

第7回 北陸銀行若手研究者助成金 研究実績報告書

氏名	所属・職名		助成金額
新明 洋平	金沢大学医薬保健研究域医学系・准教授		800000 円
研究課題名	脳特異的ノックアウト技術の開発と脳疾患病態解析への応用		
研究の概要	<p>〔研究開始当初の背景, 研究の目的, 研究の方法等について記入〕</p> <p>脳神経系はヒトなどの高等哺乳動物で特に発達しており、高次脳機能の基盤と考えられている。しかし現在、医学研究に用いられるマウスの脳神経系は比較的単純であることから、高等哺乳動物で特徴的に発達した脳神経系の分子遺伝学的解析は遅れている。例えば、ヒトの大脳皮質の表面にあるシワ（脳回）はマウスには存在しない。そこで本研究課題では、高等哺乳動物フェレットを用いて、子宮内電気穿孔法と CRISPR/Cas9 システムとを組み合わせ、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す。</p>		
研究の成果	<p>本研究課題では、最初に CRISPR/Cas9 と子宮内電気穿孔法を組み合わせた大脳皮質特異的な遺伝子ノックアウト法を検討するために、安価で入手できるマウスを用いて実験を行った。標的遺伝子として、発生過程において交連性の軸索投射を持つ神経細胞の運命決定に必要な転写因子 <i>Satb2</i> 遺伝子を選択した。<i>Satb2</i> ノックアウトマウスでは脳梁軸索が減少し、皮質下へ投射する軸索が増加することが知られている。そこで我々は <i>Stab2</i> 遺伝子をノックアウトするために、胎生 15 日目に子宮内電気穿孔法を行い CRISPR/Cas9 用の px330-<i>Satb2</i> プラスミドと pCAG-EGFP プラスミドを <i>Satb2</i> 陽性細胞が存在するマウス大脳皮質 II/III 層へ導入した。出生後 4 日目に抗 <i>Satb2</i> 抗体で免疫染色をした結果、EGFP 陽性細胞の大部分で <i>Satb2</i> の発現が消失していることを見出した。また EGFP 陽性軸索に関して、脳梁軸索が減少し異所的に皮質下へ向かう軸索が増加していることがわかった。これらの結果は、<i>Satb2</i> 遺伝子が効率的にノックアウトされていることを示唆している。以上より、子宮内電気穿孔法と CRISPR/Cas9 を組み合わせることにより大脳皮質特異的に遺伝子ノックアウトを迅速に作成できることから、この手法は遺伝子解析に有用であると考えられる。現在、フェレットでその有効性を検討している。</p>		
研究成果発表状況	Shinmyo Y., Tanaka S., Tsunoda S., Hosomichi K., Tajima A. and Kawasaki H. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using <i>in utero</i> electroporation. <i>Scientific Reports</i> , 6, 20611, 2016. doi: 10.1038/srep20611		
経費の執行状況	区 分	執行額 (円)	備 考
	消耗品 旅費	750880 49120	
	合計	800000	