

平成 30 年 1 月 25 日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
平成 28 年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属： 奈良先端科学技術大学院大学

職名： 准教授

氏名： 笹井 紀明

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：新規サイクリン関連遺伝子の脊髄神経管分化・成長における役割
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：
統合生体プロセス分野 廣田 圭司 准教授
3. 研究期間：平成 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日
4. 研究経過及び研究成果：

ヘッジホッグ（Hedgehog）と総称される遺伝子群は、胚発生における細胞の増殖や分化を制御する細胞外シグナル因子をコードする。申請者は、このうち特にソニック・ヘッジホッグ（Sonic Hedgehog; Shh）によって制御される細胞増殖を直接制御するエフェクター分子を同定する目的で、Shh の下流遺伝子を mRNA シーケンス法によるトランスクリプトーム解析によって網羅的に解析し、それらの中から候補遺伝子として、新規のサイクリン依存性キナーゼ（以下 vCDK と呼ぶ：v は ventral（腹部）の意味）を同定した（メタデータの一部を Sasai et al., 2014 で発表）。サイクリンやその関連因子は細胞分裂や増殖に関与することが示唆されるが、vCDK の機能は新規であるためにほとんど不明である。

申請者らのニワトリ胚を用いた予備的解析の結果、vCDK は胚性期前駆細胞の増殖に関わっていることが明らかとなった（図 1）。そこで、vCDK の個体レベルにおける機能を、遺伝子機能を完全に破壊したマウス個体を用いて解析することにした。

この経緯のもとに、平成 28 年 4 月より京都大学再生医科学研究所（当時）・統合生体プロセス分野の廣田圭司准教授とともに遺伝子欠損マウスの作成を開始した。まず CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子破壊法により、vCDK の遺伝子座のエキソン 3 にガイド RNA を設計し、4~60 塩基対程度の欠損を生じたキメラまたはヘテロマウスを 60% 程度の高確率で多数得ることに成功し、そのうちの 1 つの系統を継代しながら解析することとした。

その結果、vCDK 遺伝子破壊マウスは生存可能であるが、体のサイズが野生型に比べて極端に小さく（図 2 A,B）、組織レベルでは腎臓の形成不全（図 2 C,D）が見られている。この表現型から、vCDK が神経発生のみならず、広く器官形成やその機能維持、またはそのサイズ決定に対して重要な役割を担うことが強く示唆された。

また、さらなる細胞レベルでの解析には vCDK の器官内における発現を細胞レベルで捕捉する必要がある。この目的で、vCDK の遺伝子座に eYFP 遺伝子を挿入したマウスを同様に CRISPR/Cas9 法により作成することにした。この作成では、vCDK 遺伝子の翻訳スタートコドン（ATG）の直下にガイド RNA をデザインして eYFP 遺伝子を挿入し、本来の遺伝子の機能が破壊される代わりに eYFP が発現するようにした。この目的で、eYFP をコードする領域とその前後各 1kb のゲノム領域（計 2.9kb）を人工遺伝子合成により作成し、人工遺伝子断片、ガイド RNA、Cas9 タンパク質を受精卵に顕微注入した。この結果、37 個体中 10 個体という高確率で挿入が見られ、eYFP ノックインマウスが産出されていることが示唆された。このマウスを解析することにより、ヘテロマウスの解析からは器官内における発現位置の確認が、ホモマウスの解析からは vCDK 遺伝子欠損の表現型が、それぞれ観察できると期待される。

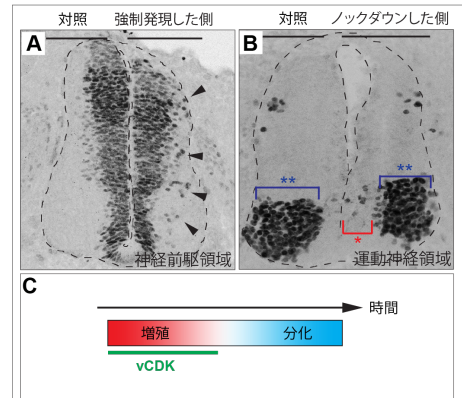
この解析は、平成 29 年度も継続して行う予定である。

（参考文献） Sasai et al. (2014) PLoS Biol. 12, e1001907

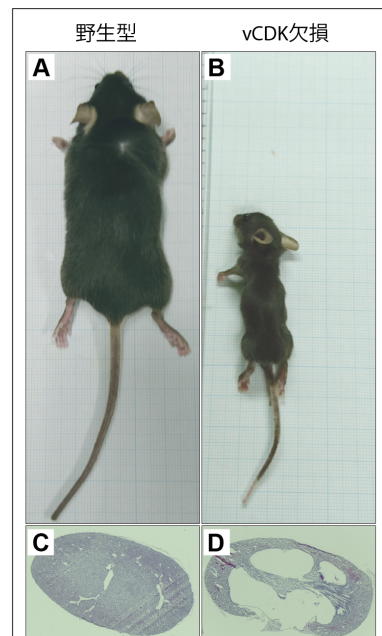
5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表、特許取得等
（論文：1 件）

1. Akiko Nishi-Hori, Hitomi Watanabe, Minori Kadoya, Tomo Ichikawa, Gen Kondoh, Keiji Hirota,



（図 1）ニワトリ胚を用いた vCDK の予備的解析。(A) vCDK の強制発現により、前駆細胞の増殖が著しく亢進した（矢頭）。(B) siRNA により分化が尚早(*)になり、神経細胞数が減少(**)。(C) vCDK が前駆細胞の増殖をコントロールしている。



（図 2）(A,B) 野生型と vCDK 欠損マウスの 4 週齢の外観。(C,D) 腎臓の表現型。欠損マウスでは大部分の構造が欠失している。

Noriaki Sasai

“Essential roles of a novel Cyclin Dependent Kinase in the neurogenesis and organogenesis.” (2017)

論文準備中

(学会発表：1件)

1. 笹井紀明「神経管のパターン形成における多次元制御メカニズム」

Tokyo Vertebrate Morphology Meeting (東京慈恵会医科大学：招待講演) 2016年8月

(特許取得等)

該当なし