に心筋細胞特異的に細胞分裂に必須の遺伝子をcKOし、心筋細胞の分裂を停めることで心臓再生における心筋細胞の細胞分裂の寄与を明らかにする実験が重要である。従って本研究では、他の生物において細胞の増殖に必須であることが知られているCDK1遺伝子のコンディショナルノックアウトイモリを作製することを目指した。

本研究におけるcKOでは、標的とする組織特異的にCREリコンビナーゼを発現させる必要がある。従って、将来より広い範囲で

使用可能な実験モデルとするためには、実験の目的に併せた多様な組織特異的プロモーターを簡便にクローニングする必要がある。また、loxP 配列を挿入時の 2 本鎖切断誘導に必要な TALEN や CRISPR を設計する際にもゲノムからのクローニングが必要となる場合がある。そこで、イモリにおけるゲノミッククローニングを効率的に行うための方法の構築を行った。

研究の目的によっては、CRE の発現を組織レベルではなく、体の領域レベルで局所的に誘導する必要がある。このため、熱ショックプロモーターを利用した、局所的遺伝子発現誘導法の確立も併せて行うこととした。

3. 研究の方法

(1) cKO イモリ作製と、その手法の効率化

本研究では、心臓再生時における心筋細胞の増殖阻害実験を行うことを目指して、細胞増殖に必須である CDK1 遺伝子の cKO に取り組んだ。

基本的な方法としては、CDK1 タンパク質の重要な機能を担うドメインをコードする第 2 エキソンの上流側（第 1 イントロン内）と下流側（第 2 イントロン内）それぞれに人工ヌクレアーゼ TALEN による 2 本鎖切断を引き起こす。次いで、切断個所に loxP 配列をコードする DNA を挿入する。DNA を挿入するためのドナーとしては、loxP をコードする約 120 bp の 1 本鎖 DNA、または広島大学の鈴木らによって開発された TAL-Pitch vector を使用した。

これにより得られた個体は、CRE リコンビナーゼの活性依存的に CDK1 をノックアウトすることができる。

なお、TALEN は広島大学山本卓グループによって作製された。

(2) CRE 遺伝子の発現誘導法

cKO を行う為には標的の細胞で CRE リコンビナーゼを発現させる必要がある。組織特異的プロモーターを利用する方法に加えて、赤外線レーザーと熱ショックプロモーターを利用する IR-LEGO 法による局所的な遺伝子の発現誘導の条件検討を行った。この為、アフリカツメガエルの熱ショックプロモーター (HSP) の下流に GFP 遺伝子を繋いだコンストラクトを導入したイモリを作製した上で、

IR-LEGO による赤外線の照射を行い、GFP の発現が誘導されるか否かを解析した。

(3) イモリゲノミックライブラリーとクローニングシステムの構築

イモリはゲノムサイズが約 25Gbp と巨大であるため、ゲノム配列は殆ど不明である。このため、研究上必要となる遺伝子のプロモーター配列等を効率的にクローニングする方法が必要である。本研究では、イモリゲノム配列のクローニング法として Inverse PCR 法と Genomic walking 法による比較を行った。

目的とする遺伝子の発現情報 (RNA sequence) は、そのゲノム上の配列をクローニングする上で重要な情報となると同時にゲノム情報を補完できる。そこで、発生中の胚や、正常心臓および再生中の心臓において発現している RNA の de novo sequence を行った。

(4) CRISPR/CAS9 system の導入

本研究では、研究計画に従い、遺伝子の切断には TALEN 法を利用してきた。しかしながら研究の遂行中に、より簡便かつ効率の良い方法として細菌の獲得免疫機構を応用した CRISPR/Cas9 法が他の生物を対象とした研究において普及してきた。そこで CRISPR/Cas9 system をイモリに適用する為の条件検討を行った。遺伝子切断 (破壊) の対象として、体表の黒色素合成に関わるチロシナーゼ遺伝子を選んだ。この遺伝子に体する gRNA を設計した上で Cas9 タンパク質あるいはそれをコードする mRNA とともにイモリの受精卵にマイクロインジェクションを行い、効率よく遺伝子破壊が起こる条件を調べた。

4. 研究成果

(1) cKO イモリの作製に向けた、基本的技術の確立

まず、TALEN が標的とするゲノム配列を調べるためにインバース PCR 法によるクローニングを行った結果、必要な領域 (第 1 イントロンおよび第 2 イントロンの一部) をクローニングすることに成功した。

これらの標的配列に対して作製された TALEN をコードする mRNA をイモリの受精卵にマイクロインジェクションした結果、

標的部位を切断できることが確認できた。なお、CDK1 を単にノックアウトした個体では胚発生が停止したため、CDK1 はイモリにおいても発生に必要であることが示唆された。

次に、1 本鎖 DNA による loxP 配列の挿入を試みた結果、CDK1 のアリルには 1 本鎖 DNA による挿入が殆ど起こらないことが分かった。そこで、TAL-Pitch vector による挿入を試みた結果、標的とする 2 カ所のうち 1 箇所ではあるものの、loxP 配列が挿入された個体を得ることができた。これにより、イモリゲノムに対する DNA 配列の挿入には 1 本鎖 DNA よりも TAL-Pitch vector の方が適していることが示唆された。また、1 カ所に loxP が挿入された個体の子孫に対してさらに挿入操作を行うことも計画している。

これらの成果は、マウス以外の脊椎動物では未だ殆ど実用化されていない cKO 技術を可能にするための基礎的な情報となる。

(2) IR-LEGO 法による遺伝子の局所的誘導法の確立

赤外線照射条件を検討した結果、標的とした細胞を GFP でラベルするための適切な条件を決定することに成功した。また、IR-LEGO 法よりも広範囲の細胞に発現誘導を行うことができる Temperature stimulator の使用を試みた結果、この方法によっても誘導できることを確かめた。

併せて、cKO イモリの作製時に必要となる HSP-CRE の作製も行った。これらの研究過程から、野生型の HSP では熱ショックを行う以前に発現のリークが生じてしまうため、予期しない CRE-loxP 組換えが起こることが分かった。そこで、野生型 HSP の塩基配列を改変することで発現リークを防ぐ試みを行った結果、発現リークを大きく抑制することに成功した。今後はこの改変型プロモーターを使用して、CRE の発現誘導を行う計画である。

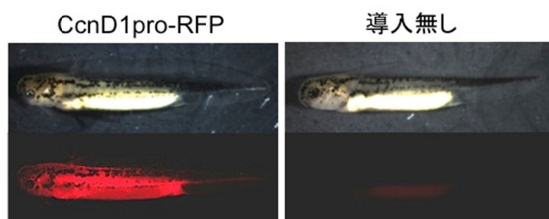


図2 本研究によりクローニングしたイモリ *cyclin D1* promoter 配列の下流に赤色蛍光タンパク質を繋いだベクターを導入した幼生(左)とその対照(右)。

この研究成果の一部については、国際雑誌に原著論文として報告した。また、作製したイモリを利用した他グループとの共同研究も進行中である。

(3) 遺伝子の発現データベースの構築と効率的なゲノミッククローニング法の確立

本研究において検討した、CDK1 遺伝子のイントロン領域や *cyclin D1* 遺伝子のプロモーター領域を始め、複数の遺伝子のゲノム配列について短期間でクローニングすることができた。*cyclin D1* 遺伝子のプロモーター領域については、クローニングした配列の下流に傾向タンパク質をつないだベクターをイモリ個体に導入した。その結果、その配列に転写制御活性があることが確かめられた(図2)。

cyclin D1 遺伝子は再生における心筋細胞の増殖を制御する遺伝子の最も重要な候補の一つであるので、今回得た情報を基に、プロモーター領域の機能を解析する。

遺伝子の発現データベースに付いては、他のグループによって取得された情報と統合することで、より広い範囲をカバーするデータベースの作製およびウェブサイトを紹介した一般公開に向けた準備が進行中である。

(4) イモリ CRISPR/Cas9 system の確立

本研究では人工合成した短い RNA を guideRNA として用いた。さらに Cas9 を mRNA の状態でインジェクションする場合と、タンパク質でインジェクションする場合を比較した結果、タンパク質をインジェクションする方が極めて効率よく標的の遺伝子を破壊できることが示された。また、guideRNA の配列次第では、インジェクションを行った個体でほぼ完全にチロシナーゼ遺伝子を破壊できることが示された(図3)。この方法は従来の TALEN 法よりも簡便で効率

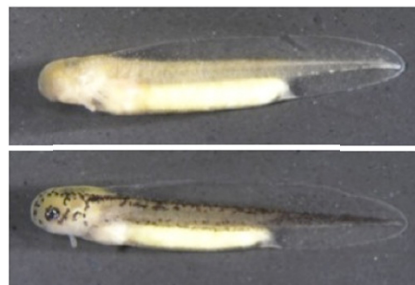


図3 CRISPR/Cas9 system によりチロシナーゼを破壊した個体(上)とその対照(下)。

的であることが分かった。

本研究により確立した方法は現在論文の投稿準備中である。またこの方法を利用して他の科研費の課題を遂行する上で重要な遺伝子の KO 法として利用されている。

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5件)

林 利憲、竹内 隆 イモリとマウスを結ぶための新しい実験モデル 生体の科学 査読無し (2016) 67, 264-269.

林 利憲、竹内 隆 再生生物学の新時代へ-古くて新しいモデル生物イベリアトゲイモリ 実験医学 査読無し (2016) 34, 1473-1476.

Tane, S., Okayama, H., Ikenishi, A., Amemiya, Y., Nakayama, I. K., and Takeuchi, T.*. Two inhibitory systems and CKIs regulate cell cycle exit of mammalian cardiomyocytes after birth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有り(2015) 466, 147-154.
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.102.

Kawasumi, A., Hayashi, T., Kobayashi, T., Nagayama, C., Hayashi, S., Kamei, Y., Morishita, Y., Takeuchi, T., Tamura, K., Yokoyama, H*. Application of local gene induction by infrared laser-mediated microscope and temperature stimulator to amphibian regeneration study. *Dev. Growth Differ.*, 査読有り(2015) 57, 601-613.
doi: 10.1111/dgd.12241.

Tane, S., Kubota, M., Okayama, H., Ikenishi, A., Yoshitome, S., Iwamoto, N., Satoh, Y., Kusakabe, A., Ogawa, S., Kanai, A., Molkentin, J. D., Nakamura, K., Ohbayashi, T., and Takeuchi, T.*. Repression of *cyclin D1* expression is necessary for the maintenance of cell cycle exit in adult mammalian cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.*, 査読有り (2014) 289, 18033-18044.
doi: 10.1074/jbc.M113.541953.

[学会発表](計17件)

林 利憲、茗荷 あゆみ、東 翔平、土屋 絵莉、竹内 隆 新規実験モデル動物のイベリアトゲイモリが可能にする新しい再生研究 再生医療学会総会 シンポジウム 招待講演 2017年3月8日 仙台国際

センター(宮城県仙台市)

Hayashi, T., Myouga, A., Tsuchiya, E., Azuma, S., Sato and Takeuchi, T. Cardiac regeneration in newts achieved based on the compensatory manner. ICZ/ZSJ Joint Meeting Symposium (invited) Nov 17th, 2017 OIST, Naha city, Okinawa

竹内 隆 マウスとイモリを用いた再生研究~再生能の違いは何が決めるか? CREST 研究課題「細胞動態の多様性・不均一性に基づく組織構築原理の解明」研究集会特別講演 2017年2月20日 松江エクセルホテル東急(島根県松江市)

竹内 隆 ワークショップ主催:異種間比較が解き明かす生命システムの普遍性と多様性 2015年12月1日 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

竹内 隆、東 翔平、雨宮 由季、林 利憲 マウスとイモリとを比較して再生能力の違いを決める機構を探る 日本分子生物学会 ワークショップ 招待講演 2015年12月1日 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

林 利憲、土屋 絵莉、茗荷 あゆみ、竹内 隆 イモリの心臓再生は既存の心筋細胞による補償的再生によって成立する 日本分子生物学会 口頭発表、ポスター発表 2015年12月3, 4日 神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

林 利憲、竹内 隆 イベリアトゲイモリを用いた再生研究の展開 日本動物学会 シンポジウム 招待講演 2015年9月18日 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

Takeuchi, T., Tane, S., Okayama, Ikenishi, A., H., Amemiya Y., Ohdira, Y., Myouga, A., Azuma, S., Hayashi, T. What determines differences in cardiac regenerative abilities between mouse and newts? 日本分子生物学会 シンポジウム 招待講演 2014年11月25-27日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

東 翔平、松本 晃、佐藤 幸夫、竹内 隆、林 利憲 イモリの cyclin D1 の発現を制御するプロモーター領域のクローニングと機能解析 日本分子生物学会 2014年11月25-27日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

茗荷 あゆみ、横谷 直樹、竹内 隆、林 利憲 イモリの心臓再生過程における分化した心筋細胞の寄与を解明する 日本分子生物学会 2014年11月25-27日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

雨宮 由季, 田根 将志, 大平 吉乃, 茗荷 あゆみ, 林 利憲, 竹内 隆 中心体は、心筋細胞の増殖停止に関与するのか? 日本分子生物学会 2014年11月25-27日 パシフィック横浜(神奈川県横浜市)

林 利憲, 茗荷 あゆみ, 佐久間 哲史, 亀井 保博, 横山 仁, 山本 卓, 竹内 隆, 有用なモデル動物となり得る、イペリアトゲイモリを用いた遺伝子操作法の確立 日本分子生物学会 2014年11月25-27日 パシフィック横浜(神奈川県横浜市)

Hayashi, T., Sakuma, T., Myouga, A., Sakamoto, K., Yokotani, N., Inoue, T., Kawaguchi, E., Agata, K., Yamamoto, T., and Takeuchi, T. Genome editing is a powerful tool for studies in newt cardiac regeneration. 日本遺伝学会大会 ワークショップ 招待講演 2014年9月17日 長浜バイオ大学(滋賀県長浜市)

Takeuchi, T., Tane, S., Okayama, Ikenishi, A., Amemiya, Y., Myouga, A., Hayashi, T. Mechanisms of cell cycle exit and the maintenance in mouse cardiomyocytes, and the roles for regenerative abilities in mouse and newts. EMBO Conference The molecular & Cellular Basis of Regeneration & Tissue Repair, Sept. 6-10, 2014, Sant Feliu de Guixols (Spain).

Hayashi, T., Myouga, A., Yokotani, N., Takeuchi, T. Development of molecular genetic system for newts and lineage tracing analyses in cardiac regeneration. EMBO Conference The molecular & Cellular Basis of Regeneration & Tissue Repair, Sept. 6-10, 2014, Sant Feliu de Guixols (Spain).

Tane, S., Okayama, H., Ikenishi, A., Satoh, Y., Takeuchi, T. Cell cycle exit in cardiomyocytes is initiated by p21^{Cip1} and p27^{Kip1}, and maintained by two inhibitor systems. 日本発生生物学会、2014年5月27-30日、ウイック愛知(愛知県名古屋市)

Hayashi, T., Sakamoto, K., Sakuma, T., Myouga, A., Yokotani, N., Inoue, T., Kawaguchi, E., Agata, K., Yamamoto, T., Takeuchi, T. TALEN-mediated genome editing is very useful in Iberian ribbed newts (*Pleurodeles waltl*), an experimental model animal for regeneration. 日本発生生物学会、2014年5月27-30日、ウイック愛知(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計4件)

竹内 隆 (2017) 心臓と循環器系の発生、

“動物学の百科事典”(動物学の百科事典)編集委員会編集)丸善出版、印刷中

竹内 隆(2017) 心臓の発生、“動物の事典”(末光隆志その他編集)朝倉書店、印刷中

Hayashi, T., and Takeuchi, T. (2015) Mutagenesis in Newts: Protocol for Iberian Ribbed Newts. In TALENs: Methods and Protocols. (eds. Kuhn, R., Wefers, B., and Wurst, W.) , pp119-126, Springer New York. doi: 10.1007/978-1-4939-2932-0_10.

Hayashi, T. and Takeuchi, T. (2015) Gene Manipulation for Regenerative Studies Using the Iberian Ribbed Newt, *Pleurodeles waltl*. In Salamanders in Regeneration Research. (eds. A. Kumar and A. Simon), pp297-305, Springer New York. doi: 10.1007/978-1-4939-2495-0_23.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

鳥取大学医学部生命科学科生体情報学分野ホームページ
<http://www.med.tottori-u.ac.jp/biosign/5982.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 隆 (Takeuchi Takashi)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号: 70197268

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

林 利憲 (Hayashi Toshinori)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号: 60580925

(4) 研究協力者

佐藤 幸夫 (Satoh Yukio)
鳥取大学・医学部・助教

東 翔平 (Azuma Shouhei)
鳥取大学・大学院医学系研究科・大学院生

中島 美英 (Nakajima Mie)
鳥取大学・大学院医学系研究科・大学院生