

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19311

研究課題名（和文）全ての動物モデルにCre-loxpシステムを適用可能にする新技術の開発

研究課題名（英文）Developing new Cre-loxp system for all organism

研究代表者

恒川 雄二（Tsunekawa, Yuji）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：80733352

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は研究代表者の開発した体細胞に対するゲノム編集技術を改良し、今までは行うことができなかった、げっ歯類以外の動物モデルの発生期および成獣個体組織において任意の遺伝子の発現制御下にCreを導入する技術確立することを目的として進められた。2年間の研究の結果、子宮内電気穿孔法が適用できるフェレットなどの動物種においては発生期の個体においてCreを導入する技術確立することができた。成獣についてはAAVベクターを検討したが、新たなリークが見られ、改良が求められることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2年間の研究の結果、プラスミドを用いたシステムではマウス、フェレットなどの発生期個体においてCreを導入する技術確立することができた。この成果を持って特許の申請も行なっている。この新しいシステムを用いることにより、今までは1年以上の時間がかかっていたコンディショナルTgマウスなどが受精卵ノックインなどを用いて簡便に作れる可能性を示しており、産業的に価値があると思われる。

研究成果の概要（英文）：Aim of this project is to develop a new technology to apply Cre-loxp systems for all organisms. Newly developed de novo genome editing technology by applicant has been modified for this project. As a result of two years of research, Cre-loxp systems now can be applicable to animal species such as ferret (animals which we can apply in utero electroporation) during embryonic stages. We father tried to apply Cre-loxp systems to adult animals, however, examined AAV vectors for adult animals caused leak of cre, that was not seen in in utero electroporation system. Further studied is required to fix this newly coming up problem.

研究分野：神経発生学

キーワード：de novo Cre knock-in

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

(1) . 研究開始当初の背景

生命科学、特に発生学の研究において、特定の細胞集団のみで遺伝子を欠損させるコンディショナルノックアウト、任意の遺伝子発現に基づく細胞系譜を可視化するリニエージトレーシング、特定の細胞集団のみで外来遺伝子を発現させる機能獲得実験は必須の基幹技術である。しかしこれらはいずれも Cre 組み替え酵素が特定の遺伝子制御下で発現するトランスジェニックマウス系統を要求するため、マウス以外の動物において実施することが困難であった。このため Cre マウスの登場した 1990 年代以降、ほとんどの生命科学における課題解明がマウスに集中する状況が見られ、マウスで見出された現象が普遍的であるのか、という問いを検証する手立てはない。また、研究代表者自身の取り組むヒト型の皺のある大脳皮質の発生機構をはじめ、高度な学習能力や社会性を支える脳領域の発生、薬理学的性質がヒトにより近い霊長類モデルの臓器発生機構など、マウス以外のモデルを用いるべき課題が数多く存在する。申請者らはこのような要請を受け、あらゆる動物モデルの体細胞系列に特異的に Cre を導入することのできる汎用な手法が必要であるとの認識に至った。

(2) . 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者の開発した体細胞に対するゲノム編集技術を改良し、食肉目のフェレットを非典型的な哺乳類モデルとして、発生期および成獣個体の組織において任意の遺伝子の発現制御下に Cre を導入する技術を確立することである。最終的には上記技術を基盤にして、あらゆる動物モデルにおいて cKO、リニエージトレーシング、細胞特異的機能獲得実験を可能にする Cre-LoxP システムの適用を目指す。

(3) . 研究の方法

本研究は以下 3 つの目標を設定し、研究を進めていく。

レポーターカセットをゲノムに挿入するトランスポゾンシステムの条件検討

遺伝子導入による Cre-LoxP システムを開発する場合、CAG-floxSTOP-GFP や CAG-floxSTOP-geneX などのレポーターカセットを共導入する必要があるが、細胞質に導入されたベクターは細胞分裂と共に失われてしまう。そのため、これらのレポーターカセットをゲノムに組み込む必要がある。そこで、CRISPR/Cas9 システムと共に、ゲノムに外来遺伝子をランダムに挿入するトランスポゾンシステムを細胞に導入する。現在、マウス大脳皮質においてベクターベースのゲノム挿入に使われる PiggyBac, TolII, Sleeping beauty の三種類のトランスポゾンそれぞれ電気穿孔法で細胞に導入する予備実験を行っている。それぞれのトランスポゾンのゲノムへの挿入率を検討し、一番挿入率の良いものを選別する。

LsCre ノックインによるリニエージトレーシングと細胞特異的機能獲得実験技術の開発

特定の遺伝子が発現した細胞において蛍光タンパク質や任意の遺伝子を恒常的に発現させるシステムを開発する。まず、上記で選別したトランスポゾンにより CAG-floxSTOP-geneX をゲノムにランダムに挿入する。同時に CRISPR/Cas9 システムを細胞に導入し、標的のプロモーター下に LsCre をノックインする。これらの組み替えを発生期あるいは分化した細胞で行えば、遺伝子が発現した細胞系譜の可視化 (リニエージトレーシング) や細胞特異的な機能獲得実験が可能になる。

Split LsCre ノックインによるコンディショナルノックアウト法の開発

遺伝子が両染色体でノックアウトされた細胞をラベルするため、Cre を N 末端側 (Cre-N) と C 末端側 (Cre-C) に分けてそれぞれの染色体にノックインする。それぞれの染色体に Cre-N と Cre-C がノックインされた場合のみ、細胞内で発現した Cre-N と Cre-C が結合し、活性のある Cre が出来る。まず、LsCre 作成過程で明らかになったリークに対する知見を基盤に、Cre-N と Cre-C の活性を保ったままリークしないよう改変した LsCre-N と LsCre-C を開発する。これら、LsCre-N と LsCre-C をノックアウトしたい遺伝子のコーディング領域前半側にノックインし、同時にトランスポゾンにより CAG-floxSTOP-EGFP をゲノムにランダムに挿入する。

これらの組み替えを発生期あるいは分化した細胞で行えば、標的遺伝子が両染色体で欠損した細胞の系譜が特異的に可視化されるコンディショナルノックアウトが可能になる。

上記、の技術モデルが実際に複数の遺伝子座において正確に働くかをまずマウス胎児、成獣の大脳皮質を用いて検討し、次に、非典型的哺乳類モデルとしてフェレットの胎児、成獣の大脳皮質で確かめる。胎児では電気穿孔法を用いて研究代表者が実験を行い、成獣では AAV を用いて分担研究者が実験を行う。

(4) . 研究成果

以下申請時に設定した3つの目標に対しての研究成果を報告する。

レポーターカセットをゲノムに挿入するトランスポゾンシステムの条件検討

助成初年度にマウス大脳皮質において PiggyBac, TolII, Sleeping beauty 三種類のトランスポゾンベクターの検討を行ったところ、PiggyBac が最も効率よくゲノムにプラスミドを挿入することがわかった(最大導入細胞の90%)。以後の研究には、PiggyBac を用いていく。

LsCre ノックインによるリニエージトレーシングと細胞特異的機能獲得実験技術の開発

胎児期のマウス、フェレット大脳皮質において子宮内電気穿孔法を用いて神経幹細胞に特異的に発現する Pax6 遺伝子、分化した細胞特異的に発現する Ascl1 遺伝子の下流に Cre をリークなく挿入し、子孫細胞を可視化することに成功した。他にもいくつかの遺伝子について検討したが、遺伝子座によってはリークも確認された。リークの有無がターゲットする遺伝子座により変わるのはベクターに用いているホモロジーアームの差によるものと推測される。今後これらアームの違いに左右されない LsCre を検討していく。

Split LsCre ノックインによるコンディショナルノックアウト法の開発

LsCre ノックインに成功した Pax6 遺伝子座に、胎児期のマウス大脳皮質において子宮内電気穿孔法を用いてスプリットした LsCre(LsCre-N,LsCre-C)をノックインした。EGFP が観察された細胞(LsCre-N,LsCre-C が両遺伝子座にそれぞれノックインされ、Pax6 がノックアウトしたと思われる細胞)において Pax6 の抗体染色を行ったところ、Pax6 が完全にはノックアウトされていなかったことが確認された。これはノックインされた LsCre ドナーベクターの用いたヒト免疫グロブリンスプライシングアクセプターでは genetrapped しきれなかったことが示唆された。今後は他のスプライシングアクセプターを検証していく。

上記3つの開発目標に加え成獣に対しての AAV ウイルスベクターを用いた LsCre ノックインも検討した。いくつかの遺伝子座において LsCre のノックインを試みたが、プラスミドでは観察されなかった AAV ベクター特異的な多量のリークが観察された。今後はなぜ AAV ベクター特異的にリークが起こるかの考察と改良を加えていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ポリヌクレオチドおよびその利用	発明者 恒川雄二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019 - 199153	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮道 和成 (miyamichi kazunari) (30612577)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー (82401)	