

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) ナショナルバイオリソースプロジェクト
(英語) National Bioresource Project

補助事業課題名： (日本語) ゲノム編集による難治疾患モデル整備のための基盤技術開発
(英語) Fundamental technology development of genome editing for
the establishment of intractable disease models

補助事業担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 室長 吉木 淳
所属 役職 氏名： (英語) Atsushi Yoshiki, Head, RIKEN BioResource Center

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括成果報告)

和文

1. マウス受精卵で相同組換え効率を最大化するため、筑波大・杉山教授との共同研究でゲノム編集酵素である Cas9 の改変を行い、改変 Cas9 発現ベクターを構築した。
2. ノックインのためのターゲティングベクターの構築を行った。コンディショナル p53 ノックアウト、Pdx1 遺伝子座への CreERT2 ノックイン (Pdx1-CreERT2)、ROSA26 遺伝子座へのコンディショナル高輝度ルシフェラーゼ遺伝子ノックイン、Kras 疾患変異を有するコンディショナルノックインベクターの 4 種類すべてを完成した。
3. マウス受精卵に対し DNA マイクロインジェクションを行い、ゲノム編集によるノックインマウスのファウンダー作出を行った。4 種類のターゲティングベクターを用い、各種マイクロインジェクション条件の比較を行い、1 回の受精卵への DNA マイクロインジェクションでノックインマウスが得られる条件を検討した。改変型 Cas9 を用いた場合に、コンディショナル p53 ノックアウトと Pdx1-CreERT2 のターゲティングベクターでノックインマウスの候補が高効率で得られた。同様な試みを行なった ROSA26 と Kras 遺伝子座へのターゲティングベクターについては、1 回の DNA マイクロインジェクションではノックインマウスの候補が得られなかった。ES 細胞でのゲノム編集によるノックイン効率について、筑波大・杉山教授との共同研究により検討したところ、コンディショナル p53 ノックアウトと Pdx1-CreERT2 のターゲティングベクターでは、ノックインされた ES 細胞の

クローンが高い効率で得られた。一方、ROSA26 と Kras 遺伝子座へのノックイン効率は、10 倍以上低いことがわかり、DNA マイクロインジェクションによるノックインマウス作出の成否と相関関係があることが判明した。ノックインマウスの候補が得られなかった ROSA26 と Kras 遺伝子座へのノックインについては、ターゲティングベクターの変更やマイクロインジェクションの条件をさらに検討することにより、ノックインマウス樹立の試みを継続する。

4. ゲノム編集技術によって作出されるノックインマウスに付随する、見過ごされがちな予期せぬ変異導入事例に遭遇した。ポジティブ・ネガティブ選別を経ない受精卵への DNA マイクロインジェクションでは、ノックインマウスのファウンダー候補個体にベクターバックボーンが導入されるケースが見受けられた。ベクターバックボーンがゲノム上のターゲット遺伝子座にリンクした挿入であるか否かの判別は、次世代の遺伝解析結果を得るまでわからないが、リソースセンターとしてゲノム編集技術によって作出されたノックインマウスの遺伝品質を管理する上で、新たな注意点をみいだすことができた。今後の品質管理項目に反映させる。
5. 既に得られているコンディショナル p53 と Pdx1-CreERT2 ノックインマウスの候補は、ファウンダーマウスとして C57BL/6 系統に戻し交配を行い、系統を樹立する。
6. ES 細胞を用いた Kras 遺伝子座へのノックインでは、ターゲティングベクターに含まれる点変異を同時に導入できることが確認された。ターゲティングベクターの受精卵へのマイクロインジェクションにおいて、ノックインはできても点変異を導入できなかった場合には、再度、点変異導入のためのマイクロインジェクションを実施する。ES 細胞からのマウス系統の樹立も考慮する。
7. 改変 Cas9 発現ベクターは、投稿中の論文が受理されたのちに BRC から公開する。ターゲティングベクターや各種ノックインマウスに関しても、系統の樹立と並行して公開手続きを進める。

英文

1. Construction of modified Cas9 vectors

In order to maximize homologous recombination efficiency upon microinjection to mouse fertilized eggs, we generated expression vectors for Cas9-fusion protein with protein X and Y in collaboration with Dr. Sugiyama at University of Tsukuba.

2. Construction of plasmid knock-in vectors

We completed to construct the following four targeting vectors: conditional p53 KO, CreERT2 knock-in at the Pdx1 locus, conditional high-luminescence luciferase knock-in at the ROSA26 locus, and conditional expression for Kras point mutant protein derived from human patients.

3. Microinjection and production of founder mice

We obtained founder mouse candidates for conditional p53 KO and CreERT2 knock-in at the Pdx1 locus by a single batch of pronuclear microinjections to mouse fertilized eggs. Although attempts to obtain knockin mice at the ROSA26 and Kras loci by a single batch of microinjections failed, we plan to modify targeting vectors and microinjection conditions to further explore a better way to generate knockin mice more efficiently. In parallel, we estimated homologous recombination efficiency at ES cells in collaboration with Dr. Sugiyama and found the efficiency consistent with results obtained by microinjection: high at the p53 and Pdx1 loci, whereas low at ROSA26 and Kras loci.

4. Characterization of genetic modification in founder mice

We encountered unexpected incorporation of targeting vector backbone in the genome of knockin mouse candidates generated by the CRISPR/Cas9 technology. Further studies are needed to assess the nature of this genetic contamination, but this caution will be taken into account to our regular practice of genetic quality control in mouse strains deposited at RIKEN BRC.

5. Establishment of mouse lines from founder mice.

Germline transmission will be tested in founder mice by backcrossing them to the C57BL/6 strain at early FY2017.

6. Introduction of Kras point mutations

We confirmed that, at ES cells, the Kras targeting vector could introduce a point mutation together with a large conditional insert fragment. But, we also found that the point mutation was occasionally reverted to the wild-type genome sequence due to incomplete homologous recombination. In case our further attempt toward microinjection of a newly modified Kras targeting vector cannot introduce the point mutation, we plan to make additional microinjections for the point mutation to mice that harbor the large conditional insert fragment. Targeted ES cells are alternative option to establish conditional Kras point mutant mice.

7. Deposit of mouse lines and their information to be open to the public

Cas9 vectors have already been deposited to Gene Engineering Division of RIKEN BRC and will be open after our paper is published. Mice and targeting vectors will also be available right after we confirm germline transmission from founder mice.

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）
投稿中
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
未発表
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし
- (4) 特許出願
該当なし