

平成 30 年 3 月 30 日

I. 申請項目

共同利用 A-4. ゲノム編集マウス作製(担当:竹本龍也)

II. 研究題目

腎臓特異的 ATF6 α コンディショナルノックアウトマウスの作製とその解析

III. 申請者

1. 氏名 稲城 玲子
2. 所属 東京大学 大学院医学系研究科 慢性腎臓病(CKD)病態生理学
3. 職位 講座主任(特任准教授)
- 4.

IV. 共同研究希望分野

B-8. 生体機能学分野(担当:親泊政一 oyadomar@genome.tokushima-u.ac.jp)

V. 申請内容

目的

腎臓細胞の UPR 経路と糖・脂質代謝の関連性の解明に焦点を絞り、UPR 分子の中でも特に代謝経路との関連性が示唆される ATF6 α のノックアウトマウスを用いた in vivo 解析のための研究基盤整備を行う。それらに基づいて、ATF6 の腎臓細胞機能における病態生理学的役割を分子レベルで解明することを目指す。

方法

本申請では、腎臓細胞特異的 ATF6 α ノックアウトマウス作出のために、ATF6 α flox/flox マウスの作製を行う。次にそれらマウスを申請者が系統維持する腎臓特異的 Cre マウス(尿細管特異的 Cre マウス、糸球体ポドサイト特異的 Cre マウス)と交配して、腎臓細胞特異的 ATF6 α ノックアウトマウスを作出する。

成果

ATF6 α flox/flox マウスの作製のための遺伝子改変の戦略を図1の様に設計し、2017年6月に、loxP を一つ挿入できた ATF6a マウス由来の受精卵に二つ目の loxP を int9 への挿入を CRISPR/Cas9 法で竹本教授が試みた。その結果、7匹仔が得られ、2017年8月~9月にタイピングとシーケンスを実施したが、目的の仔マウスは得られなかった。そこで、2017年9月、効率的な gRNA 選択のため、新たに設計した gRNA でゲノム編集を試み、胎盤胞期でタイピングとシーケンスを実施して使用 gRNA を確定した。2017年10月には、loxP を一つ挿入できた ATF6a マウス

由来の受精卵に二つ目の loxP を int9 への挿入を CRISPR/Cas9 法で竹本教授が試みた。その結果、6 匹仔が得られ、2017 年 12 月から 2018 年 1 月にタイピング及びシーケンスを実施したが、int9 loxP の挿入が認められたのは 4 匹。そのうち int7 loxP を持つのは 2 匹のみのため 2018 年 3 月現在、同一アレルにあるかどうか確認を行っている。以上のような状態で徳島大学での遺伝子改変マウスの作製が遅れているために、申請者が計画していた機能解析は実施できていない。しかしながら、遺伝子改変マウスの作製については、継続して行う予定である。

また東大では、ATF6 欠損(全身)マウスの腎臓の解析結果から、尿細管における脂質代謝に ARF6-PPAR α 経路が重要であることが見いだされ(論文投稿中)、今後、本腎臓細胞特異的 ATF6 α ノックアウトマウスを用いた更なる解析が望まれる。

図1.

ATF6 α floxed allele

現行のATF6 α KOマウスに準じた作製法で、exon 8及びexon 9をloxPで挟むストラテジーを選択。具体的に、Cre発現により、exon 8, 9が欠失、10以降にコードされる配列にフレームシフトが起こるという方法でノックアウト作出を実施する

NM_001081304.1, mRNA		
exon 1	: 21217 ...	21338
exon 2	: 33799 ...	33875
exon 3	: 35996 ...	36083
exon 4	: 39771 ...	39871
exon 5	: 47176 ...	47302
exon 6	: 48104 ...	48307
exon 7	: 53948 ...	54168
exon 8	: 69556 ...	69741
exon 9	: 73474 ...	73565
exon 10	: 89243 ...	89374
exon 11	: 94218 ...	94331
exon 12	: 94932 ...	95031
exon 13	: 100313 ...	100380
exon 14	: 101528 ...	101642
exon 15	: 141798 ...	141882
exon 16	: 178901 ...	184531

ATF6 α conventional total KO strategy

