

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14359

研究課題名(和文)ゲノム編集によるバイシストロニックCreドライバーマウスの開発

研究課題名(英文)Development of bicistronic cre driver mice using CRISPR/Cas9

研究代表者

杉山 文博(SUGIYAMA, Fumihiro)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90226481

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)：本プロジェクトはCRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集方法を利用し、興味ある内在性遺伝子を傷つけることなくCre遺伝子を同時に発現させるバイシストロニックCre発現システムによりCreドライバーマウスの開発を短期間で行うことを試みた。Ins1遺伝子終止配列直上に2A-Cre遺伝子をノックインしたマウスをCRISPR/Cas9とドナーDNAの前核期卵導入にて作製した。作製されたマウスは膵島細胞でのみCre-loxP遺伝子組換えする能力があること、耐糖能異常は示さないことが確認され、本方法がCreドライバーマウス作製に有効な方法であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this project, we generated novel cre driver mice for gene manipulation in pancreatic beta cells. Using the CRISPR/Cas9 system, stop codon sequences of Ins1 were targeted for insertion of cre, including 2A sequences. A founder of C57BL/6J-Ins1(em1 (cre) Utr) strain was produced from an oocyte injected with pX330 containing the sequences encoding gRNA and Cas9 and a DNA donor plasmid carrying 2A-cre. (R26GRR x C57BL/6J-Ins1(em1 (cre) Utr)) F1 mice were histologically characterized for cre-loxP recombination in the embryonic and adult stages; cre-loxP recombination was observed in all pancreatic islets examined in which almost all insulin-positive cells showed tdsRed fluorescence, suggesting beta cell-specific recombination. Taken together, these observations indicated that C57BL/6J-Ins1(em1 (cre) Utr) is useful for studies of glucose metabolism and the strategy of bicistronic cre knock-in using the CRISPR/Cas9 system could be useful for production of cre driver mice.

研究分野：実験動物学

キーワード：Bicistronic CRISPR/Cas9 Mice

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は膵細胞でのみ遺伝子組換えを引き起こす cre ドライバーマウスを作製するため、Bacterial Artificial Chromosome (BAC) にクローニングされた 100 kb を超えるインスリン 1 (Ins1) 遺伝子のプロモーター直下に Cre 遺伝子を挿入させた BAC・DNA をマウスに導入することにより、内在性 Ins1 遺伝子を傷つけることなく、膵細胞でのみ cre 遺伝子が発現する Cre ドライバーマウスの開発に成功した。しかしながら、ファウンダーの多くは非常に長い DNA 断片が挿入されているのにも関わらずゲノムの位置効果を受けた他、Ins1 と同様の発現を示したファウンダーにおいても外来遺伝子の導入形態を解析することが困難である他、外来性の cre 遺伝子挿入による内在性遺伝子欠失等の悪影響を与える可能性が懸念されている。

### 2. 研究の目的

cre-loxP システムを用いた条件付き遺伝子欠損 (conditional Knockout, cKO) マウスは生命現象や病気の分子機構を個体レベルで解明するため必要なツールであり、その成功は cre ドライバーマウスの cre 遺伝子プロモーターの正確な転写能力に大きく依存する。内在性遺伝子発現を模倣する最も信頼性のある正確な cre 遺伝子発現制御方法はその内在性遺伝子プロモーター直下への cre 遺伝子ノックインであるが、そのアレルからの内在性遺伝子発現を欠損させることとなる。そこで申請者はゲノム編集方法を利用し、興味ある内在性遺伝子を傷つけることなく cre 遺伝子を同時に発現させるバイシストロニック cre 発現システムにより新たな cre ドライバーマウス開発を短期間で実施させることを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 システムとバイシストロニック遺伝子発現システムを融合し、内在性遺伝子を傷つけることなく Cre 遺伝子を発現させる新規なバイシストロニック Cre ドライバーマウスを短期間に作製することを目的とする。

CRISPR/Cas9 により Ins1 バイシストロニック cre ドライバーマウスを作製

CRISPR/Cas9 により gdf9 バイシストロニック cre ドライバーマウスを作製

R26GRR レポーターマウス用いた組織及び時期特異的 cre-loxP 遺伝子組換えの組織学的解析を行い、新規バイシストロニック cre ドライバーマウス開発の評価を行う。

### 4. 研究成果

CRISPR/Cas9 により Ins1 バイシストロニック cre ドライバーマウスを作製。

マウス受精卵内で Ins1 遺伝子終止コドン上流に 2A 配列を有する cre 遺伝子を挿

入するため、図 1 に示した DNA donor template を作製し、同部位を標的とした gRNA 及び Cas9 を発現するプラスミドをマウス受精卵前核に共導入した。

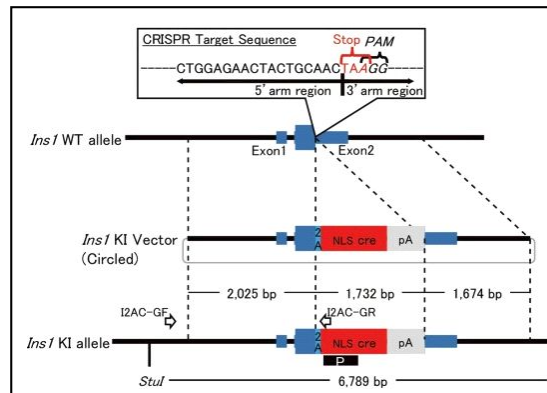


図 1. Ins1/2A-cre DNA donor template とノックイン後の Ins1 遺伝子座

結果、複数の CRISPR ノックインマウス ( $Ins1^{em1(cre)}$ ) が作製された。

次にファウンダーマウスにおけるノックイン遺伝子の次世代への移行を交配実験により確認した後、ノックイン遺伝子の機能を評価するため、cre レポーターマウス R26GRR マウスと  $Ins1^{em1(cre)}$  マウスとの F1 個体 ( $R26GRR/Ins1^{em1(cre)}$ ) の作出を行った。R26GRR マウスは cre-loxP 遺伝子組換え以前は緑色蛍光を示し、cre-loxP 遺伝子組換え後は赤色蛍光を示すマウスである。図 2 は胎令 16.5 日の R26GRR/ $Ins1^{em1(cre)}$  F1 マウス胎児である。全身が緑色蛍光を示し (図 2 A)、膵臓の部位においてのみ赤色の蛍光 (図 2 B) が観察された。また抗インスリン抗体で免疫蛍光染色した結果 (図 2 C)、インスリンのシグナルは赤色蛍光と共同在した。これらのことから膵臓以外での異所性 cre-loxP 遺伝子組換えがないことが確認された。

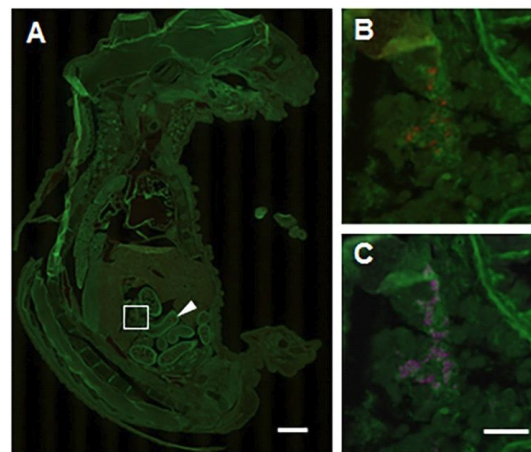


図 2. 胎令 16.5 日の R26GRR/ $Ins1^{em1(cre)}$  F1 マウス胎児

次に成体の膵臓における cre-loxP 遺伝子組換えを検討するため、R26GRR/ $Ins1^{em1(cre)}$  F1 マウスの膵臓全体における蛍光シグナル

の観察を行った。cre-loxP 遺伝子組換えを意味する赤色蛍光 (図 3 A) と観察された全てのインスリン陽性の膵島 (図 3 B) で共局在していることが明らかとなった。

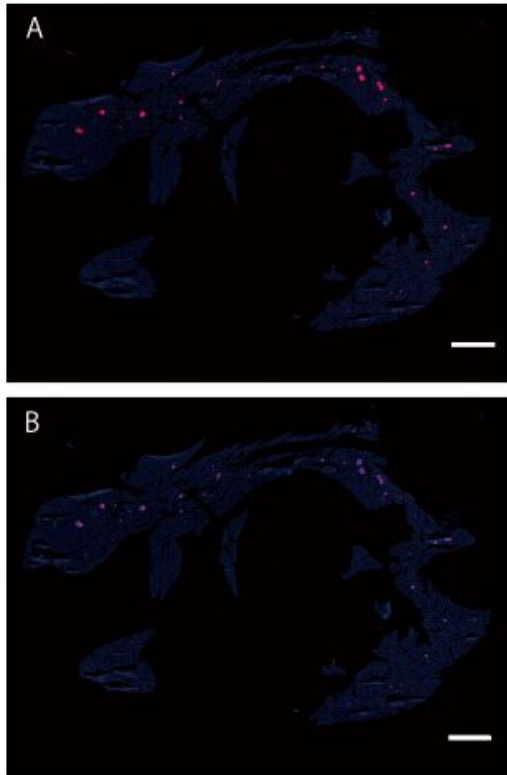


図 3 . R26GRR/  $Ins1^{em1 (cre)}$  F1 マウス膵臓における cre-loxP 遺伝子組換えとインスリンシグナル

更に膵島における cre-loxP 遺伝子組換えを検討するため、R26GRR/  $Ins1^{em1 (cre)}$  F1 マウスの膵臓の凍結切片における蛍光シグナルの観察を行った。結果、F1 マウスの膵島に

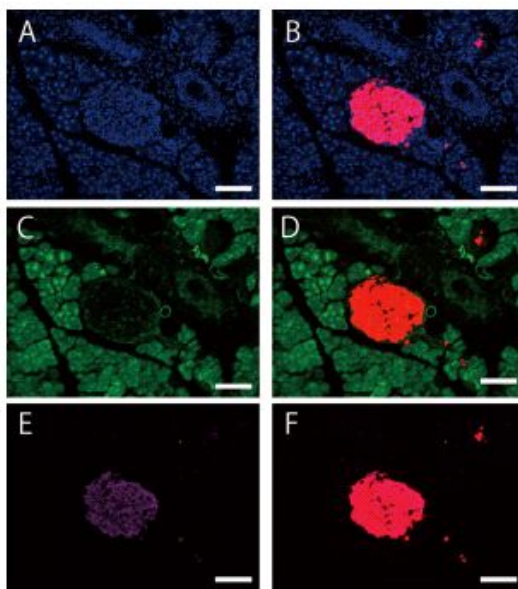


図 4 . R26GRR/  $Ins1^{em1 (cre)}$  F1 マウス膵島における cre-loxP 遺伝子組換えとインスリンシグナル

において赤色蛍光のシグナルが観察され (図 4 B,D,F) インスリン抗体を用いた免疫蛍光染色 (図 4 E) シグナルと共局在が観察された。このことから膵島の細胞において cre-loxP 遺伝子組換えが生じていることが明らかとなった。

一方、膵島の遠位部の細胞は赤色蛍光やインスリンシグナルは観察されず、緑色蛍光を呈していることより、遠位の細胞では cre-loxP 遺伝子組換えが生じていないことが明らかとなった (図 4 C,D)。

そこで、グルカゴン抗体を用いた免疫蛍光染色により膵島をさらに詳しく解析した結果、赤色蛍光を示さない膵島の遠位細胞はグルカゴンシグナル陽性の膵島細胞であることが明らかとなった (図 5 B,D,F)。

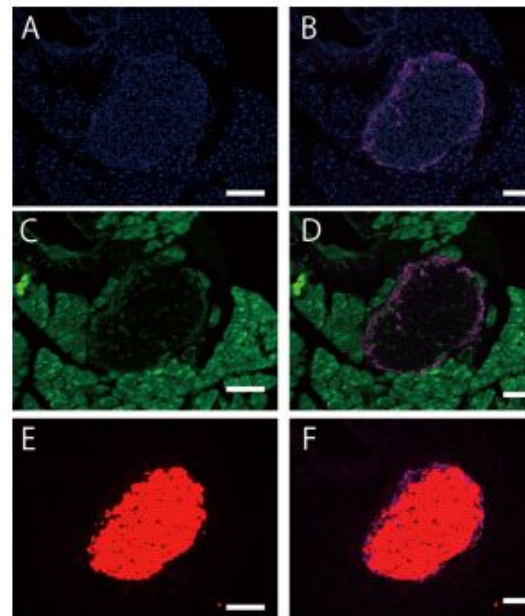


図 5 . R26GRR/  $Ins1^{em1 (cre)}$  F1 マウス膵島における cre-loxP 遺伝子組換えとグルカゴンシグナル

これらのことより、 $Ins1^{em1 (cre)}$  マウスにおける cre 遺伝子は膵島の細胞においてのみ cre-loxP 遺伝子組換えを引き起す能力を有していることが証明された。

現在、卵母細胞特異的に遺伝子発現する Gdf9 についても、CRISPR/Cas9 を用いたバイシストロニック cre ドライバーマウス作製が終了し、卵母細胞特異的な cre-loxP 遺伝子組換えの機能解析結果が得られている。

結語として、本プロジェクトの成果は、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により興味ある内在性遺伝子を傷つけることなく cre 遺伝子をバイシストロニックに発現させることが可能な第三世代の cre ドライバーマウスの開発に成功したことである。今後、この新規作製方法を用いた有用な cre ドライバーマウスリソースの充実を介して、遺伝子機能や病態機構の解明がさらに発展していくことを大きく期待する。

## 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 1件)

Hasegawa Y, Hoshino Y, Abdelaziz E, Ibrahim, Kato K, Daitoku Y, Tanimoto Y, Ikeda Y, Oishi H, Takahashi S, Yoshiki A, Yagami K, Iseki H, Mizuno S, Sugiyama F. Generation of CRISPR/Cas9-mediated bicistronic knock-in Ins1-cre driver mice. *Exp Anim*. 2016. 65:319-27.  
doi: 10.1538/expanim.16-0016

[学会発表](計 2件)

長谷川賀一、星野貴一、Abdelaziz E. Ibrahim、加藤花奈子、大徳陽子、谷本陽子、池田祥久、大石久史、高橋智、吉木淳、八神健一、伊関大敬、水野聖哉、杉山文博 CRISPR/Cas9 システムを用いた膵細胞特異的に cre 酵素発現するバイシストロニック cre ドライバーマウスの開発  
第 63 回日本実験動物学会総会、平成 28 年 5 月 18-20 日、ミューザ川崎シンホニーホール(神奈川県・川崎市)

水野聖哉、長谷川賀一、加藤花奈子、飯島沙織、大徳陽子、谷本陽子、Abdelaziz E. Ibrahim、高橋智、吉木淳、八神健一、杉山文博 CRISPR/Cas9 を用いた Gdf9-BiCre ノックインマウスの開発  
第 64 回日本実験動物学会総会、平成 29 年 5 月 25-27 日、ビッグパレットふくしま(福島県・郡山市)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 文博 (SUGIYAMA Fumihiro)

筑波大学 医学医療系・教授

研究者番号：90226481

(2)研究分担者

水野 聖哉 (MIZUNO Seiya)

筑波大学 医学医療系・助教

研究者番号：10633141