薬効・安全性評価ユニット

補助事業責任者
淺原 弘嗣（東京科学大学 システム発生・再生医学分野・教授）

組織・時期特異的な複数遺伝子編集マウス作製技術開発

補助事業分担者
千葉 朋希(東京科学大学 システム発生・再生医学分野・講師)、松島 隆英(東京科学大学 システム発生・再生医学分野・医学部内講師)、
内田 雄太郎(東京科学大学 システム発生・再生医学分野・助教)

高度化における研究背景・目的

疾患病態の解明や創薬・治療法開発には、マウスを用いた個体レベルでの遺伝子機能解析が不可欠である。特に、Cre/loxPシステムを利用した組織・細胞種特異的、あるいは時期特異的なコンディショナルノックアウトマウスは重要な研究ツールとして広く活用されている。しかし、複数遺伝子を同時にノックアウトする場合には、Cre発現マウスと複数のfloxマウスを含む3系統以上の交配が必要となり、目的のマウス作製に年単位の時間を要する。このことが研究の大きな律速要因となっており、より迅速かつ効率的な遺伝子改変技術の開発が求められている。

当研究室では、トランスポゾンシステム、CRISPR/Cas9システム、およびCre/loxPシステムを組み合わせ、複数のgRNAをタンデムに連結したコンストラクトを用いて、多重遺伝子改変マウスの作製支援を行ってきた。

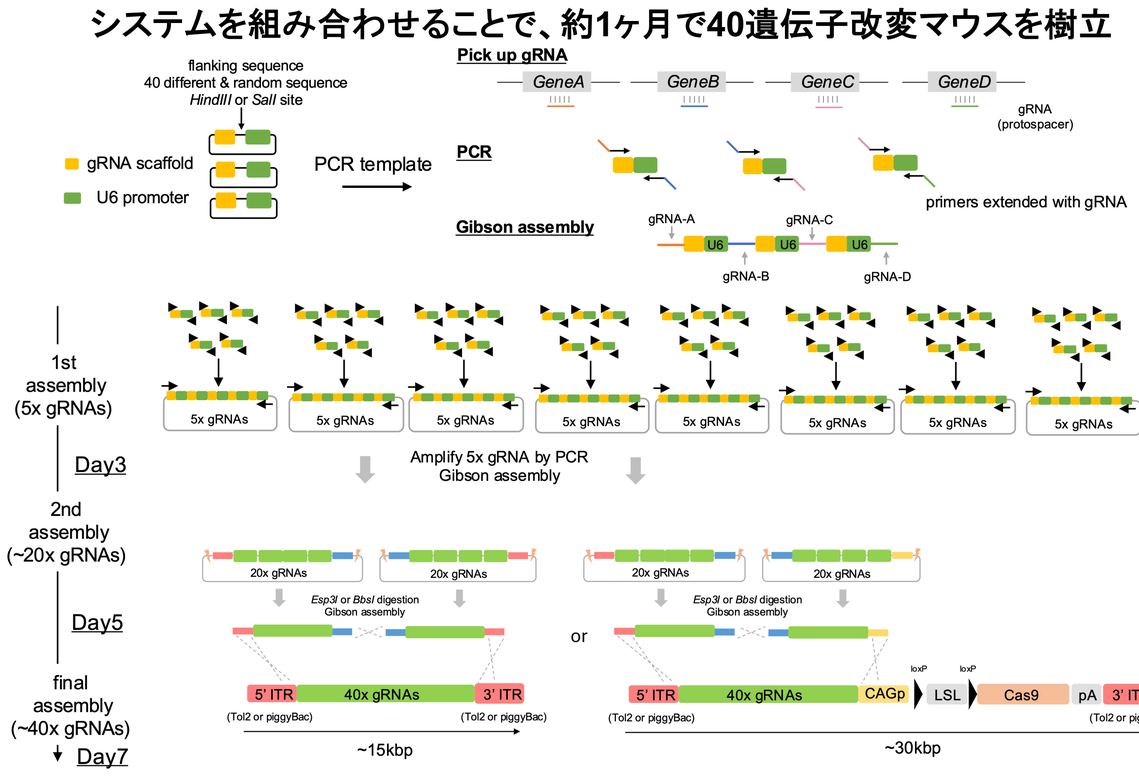
さらなる高度化を目指し、下記の2点を目的として研究開発を進めている。

1. 数十種類のgRNAを連結可能なシステムを構築し、遺伝子ファミリーの一括改変や病態関連遺伝子群の同時改変を実現することで、多重遺伝子改変マウスの作製を目指す。
2. Cas7-11システムを応用し、時空間特異的な遺伝子発現抑制やアイソフォーム特異的な制御を可能にすることで、新たな遺伝子機能解析基盤の構築を目指す。

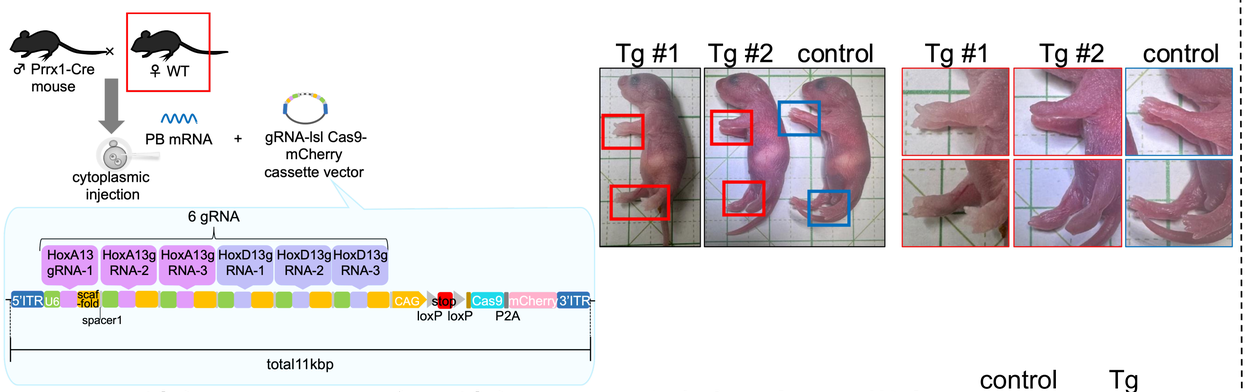
高度化の成果

1. 高速タンデムgRNAアセンブリシステム(FASTER)により多重遺伝子gRNA発現vector作製の高速化を実現

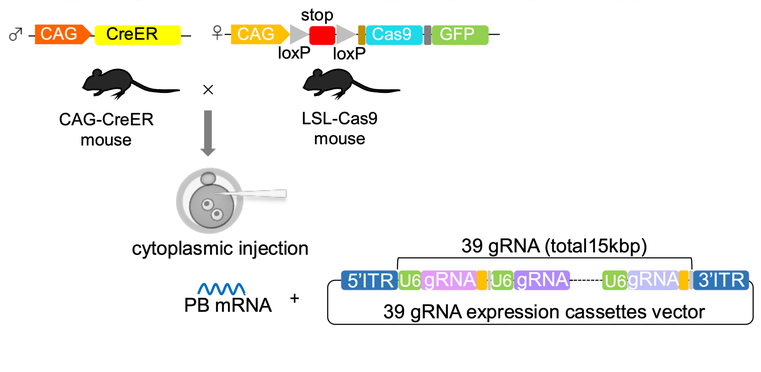
- ✓ 約1週間で約40個のgRNA発現するvector構築
- ✓ FASTER、トランスポゾンシステム、CRISPR/Cas9システム、Cre/loxPシステムを組み合わせることで、約1ヶ月で40遺伝子改変マウスを樹立



- ✓ Hoxa13/Hoxd13多重遺伝子改変マウスにおいて、F0世代で既報の表現型を再現



- ✓ Hox遺伝子ファミリー全39遺伝子の同時改変マウスの樹立

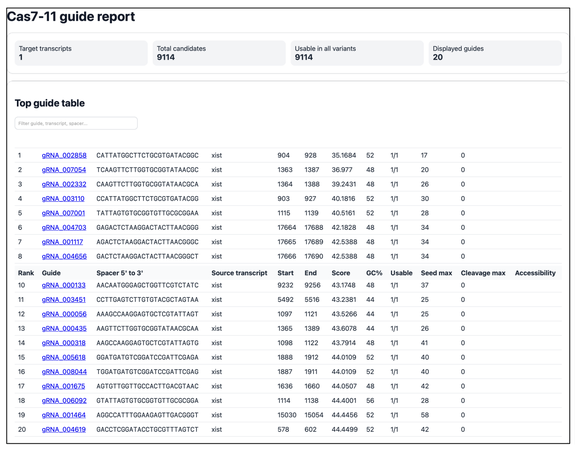




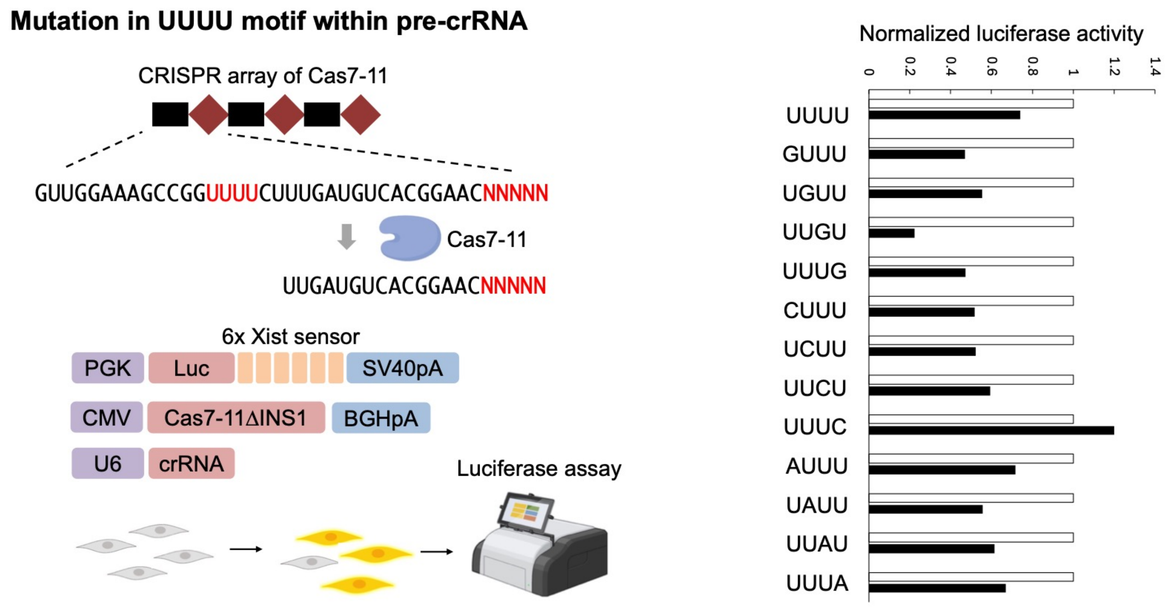
2. Cas7-11システムを利用したRNA編集マウスの作製

- ✓ Cas7-11専用crRNA設計アプリ(CleavR)の開発により、crRNA候補の選定を効率化し、RNA標的化実験の迅速化と研究開発期間の短縮を実現

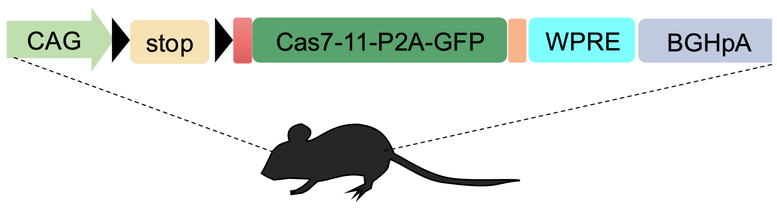
CleavR
Cas7-11 RNA Spacer Designer

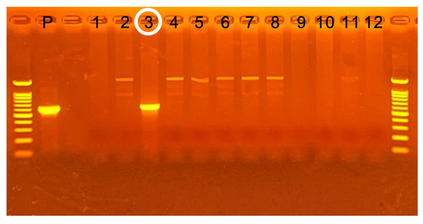


- ✓ UUUUモチーフに変異を導入することで、U6プロモーターによる早期転写終結を回避し、転写効率を向上



- ✓ Cre/loxPシステムを用いることで、時空間特異的RNA編集マウスを樹立





今後の発展

- ➢ 高速gRNAアセンブリシステムにより、時期特異的なHoxファミリー遺伝子の多重改変マウスを迅速に作製することに成功した。今後、本モデルを用いて、これまで不明な点の多かった成体組織におけるHox遺伝子の機能解明を目指す。
- ➢ Cas7-11発現マウスにおいて、アイソフォーム特異的ならびに多重mRNA発現抑制を可能にし、RNA編集マウスの普及と活用促進を目指す。

《謝辞》
本研究を進めるにあたり貴重なご助言を賜りました川上浩一先生に深く感謝申し上げます。また、日頃よりご協力くださいました研究室の皆様と、実験動物施設の皆様に厚く御礼申し上げます。本研究は文部科学省 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業(BINDS)の支援を受けて実施されました。

Institute of SCIENCE TOKYO

BINDS 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム
Basis for Supporting Innovative Drug Discovery and Life Science Research

《COI開示》本研究に関して、開示すべき利益相反はありません。