

光によるDNA組換えを可能にするマウスの作製に成功

研究者所属・職名 : 大学院医歯薬学総合研究科
・教授

ふりがな たからだ たけし

氏名 : 寶田 剛志

主な採択課題 :

- [挑戦的研究\(萌芽\)「光活性型Creシステムを利用した生体内遺伝子操作法の開発」\(2020-2022\)](#)
- [基盤研究\(B\)「光操作技術による生体内間葉系幹細胞の集積に関する分子理解と歯槽骨関連疾患への応用」\(2017-2020\)](#)
- [新学術領域研究\(研究領域提案型\)「体内時計制御グリアネットワークによる「精神-疼痛」連関メカニズムの解明」\(2016-2017\)](#)

分野 : 幹細胞生物学

キーワード : 遺伝子組み換え、光操作、テトラサイクリン誘導発現系

課題

- なぜこの研究をおこなったのか? (研究の背景・目的)

Cre recombinase(Cre)-loxP 部位特異的 DNA 組換え酵素反応は、標的遺伝子の塩基配列をゲノムDNA上から除去、または挿入するための非常に強力なツールとして世界中で幅広く利用されており、現在におけるマウス遺伝子操作技術研究においては欠くことのできない手法である。このシステムを時間的に制御するためには、タモキシフェンのような薬剤誘導法を用いて調節を行うことができるが、空間的制御できないことが問題点であった。現在までCreシステムを用いた非侵襲的かつ時空間的な精度をもつin vivoゲノム編集マウスについては報告されていなかった。

- 研究するにあたっての苦労や工夫 (研究の手法)

2016年に佐藤守俊教授(東京大学)の研究グループより、生体内遺伝子の機能解析技術として“青色光を用いて人為的にコントロールするCre-loxP”(PA-Cre)システムが報告された。この系は、分裂した不活化CreリコンビナーゼのN末端側断片とC末端側断片に光スイッチタンパク質を連結し、光照射によりこのタンパク質が結合することにより活性化Creリコンビナーゼとして働くことができる(図1)。Creの働きを光によって生体内でもコントロールできれば、狙った生体組織や細胞を標的として、任意のタイミングでDNA組換えを誘導することが可能となり、遺伝子解析技術の可能性を大きく広げることができると考えた。

光によるDNA組換えを可能にするマウスの作製に成功

研究成果

●どんな成果がでたか？どんな発見があったか？

まず、PA-Creシステムとテトラサイクリン誘導発現系(Tet-On/Off)システムを組み合わせたベクター(TRE-PA-Creベクター；**図1**)を作製し、βアクチン遺伝子座への迅速なCas9ノックイン技術を用いて受精卵に注入した。生まれてきたマウスをゲノムDNAシーケンス解析により、TRE-PA-Creベクターがβアクチン遺伝子座導入されたマウスを得ることに成功した(TRE-PA-Creマウス)。これらのマウスが実際にTet-OffシステムにおけるtTAにより断片化Creを作り、青色光に反応して活性化型Creとして働くかを評価するために、TRE-PA-CreマウスをCreによりtdTomatoを発現できるROSA26-loxP-stop-loxP-tdTomato(Rosa26-tdTomato)マウスと交配した。交配してできたマウスをTRE-PA-Cre:ROSA26-tdTomatoマウスとし、このマウスにtTA発現ベクターを迅速に肝臓へ導入するHTV法により尾静脈注射を行った。その後蛍光灯または青色LED光下で照射を行い、注入から24時間後に肝臓を摘出し、顕微鏡下でtdTomatoの発現観察を行った。蛍光灯下においたマウスの肝臓ではtdTomatoを発現しなかったが、青色LED光下においたマウスの肝臓ではtdTomatoが強く発現した。このことから我々が作製したTRE-PA-CreマウスはtTA存在下で外部光源による非侵襲的な照射でDNA組換えを誘導可能であることを証明した。

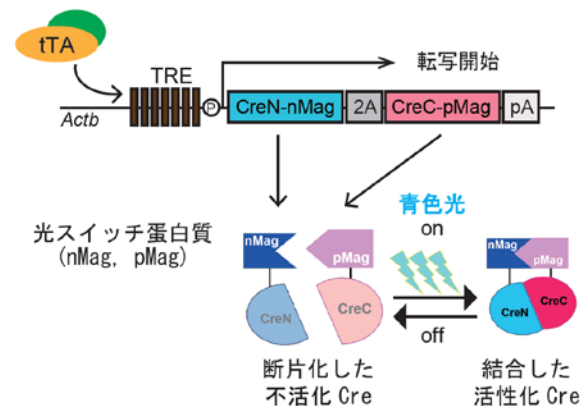


図1：光スイッチタンパク質を利用したCre活性のON/OFF

今後の展望

●今後の展望・期待される効果

光遺伝学を用いたゲノム編集技術は細胞やマウスへ導入することで報告されてきたが、光応答性遺伝子改変マウスの報告はこれまでなかった。今回の成果は光応答性Creシステムに加え、細胞特異性をもつテトラサイクリン誘導発現システムを導入したTRE-PA-Creマウスであることから、このマウスを使用することで「生体組織」で、「細胞種（特定プロモーターでON）特異的」かつ、従来不可能であった「時間・空間（光照射時/部位）特異的」な精度を持つ生体内遺伝子操作が可能となり、今後、様々な組織・細胞で生物医学研究の新規戦略手法として幅広く使用されると期待される。