

Title	ゲノム編集技術CRISPR/Cas9で作出したメダカSRF変異系統による腫瘍抑制モデルの作製
Sub Title	Establishment of in vivo tumor suppression model using medaka srf mutant produced by genome editing technique CRISPR/Cas9
Author	松崎, ゆり子(Matsuzaki, Yuriko)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2019
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>所属研究部門では、血清応答因子Serum Response Factor(SRF)に結合するMegakaryoblastic Leukemia (MKL) 1の細胞内局在が、アクチン動態によって制御され、前駆細胞から脂肪細胞への分化を誘導することを見出した。現在は、アクチン細胞骨格の動態を変化させることで、がん幹細胞を分化転換し、腫瘍増殖を抑制できないだろうかということについて研究している。本研究では、メダカを用いたin vivoの実験で腫瘍抑制モデルとしての応用可能性を検討した。まず始めにゲノム編集技術CRISPR/Cas9を用いてメダカ血清応答因子Serum Response Factor(SRF)遺伝子の改変を試みSRF変異メダカ系統を樹立した。ゼブラフィッシュやメダカなどの魚類では、多くの遺伝子で重複が見られ、ゼブラフィッシュでは2種のSRF遺伝子が存在した。しかしメダカSRF遺伝子は、少なくとも現在利用できるデータベース上では単一であった。CRISPR/Cas9技術によりSRF遺伝子のDNA結合領域付近で変異を生じるように標的配列を設定し、約500塩基の欠失を持つ系統、もしくは、変異によるフレームシフトでDNA結合領域およびその下流を持たない系統の樹立を目指した。その結果、srf:del411(411 bpの欠失を持つ)、srf:del6(6 bpの欠失を持つ)、srf:ad2ch4(4 bpの置換および2 bpの付加によりフレームシフトしDNA結合領域を持たない)、srf:del9(9 bpの欠失を持つ)、の4種のSRF変異系統を樹立することができた。srf:del411、srf:ad2ch4変異をホモ接合で保持する個体は孵化することができない。srf:del6、srf:del9は2および3アミノ酸欠失のみであり、ホモ接合個体は野生型と生育速度、生存期間、体長などに大きな差はみられなかった。これら4系統について、今後、生存能、表現型を観察すると共に免疫組織染色、ウェスタンブロット解析を行う。各組織から抽出したcDNA、タンパクでSRF下流因子の転写および産物量の変化を解析する。さらにSRF変異個体と野生型個体に腫瘍細胞の移植を行い腫瘍塊の増殖速度を比較し、腫瘍抑制の有無を明らかにする。</p> <p>In my research division, it was found that the subcellular localization of Megakaryoblastic Leukemia (MKL) 1 binding to the serum response factor Serum Response Factor (SRF) is regulated by actin kinetics and induces differentiation from progenitor cells to adipocytes. Currently, I am investigating whether tumor growth can be suppressed by transdifferentiation of cancer stem cells derived from alteration of the dynamics in the actin cytoskeleton. In this study, the possibility of application as a tumor suppression model was studied in an in vivo experiment using medaka. First, I tried to modify serum response factor (srf) gene of medaka using genomic editing technique CRISPR/Cas9 and established srf mutant medaka line. In fish such as zebrafish and medaka, there was many gene duplication, and in zebrafish there were two kinds of srf genes. However, the medaka srf gene was single at least on currently available databases. To acquire mutation in the DNA binding region of the srf gene, target regions of CRISPR/Cas9 technology were set in the vicinity of the DNA binding region of the srf gene. As a result, the four srf mutant lines were obtained. srf: del411 (having deletion of 411 bp), srf: del6 (having deletion of 6 bp), srf: ad2ch4 (4 bp substitution and 2 bp addition), srf: del9 (with a deletion of 9 bp). srf: del411 and srf: ad2ch4 homozygous individuals cannot hatch. srf: del6, srf: del9 were only 2 and 3 amino acid deletions, and no significant difference was observed between homozygous individuals and wild type in growth rate, survival time and body length. For these four strains, observation of viability and phenotype, immunohistological staining and western blot analysis will be carried out. Changes in transcription and product amount of srf downstream factor will be analyzed. Tumor cells are transplanted into srf mutants and wild type individuals, then compared the growth rates of tumor masses to determine the presence or absence of tumor suppression.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2018000005-20180018

publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	医学部附属先端医科学研究所	職名	助教	補助額	300 (A) 千円
	氏名	松崎 ゆり子	氏名 (英語)	Yuriko Matsuzaki		
研究課題 (日本語)						
ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 で作出したメダカ SRF 変異系統による腫瘍抑制モデルの作製						
研究課題 (英訳)						
Establishment of in vivo tumor suppression model using medaka srf mutant produced by genome editing technique CRISPR/Cas9						
1. 研究成果実績の概要						
<p>所属研究部門では、血清応答因子 Serum Response Factor(SRF)に結合する Megakaryoblastic Leukemia (MKL) 1 の細胞内局在が、アクチン動態によって制御され、前駆細胞から脂肪細胞への分化を誘導することを見出した。現在は、アクチン細胞骨格の動態を変化させることで、がん幹細胞を分化転換し、腫瘍増殖を抑制できないだろうかということについて研究している。本研究では、メダカを用いた in vivo の実験で腫瘍抑制モデルとしての応用可能性を検討した。まず始めに ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いてメダカ血清応答因子 Serum Response Factor(SRF)遺伝子の改変を試み SRF 変異メダカ系統を樹立した。ゼブラフィッシュやメダカなどの魚類では、多くの遺伝子で重複が見られ、ゼブラフィッシュでは 2 種の SRF 遺伝子が存在した。しかしメダカ SRF 遺伝子は、少なくとも現在利用できるデータベース上では単一であった。CRISPR/Cas9 技術により SRF 遺伝子の DNA 結合領域付近で変異を生じるように標的配列を設定し、約 500 塩基の欠失を持つ系統、もしくは、変異によるフレームシフトで DNA 結合領域およびその下流を持たない系統の樹立を目指した。その結果、srf:del411(411 bp の欠失を持つ)、srf:del6(6 bp の欠失を持つ)、srf:ad2ch4(4 bp の置換および 2 bp の付加によりフレームシフトし DNA 結合領域を持たない)、srf:del9(9 bp の欠失を持つ)、の 4 種の SRF 変異系統を樹立することができた。srf:del411、srf:ad2ch4 変異をホモ接合で保持する個体は孵化することができない。srf:del6、srf:del9 は 2 および 3 アミノ酸欠失のみであり、ホモ接合個体は野生型と生育速度、生存期間、体長などに大きな差はみられなかった。これら 4 系統について、今後、生存能、表現型を観察すると共に免疫組織染色、ウェスタンブロット解析を行う。各組織から抽出した cDNA、タンパクで SRF 下流因子の転写および産物量の変化を解析する。さらに SRF 変異個体と野生型個体に腫瘍細胞の移植を行い腫瘍塊の増殖速度を比較し、腫瘍抑制の有無を明らかにする。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>In my research division, it was found that the subcellular localization of Megakaryoblastic Leukemia (MKL) 1 binding to the serum response factor Serum Response Factor (SRF) is regulated by actin kinetics and induces differentiation from progenitor cells to adipocytes. Currently, I am investigating whether tumor growth can be suppressed by transdifferentiation of cancer stem cells derived from alteration of the dynamics in the actin cytoskeleton. In this study, the possibility of application as a tumor suppression model was studied in an in vivo experiment using medaka. First, I tried to modify serum response factor (srf) gene of medaka using genomic editing technique CRISPR/Cas9 and established srf mutant medaka line. In fish such as zebrafish and medaka, there was many gene duplication, and in zebrafish there were two kinds of srf genes. However, the medaka srf gene was single at least on currently available databases. To acquire mutation in the DNA binding region of the srf gene, target regions of CRISPR/Cas9 technology were set in the vicinity of the DNA binding region of the srf gene. As a result, the four srf mutant lines were obtained. srf: del411 (having deletion of 411 bp), srf: del6 (having deletion of 6 bp), srf: ad2ch4 (4 bp substitution and 2 bp addition), srf: del9 (with a deletion of 9 bp). srf: del411 and srf: ad2ch4 homozygous individuals cannot hatch. srf: del6, srf: del9 were only 2 and 3 amino acid deletions, and no significant difference was observed between homozygous individuals and wild type in growth rate, survival time and body length. For these four strains, observation of viability and phenotype, immunohistological staining and western blot analysis will be carried out. Changes in transcription and product amount of srf downstream factor will be analyzed. Tumor cells are transplanted into srf mutants and wild type individuals, then compared the growth rates of tumor masses to determine the presence or absence of tumor suppression.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			