薬効・安全性評価ユニット

補助事業代表者（所属・職名）
中山　学（かずさＤＮＡ研究所 先端研究開発部・特任研究員）

疾患モデルマウスの作製とゲノムエンジニアリング技術の開発

補助事業分担者（所属・職名）
古関　明彦（国立研究開発法人理化学研究所 生命医科学研究センター・チームディレクター）、
近藤　隆　（国立研究開発法人理化学研究所 生命医科学研究センター・上級研究員）

高度化における研究背景・目的

高度化　技術の高度化の概要

◆RMCE法を用いたES細胞への(~200kbpを含む）BACクローン導入法の改良

◆相同組み換え法を用いたコンディショナルKOやKI技術の改善
（体細胞モザイク変異の導入技術の開発)

◆新規部位特異的組み換え酵素システム：VCre/VloxPとSCre/SloxP技術の更なる研究

◆新たな部位特異的組み換え酵素と認識サイトの同定

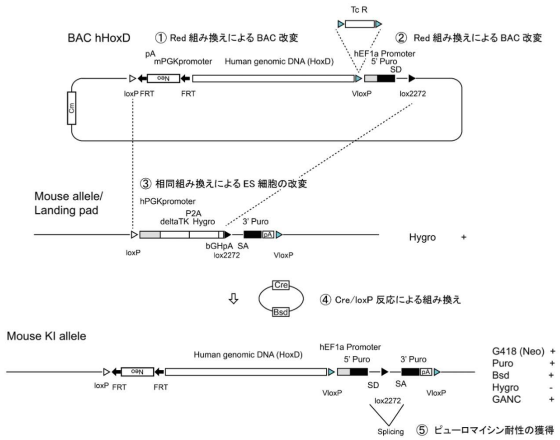
◆CRISPR/Cas9によるゲノム編集の高度化



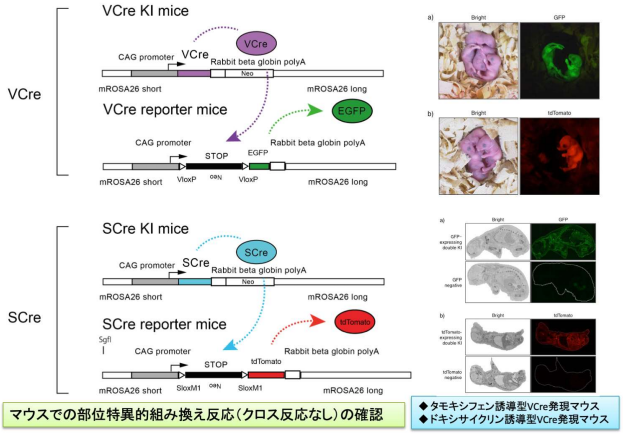
様々な疾患の多様なメカニズムが明らかになってきたことにより、更に詳細な解析を行うために、疾患モデルマウスにおいても、複雑でより緻密なゲノム改変手法と有用なゲノムエンジニアリングツールが必要となってきた。１）遺伝子の組織特異的や発生時期特異的な発現調節を行うための構造単位はTAD（topology associating domain)であると考えられており、TADを詳細に解析するためには、少なくとも（100kbp~200kbpを含む）BACクローンをゲノム上の狙った場所に自由に導入できる技術が必要とされることから、RMCE法を用いたES細胞へのBACクローン導入法の改良を行った。２）コンディショナルノックアウトマウスに代表されるように、Cre/loxPやFlp/FRTタイプの部位特異的組み換えシステムは極めて有用なゲノムエンジニアリングのツールである。Cre/loxPシステムを基にした様々な分子生物学的な実験手法が考案され、それらのエレガントな実験手法を用いて、多くの生命科学の謎が解き明かされてきたが、クロス反応が起きてしまうために複数のCre/loxPを含む手法を同一の細胞内で同時に用いることはできなかった。クロス反応が起きない多数の部位特異的な組み換え酵素システムが得られれば、部位特異的組み換え酵素を用いる多くの実験手法を同時に使用することができるようになる。そこで、新規部位特異的組み換え酵素システムであるVCre/VloxPとSCre/SloxPを同定し、マウス個体で使用できることを示しただけでなく、RCre/RloxPとWCre/WloxPと新たに名付けた部位特異的組み換え酵素システムのスクリーニングによる同定と技術開発を行なった。

高度化の成果

マウス標的サイトへのヒトゲノムDNAを含むBACクローンのノックイン（TAD(topology associating domain)の解析やヒト化マウス作製）



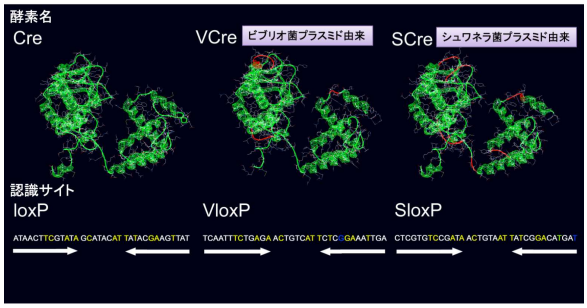
VCre、SCre発現マウス及びレポーターマウス



マウスでの部位特異的組み換え反応（クロス反応なし）の確認

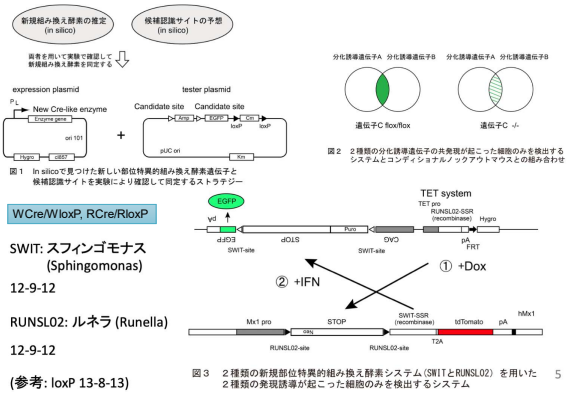
◆タモキシフェン誘導型VCre発現マウス
◆ドキシサイクリン誘導型VCre発現マウス

新しい部位特異的組み換え酵素システム



✓既存の組み換え系とクロス反応しませんので、既存の組み換えシステムと同時に使用することができます。（特許第5336592号, 特許第5336676号）

新たな部位特異的組み換え酵素と認識サイトの同定



WCre/WloxP, RCre/RloxP

SWIT: スフィンゴモナス (Sphingomonas)
12-9-12

RUNSL02: ルネラ (Runella)
12-9-12

(参考: loxP 13-8-13)

今後の発展

RMCE法を用いたES細胞へのBACクローン導入法の改良法を用いて、TAD（topology associating domain)を解析し、遺伝子の組織特異的や発生時期特異的な発現調節機構を調べるとともに、ヒト化マウスにおいても有用であることを示すことにより、この技術手法を研究者に広げていく予定である。
新規部位特異的組み換え酵素システムであるVCre/VloxPとSCre/SloxPに加えて、RCre/RloxPとWCre/WloxPと新たに名付けた部位特異的組み換え酵素システムの技術開発を継続し、更に多くの実証例を示すことにより、汎用のゲノムエンジニアリングツールとして、多くの研究者が使用することができる環境を整えていく予定である。