

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640050

研究課題名(和文)複数遺伝子変異マウス作製のためのXYi法の開発

研究課題名(英文)Establishment of XYi-method for generation of multiple genes knock-in mice

研究代表者

八神 健一 (YAGAMI, Ken-ichi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40166476

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)：Y染色体に自殺誘導遺伝子を組み込んだES細胞を樹立し、同一複数変異アレルを有する雌雄のキメラマウス作製を実施した。

自殺遺伝子をY染色体に組み込むために、薬剤誘導型自殺遺伝子であるiCaspase3EとGFP遺伝子をつなげたレポーターユニットをノックインするようなターゲティングベクターを構築した。ノックイン効率を上昇させるため、5'側と3'側それぞれにCRISPR-nickase targetを設定した。上記のノックインベクターと2種のCRISPR-nickase発現ベクターをES細胞にエレクトロポレーションで導入した結果、1クローンでノックインアレルが確認された。

研究成果の概要(英文)：For producing multiple genes knock-in mouse, we tried to establish novel ES cell line and mouse strain carrying suicide and reporter genes on their Y chromosome.

First, we construct gene targeting vector including drug inducible suicide cassette (SRA-promoter and iCaspase3E gene) and fluorescence reporter cassette (EF1-promoter and EGFP gene). Because knock-in into Y chromosome happen with very low frequency, we designed two CRISPR-nickase site in each 5' and 3' homology arm region. These two CRISPR target DNA fragments were inserted in the px335 which carried U6-gRNA cassette and CBh-Cas9 D10A cassette. Then, these 3 vectors (one targeting vector and two CRISPR expression vectors) were electroporated into C57BL/6J mouse ES cells. We obtained one ES clone in which drug inducible suicide and reporter gene were expressed. The KI allele was confirmed by not only PCR but also Southern blotting.

研究分野：実験動物学

キーワード：マウス 複数遺伝子変異 XYi法

1. 研究開始当初の背景

複数遺伝子変異マウスは、遺伝子間相互作用等を *in vivo* で評価することができるため、ヒト疾患の発症メカニズムの解明や生命現象の理解に不可欠なバイオリソースである。しかし、その作製には長期の時間と労力、交配のための多数のマウスを必要とするなど、効率性や確実性に課題が多い。

近年に開発された人工ヌクレアーゼを用いた遺伝子改変技術は、任意の内在性遺伝子を高確率で変異させることが可能であり、特に、CRISPR/Cas9 システムはその構築が容易であり、マウス ES 細胞について複数の遺伝子を同時に改変できることから注目されている。これら新規技術の応用により、バイオリソース作製の効率や確実性を高めることは、ライフサイエンス系の先端研究分野に広く波及する重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、バイオリソースとして有用な複数遺伝子変異マウスを効率よく作製するため、Y 染色体に自殺遺伝子発現カセットを組み込んだ XYi 型 ES 細胞を樹立し、この ES 細胞を CRIPAR/Cas9 システムにより複数の遺伝子変異をノックインさせてマウスを作製する。これにより、効率的な複数遺伝子変異マウスの作製法として確立する。

3. 研究の方法

(1) flox-EF1a-iCaspase3-IRES-GFP ターゲティングベクターの構築

Y 染色体上に薬剤耐性誘導型自殺遺伝子 iCaspase3 と蛍光レポーター遺伝子 GFP を導入するためのターゲティングベクターを作製した。導入遺伝子は、Cre-loxP システムを利用し任意の時期に除去できるようにした。

XYi 法の計画で懸念事項のひとつはサイレンシングによる導入遺伝子の発現抑制であったため、サイレンシングを受けないように ES 細胞で発現する Eif2s3y 遺伝子の 3' 側近傍に flox-EF1a-iCaspase 3-IRES-GFP を導入することとした。

(2) XYi 型 ES 細胞の樹立

ターゲティングベクターを C57BL/6J 由来の ES 細胞に導入し、XYi 型 ES 細胞を樹立した。上記ベクター 10 μ g と 2 種の px335 ベクター各 5 μ g を 10 の 7 乗個の ES 細胞にエレクトロポレーションで導入した。導入後の ES 細胞クローンについて、PCR およびサザンブロッティングによりノックインアレルの存在を確認した。

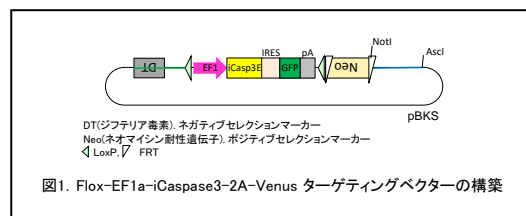
(3) GFP の発現と薬剤誘導型自殺遺伝子活性の確認

樹立した XYi 型 ES 細胞の GFP 発現状況を蛍光顕微鏡により観察した。また、薬剤誘導型自殺遺伝子の活性を見るため、FK506 (B/B homodimerizer) を添加し、細胞の Viability

を確認した。

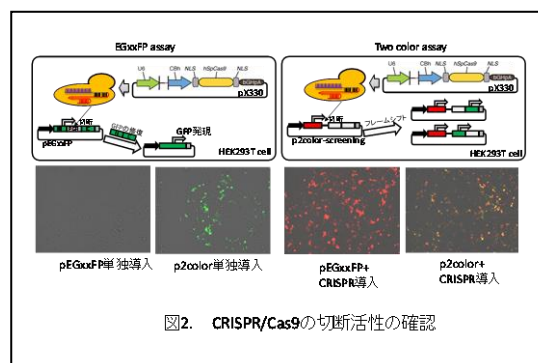
4. 研究成果

(1) はじめに、自殺遺伝子を Y 染色体に組み込むために、ターゲティングベクターを構築した。ターゲティングベクターは EF1 プロモーターの下流に薬剤誘導型自殺遺伝子である iCaspase3E をつなげ、その下流に IRES と GFP 遺伝子をつなげたレポーターユニットをノックインするようなデザインとした (図 1)。



また、ノックイン部位は Y 染色体の YqA1 領域中の非遺伝子領域部位を選んだ。Y 染色体へのノックインは非常に効率が低いことが知られており一般的な遺伝子ターゲティングではノックインができない可能性が考えられた。そこで、アーム部位に CRISPR の Cas9 D10A (nickase) で切れ目をいれることでノックイン効率を上昇できないかと考え、5' 側と 3' 側にそれぞれ CRISPR target を設定し、その配列を組込んだ px335 ベクターを構築した。

CRISPR/Cas9 の切断活性の確認には、EGxxF assay システムと Two color assay システムを用いた。図 2 に示す通り、どちらの assay システムにおいても強い切断活性を示した CRISPR/Cas9 を遺伝子ターゲティングに使用した。



(2) 上記のノックインベクター (10 マイクログラム) と 2 種の px335 ベクター (各 5 マイクログラム) を 10 の 7 乗個の C57BL/6J マウス由来 ES 細胞にエレクトロポレーションで導入した。

その結果、11 個のコロニーが得られた。得られた 11 クローンのうち 1 クローンでノッ

クインアレルの存在が PCR 法およびサザンブロットリングにより確認できた (図 3)。

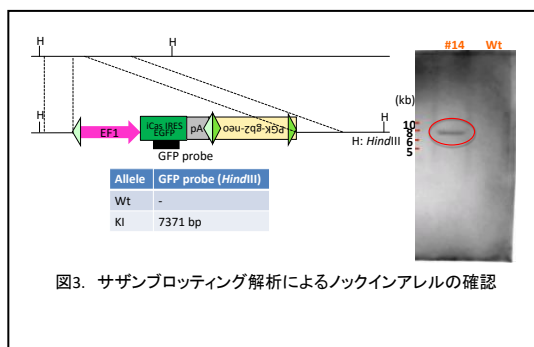


図3. サザンブロットリング解析によるノックインアレルの確認

また、このクローンを蛍光顕微鏡下で観察し、GFP の発現による特異的蛍光を確認した (写真 1)。

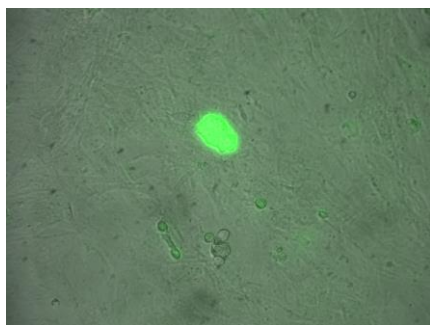


写真 1. 樹立した XYi 型 ES 細胞におけるレポーター遺伝子 GFP の発現

さらに、樹立細胞に対して FK506 (B/B homodimerizer) を添加することで薬剤誘導型自殺遺伝子による細胞死を誘導したところ、FK506 の濃度依存的に細胞死が誘導され、導入遺伝子の発現および活性が確認された (図 4)。

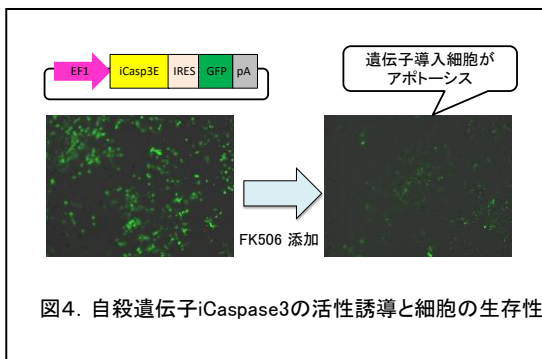


図4. 自殺遺伝子iCaspase3の活性誘導と細胞の生存性

以上の結果より、複数遺伝子を変異させた XYi 型マウス ES 細胞が計画通りに樹立できたことが確認された。現在、本 ES 細胞を用いてキメラマウスを作製中であり、キメラ形成

能を確認した後、研究成果を論文発表の予定である。キメラ形成能が、通常のマウス ES 細胞と同程度であれば、本研究により樹立された C57BL/6J 由来 XYi 型 ES 細胞およびその作製方法は、複数遺伝子のノックインマウス作製に有用なツールとして、バイオメディカル研究に広く利用されることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

① Seiya Mizuno, Kohei Takami, Yoko Daitoku, Yoko Tanimoto, Tra Thi Huong Dinh, Saori Mizuno-Iijima, Yoshikazu Hasegawa, Satoru Takahashi, Fumihiko Sugiyama, Ken-ichi Yagami. Peri-implantation lethality in mice carrying megabase-scale deletion on 5q3.3 is caused by Exoc1 null mutation. *Scientific Reports*. 10.1038/srep13632, 2015. (査読あり)

〔学会発表〕 (計 5 件)

1) 水野聖哉、高橋 智、杉山文博、八神健一. CRISPR/Cas を用いたマウスゲノム編集の実際. 第 121 回日本解剖学会総会全国学術集会. 2016 年 3 月 28 日~30 日. ビッグパレットふくしま. 福島県 (福島市)

2) Seiya Mizuno, Kanako Kato, Saori Iijima, Yuko Hamada, Tra Dinh Thi Huong, Yoshikazu Hoshino, Yoko Tanimoto, Satoru Takahashi, Fumihiko Sugiyama, Ken-ichi Yagami. Applied Genome Editing with CRISPR/Cas9 Plasmid in Mice. トランスポゾン転移とゲノム編集技術に関する国際会議 2015. 2015 年 11 月 17 日~2015 年 11 月 20 日. 奈良県新公会堂、奈良県 (奈良市)

3) 水野聖哉・加藤花名子・飯島沙織・Dinh Thi Huong Tra・谷本陽子・大徳陽子・石田みゆき・高橋智・杉山文博・八神健一. Applied Genome Editing with CRISPR/Cas9 Plasmid in Mice. The 28th International Mammalian Genome Conference. 2014 年 10 月 26 日~29 日. Bar Harbor Club. Bar Harbor, ME (USA)

4) 水野聖哉. Generation of gene-modified mice with CRISPR/Cas9 system. The 11th Annual Conference of Chinese Association for Laboratory Animal Science (CALAS). 2014 年 6 月 25 日~27 日. Chongqing, Sichuan province (中国)

5) 水野聖哉・加藤花名子・飯島沙織・Dinh Thi Huong Tra・谷本陽子・大徳陽子・石田みゆき・依馬正次・伊川正人・高橋智・杉山文博・

八神健一. CRISPR/Cas9 プラスミドを介した
マウスゲノム編集の応用. 第 61 回日本実験
動物学会総会. 2014 年 5 月 15 日～17 日. 札
幌コンベンションセンター. 北海道 (札幌市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/lab-animal/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八神 健一 (YAGAMI, Ken-ichi)

(筑波大学・医学医療系・教授)

研究者番号 : 40166476

(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