

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2015～2016  
課題番号：15K14332  
研究課題名(和文) 大脳皮質特異的なノックアウト動物作成法の開発

研究課題名(英文) Gene knockout in the cerebral cortex

## 研究代表者

新明 洋平 (Shinmyo, Yohei)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：00418831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、子宮内エレクトロポレーションとCRISPR/Cas9システムとを組み合わせることにより、大脳皮質特異的な遺伝子ノックアウト法の確立を目指した。マウス大脳皮質にSatb2遺伝子に対するCRISPRコンストラクトを導入し、Satb2の発現を免疫染色により調べた。その結果、Satb2に対するCRISPRコンストラクトが導入された細胞のほとんどで、Satb2の発現が消失していた。これらの結果から、子宮内エレクトロポレーション法を用いたCRISPR/Cas9の導入により大脳皮質神経細胞において効果的に標的遺伝子をノックアウトできることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The CRISPR/Cas9 system has recently been adapted for generating knockout mice to investigate physiological functions and pathological mechanisms. Here, we report a highly efficient procedure for brain-specific disruption of genes of interest in vivo. We constructed pX330 plasmids expressing humanized Cas9 and single-guide RNAs (sgRNAs) against the Satb2 gene, which encodes an AT-rich DNA-binding transcription factor. We found that the introduction of pX330-Satb2 into the developing mouse brain using in utero electroporation led to a dramatic reduction of Satb2 expression in the transfected cerebral cortex, suggesting DSBs had occurred in the Satb2 gene with high efficiency. Thus, our procedure combining the CRISPR/Cas9 system and in utero electroporation is an effective and rapid approach to achieve brain-specific gene knockout in vivo.

研究分野：神経発生生物

キーワード：大脳皮質 ゲノム編集 CRISPR/Cas9

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトなどの高等哺乳動物では大脳皮質は特に発達しており、表面には明瞭なしわ(脳回)が存在する。脳回の獲得は脳機能の発達の基盤であると考えられており、従ってその形成メカニズムの解明は神経科学の重要研究課題の一つである。しかし分子遺伝学的研究に用いられるマウスでは脳回は存在せずに、マウスを用いた解析が困難であるために脳回の形成機構は不明な点が多い。

イタチ科に属するフェレットは、脳回や眼優位性カラムなど高等哺乳動物に特徴的な発達した脳神経構築を持つことから形態学および生理学的研究に多く用いられてきたが、分子遺伝学的研究は解析手法が確立されておらず遅れていた。そこで申請者の所属研究室ではこれまでにフェレットでの分子遺伝学的解析を可能とするために、子宮内エレクトロポレーション法を応用しフェレット大脳皮質への遺伝子導入を世界に先駆けて成功させてきた(Kawasaki et al., *Molecular Brain*, 2012; Kawasaki et al., *Biology Open*, 2013)。次の大きな課題は、loss-of-function 実験を行うための遺伝子ノックアウト技術の開発である。そこで本研究では、子宮内エレクトロポレーションと CRISPR/Cas9 システムとを組み合わせることにより、フェレット大脳皮質特異的な遺伝子ノックアウト法の確立を目指した。さらに、その技術を用いて *Satb2* 遺伝子をノックアウトし、皮質間軸索結合の脳回形成における重要性を解析する。*Satb2* 遺伝子は、大脳皮質内に軸索を投射する神経細胞の運命決定に必須の転写因子であり(Alcamo et al., *Neuron*, 2008)、そのノックアウトマウスでは皮質間軸索が減少し、皮質下に投射する軸索が増加する。従って、*Satb2* をノックアウトしたフェレットでは皮質間線維が減少することが期待され、脳回形成における皮質間軸索結合の重要性の解析が可能となる。

## 2. 研究の目的

高等哺乳動物に特徴的な発達した脳神経系は高次脳機能の基盤と考えられており、その形成機構の解明は神経科学の重要研究課題の一つである。例えば、ヒトなどの大脳皮質の表面には脳溝・脳回が存在しているが、マウ

スの大脳皮質には脳回が存在しないため、その形成機構の理解は遅れている。

本研究では、発達した脳神経系を持つ高等哺乳動物フェレットを用いて、子宮内エレクトロポレーションと CRISPR/Cas9 システムとを組み合わせることにより、高等哺乳動物における大脳皮質特異的な遺伝子ノックアウト技術の確立を目指した。CRISPR/Cas9 システムは部位特異的なヌクレアーゼによるゲノム編集ツールであり、ZFN や TALEN に続く第三世代の手法として最近大きな注目を集めている。Cas9 ヌクレアーゼと標的配列を含むガイド RNA と共発現させるだけで部位特異的な DNA 切断が可能となることが知られている。本研究では最初に、安価に入手できるマウスを用いて、子宮内エレクトロポレーションによる CRISPR/Cas9 の導入により、大脳皮質特異的な遺伝子ノックアウトができる条件を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) *Satb2* 遺伝子の標的配列の選定と pX330-*Satb2* プラスミドの作成

hCas9 (human codon optimized Cas9) とガイド RNA を同時に発現できるプラスミド (pX330) が開発されているので(図1)、このベクターを使用した。*Satb2* の開始コドンの直下と機能ドメイン領域において、標的配列を決定した。

### (2) pCAG-EGxxFP プラスミドを用いた標的配列に対する DNA 切断活性の評価

pCAG-EGxxFP プラスミドを用いて DNA 切断活性を簡便に可視化する方法が開発されており、自作した pX330 プラスミドを容易に評価することが可能になっている。そこで、HEK293 細胞を用いて、pX330-*Satb2* の評価を行った。*Satb2* 標的配列を含むゲノム領域を PCR (数百 bp) で増幅し、pCAG-EGxxFP プラスミドに挿入した。対応する pX330-*Satb2* と共に HEK293 細胞に導入して、GFP 蛍光強度を観察した。

### (3) 子宮内エレクトロポレーションによる pX330-*Satb2* プラスミドの導入とその効果の評価

3 種の pX330-*Satb2* プラスミド

(pX330-Satb2-272, -524, -2129)を、子宮内エレクトロポレーションにより胎仔 15 日目の大脳皮質 (Satb2 発現細胞が多く存在する 2/3 層に入る)に導入した。この際、pCAG-EGFP プラスミドを共導入した。出生数日後の固定脳において、Satb2 抗体による免疫染色を行い、GFP 陽性細胞において Satb2 発現が消失するかどうかを調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) Satb2 遺伝子の標的配列の選定と pX330-Satb2 プラスミドの作成

最初に、Satb2 遺伝子内に 9 つの標的候補配列を選定した。次に、CRISPR design tool (<http://crispr.mit.edu/>) を用いてオフターゲット検索を行い、最終的に 3 種の pX330-Satb2 プラスミド (pX330-Satb2-272, -524, -2129) を作成した。

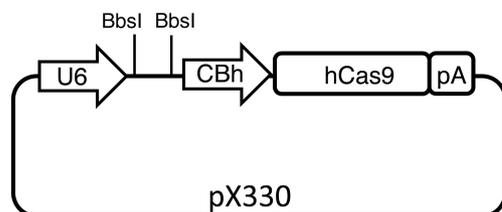


図1 本実験に用いた pX330 プラスミド。

##### (2) pCAG-EGxxFP プラスミドを用いた標的配列に対する DNA 切断活性の評価

pX330-Satb2-272 とその標的配列を持つ pCAG-EGxxFP-Satb2-272 を共に HEK293 細胞に導入したところ、48 時間後において強い GFP 蛍光が観察された。一方、標的配列を持たない pCAG-EGxxFP-Satb2-524 もしくは pCAG-EGxxFP-Satb2-2129 を導入した場合には、GFP 蛍光は観察されなかった。pX330-Satb2-524 と-2129 についても同様の結果が得られた。これらの結果から、3 種すべての pX330-Satb2 プラスミド (pX330-Satb2-272, -524, -2129) は標的配列を切断する活性があることが明らかとなった。

##### (3) 子宮内エレクトロポレーションによる pX330-Satb2 プラスミドの導入とその効果の評価

3 種の pX330-Satb2 プラスミド

(pX330-Satb2-272, -524, -2129) を子宮内エレクトロポレーションにより胎仔 15 日目の大脳皮質に導入し、Satb2 抗体による免疫染色を行った。重要なことに、すべての導入個体において、GFP 陽性細胞の多くで Satb2 の発現が減少していた。特に、pX330-Satb2-2129 を用いた場合にノックアウト効率が最も高く、約 64% の GFP 陽性細胞において Satb2 発現がほぼ完全に消失していた (図 2)。

以上の結果から、子宮内エレクトロポレーション法を用いた CRISPR/Cas9 の導入により大脳皮質神経細胞において効果的に標的遺伝子をノックアウトできることが分かった。現在、フェレットにおいてこの方法を応用している段階である。

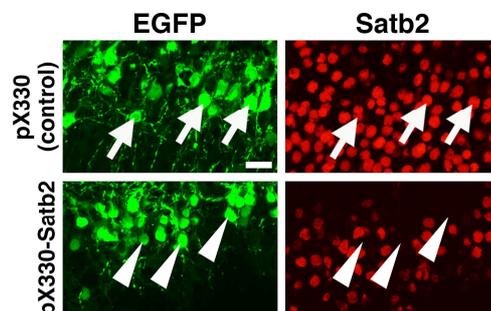


図2 pX330-Satb2 導入個体における Satb2 の発現。

コントロールサンプルにおいて、GFP 陽性細胞は Satb2 陽性であった (矢印)。一方、pX330-Satb2 導入個体では、GFP 陽性細胞では Satb2 の発現が消失した (矢頭)。

#### 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 6 件)

1. Shinmyo Y. and Kawasaki H.  
CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using *in utero* electroporation. *Current Protocols in Neuroscience*, 79, 3.32.1-3.32.11, 2017. doi: 10.1002/cpns.26. 査読有
2. Matsumoto N., Hoshiba Y., Morita K., Uda N., Hirota M., Minamikawa M., Ebisu H.,

- Shinmyo Y. and Kawasaki H. Pathophysiological analyses of periventricular nodular heterotopia using gyrencephalic mammals. *Human Molecular Genetics*, 26 (6), 1173-1181, 2017. 査読有
3. Toda T., Shinmyo Y., Dinh Duong T. A., Masuda K., and Kawasaki H. An essential role of SVZ progenitors in cortical folding in gyrencephalic mammals. *Scientific Reports*, 6, 29578, 2016. doi: 10.1038/srep29578. 査読有
4. <sup>#</sup>Shinmyo Y., <sup>#</sup>Tanaka S., Tsunoda S., Hosomichi K., Tajima A. and Kawasaki H. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using *in utero* electroporation. *Scientific Reports*, 6, 20611, 2016. doi: 10.1038/srep20611 <sup>#</sup>: These authors contributed equally to this work. 査読有
5. <sup>#</sup>Shinmyo Y., <sup>#</sup>Riyadh M. A., Ahmed G., Naser I. B., Hossain M., Takebayashi H., Kawasaki H., Ohta K. and Tanaka H. Draxin from neocortical neurons controls the guidance of thalamocortical projections into the neocortex. *Nature Communications*, 6, 10232, 2015. doi: 10.1038/ncomms10232. <sup>#</sup>: These authors contributed equally to this work. 査読有
6. <sup>#</sup>Masuda K., <sup>#</sup>Toda T., <sup>#</sup>Shinmyo Y., Ebisu H., Hoshiya Y., Wakimoto M., Ichikawa Y. and Kawasaki H. Pathophysiological analyses of cortical malformation using gyrencephalic mammals. *Scientific Reports*, 5, 15370, 2015. doi: 10.1038/srep15370. <sup>#</sup>: These authors contributed equally to this work. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

新明 洋平 糖鎖による軸索ガイダンス分子 Draxin の機能制御機構の解明 第13回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム 2015.10.20. ウィンク愛知

〔図書〕(計2件)

1. Shinmyo Y., Masuda K., Hoshiya Y., Ebisu H. and Kawasaki H. Molecular investigations of the structure and development of the brain of carnivores, in **Brain Evolution by Design**, Shigeno S., Murakami Y. and Nomura T. eds., Springer Publishers, New York, P311-P327, 2017.
2. 新明洋平、軸索ガイダンス分子Draxinが担う脳神経回路形成機構 Roles of an axon guidance protein Draxin in neural circuit formation. 金沢大学十全医学会雑誌 総説 第125巻 第2号 P55 - P59 (2016)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

新明 洋平 (Shinmyo, Yohei)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号：00418831

### (2)研究分担者

河崎 洋志 (Kawasaki, Hiroshi)  
金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン研究センター・教授  
研究者番号：50303904