

平成28年度 徳島大学先端酵素学研究所「共同利用」成果報告書

平成29年3月27日

徳島大学先端酵素学研究所長殿

以下のように、平成28年度の徳島大学先端酵素学研究所「共同利用」の成果をご報告申し上げます。

自然科学研究機構
基礎生物学研究所/岡崎統合バイオサイエンスセンター
教授 高田慎治

・実施項目

A(A)共同利用 -4. ゲノム編集マウス作製

・共同利用実施者

高田慎治
自然科学研究機構・基礎生物学研究所/岡崎統合バイオサイエンスセンター・
教授

・共同利用対応者

竹本龍也特任助教

・成果の内容

研究目的

胸腺や副甲状腺などの器官は、その発生を辿れば咽頭嚢に由来する。咽頭嚢は発生過程で咽頭部に一過的に形成される構造であり、外胚葉性の表皮の上皮細胞層と内胚葉性の前腸の上皮細胞層が接着・癒合することにより形成される。咽頭嚢の発生はそこに由来するさまざまな器官の発生に重要であり、例えば、ディジョージ症候群と呼ばれる胸腺や副甲状腺を中心とする先天性多臓器疾患は、咽頭嚢の発生異常が原因であると考えられている。Ripply3 は咽頭嚢の発生に不可欠な遺伝子であり、その変異体マウスにおいては、胸腺や副甲状腺の不分離や血管系の異常が認められる。Ripply3 は外胚葉および内胚葉由来の両上皮層で発現することから、そのどちらか一方もしくは両方が正常な咽頭嚢形成に必要なか否かが明らかではなかった。そこで、コンディショナルノックアウト法により、外胚葉もしくは内胚葉特異的に Ripply3 の機能を阻害させたマウスを作成し、その表現型を解析する。そのために、Ripply3 遺伝子

座に loxP 配列が 2 カ所挿入されたノックインマウス (floxed Ripply3 マウス) を作成する。

研究方法及び成果

Crispr/Cas9 法を用いて目的とするノックインマウスの作成を行った。まず、Ripply3 遺伝子の第 1 exon 内の非翻訳領域に対してガイド RNA を設計し、loxP 配列を含むオリゴヌクレオチドとともにエレクトロポレーションによりマウス受精卵へ導入した。その結果、この領域に loxP 配列が挿入された個体を得ることに成功した。次に、この loxP 挿入個体と野生型マウスとの交配により得られた受精卵を用いて、Ripply3 遺伝子の第 2 intron 配列を標的として 2 回目の loxP 配列の挿入を行った。その結果、第 1 exon および第 2 intron に loxP 配列が挿入されたマウスを複数個体 (雄 2 匹、メス 匹 : 平成 29 年 3 月現在) 得ることに成功した。したがって、当初に掲げた本共同利用の目的は十分に達成できた。

今後の展望

loxP 挿入個体の成獣への成育を待つて凍結受精卵を作成し、基礎生物学研究所へ移送する。同研究所にて、内胚葉ならびに外胚葉特異的に cre を発現するマウス系統等との交配を行い、Ripply3 のコンディショナルノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析する。

成果の発表

Ripply3 のコンディショナルノックアウトマウスの解析により、咽頭弓の発生機構に関する新たな知見が得られれば、学会発表ならびに国際学術誌への論文発表を速やかに行う予定である。