

研究題目 CRISPR-activation ノックインマウスの作出

研究組織

研究代表者：太口敦博（マックスプランク分子遺伝学研究所）

共同研究者：高岡勝吉（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

CRISPR-activation システムは目的遺伝子の発現制御領域に対合するガイド RNA を用意することで簡便に遺伝子発現を誘導できることから、これまでのような ORF のクローニングの手間を省略でき、大規模なスクリーニング実験の構築も容易である。本研究は3つの構成要素からなる CRISPR-activation システムのうち、ガイド RNA 以外の要素を恒常的に発現する遺伝子改変マウスを作出することにより、生体内、あるいは生体から採取した初代細胞における効率的な遺伝子過剰発現実験を可能にし、分化誘導や形質転換などの様々な研究へと応用利用しうるシステムの構築を目的とした。

[1-2]研究の方法・経過

外来遺伝子のノックイン部位として汎用されている Rosa ローカスをターゲットとし、dCas9-VP64 遺伝子を組み込んだ1つめのベクターと、MCP-p65-hsf1 遺伝子を組み込んだ2つめのベクター、さらに Rosa ローカスの切断用の Cas9 ベクターを受精卵の前核に注入することにより、2種類の外来遺伝子の両アリルへのノックインを試みた。またこの際、最終的に対象とする臓器における発現強度の違い等を考慮し、2種類の異なるプロモーター (EF1a および CAG) を有するベクターをトライした。これまでの結果、dCas9-VP64 あるいは MCP-p65-hsf1 カセットの外来遺伝子を有する産仔を複数得ることが出来たが、いずれもランダムインテグレーションであり、Rosa ローカスへのノックインではないことが判明した。また EF1a プロモーターでは産仔が得られない、あるいは圧倒的に少ない傾向が認められた。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

本共同研究により、これまで比較的短い外来遺伝子では効率的にノックインされる実績があった遺伝子座 (Rosa ローカス) においても、今回試みた数キロ大の外来遺伝子の挿入効率は悪いことが判明した。一方で、ランダムインテグレーションは一定の確立で起こっていたことから、当該外来遺伝子の遺伝子改変マウス作成においては piggy bac 等のベクターを用いて意図的にランダムインテグレーションを行う方が良い可能性が示唆された。また、一定の割合で、外来遺伝子の全域ではなく一部のみがインテグレーションされた産仔が確認されたことから、ランダムインテグレーションにおいても、慎重な遺伝子型の確認が必要であることが判明した。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本システムを用いたインビトロでの遺伝子発現誘導実験における有効性はすでに代表者が確認しており、マウス系統が樹立できれば、マウス生体内あるいは初代細胞を用いた実験へと広く応用できる。したがって、マウス樹立によりこのシステムのユーティリティを更に拡大する事ができると考えられる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

【4】 今後の課題等

今後の課題、その他等

現在引き続きランダムインテグレーション用に組み替えたベクターを用いてマウス系統の樹立を進めている。今後、得られるであろう複数の産仔から当該外来遺伝子を高いレベルで発現するものを選別し、ガイド RNA の投与により実際に目的遺伝子の発現誘導が得られるかを確認することにより、実用に耐える系統の樹立を図ることができると考えられる。