

令和2年4月23日

光による DNA 組換えを可能にするマウス作製に成功 ～テトラサイクリン誘導光応答性 Cre-loxP マウス～

◆発表のポイント

- ・ Cre recombinase(Cre)-loxP 部位特異的 DNA 組換え酵素反応^[1]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強力なツールですが、これまでこれを時間的に制御する方法には課題がありました。
- ・ テトラサイクリン誘導発現系を搭載した、光依存的に Cre-loxP システムが稼働する遺伝子改変マウス (TRE-PA-Cre マウス) を作製しました。
- ・ TRE-PA-Cre マウスと交配させたマウスを用いて、tTA^[4]存在下で青色 LED 光により Cre が機能することを証明しました。
- ・ TRE-PA-Cre マウスの使用により非侵襲的に、生体内細胞種特異的かつ時空間的な生体内遺伝子操作による機能解析が可能になると期待されます。

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 (医) の高尾知佳助教と宝田剛志研究教授の研究グループは、光応答性 Cre-loxP システム(PA-Cre)とテトラサイクリン(Tet)誘導発現系システムの Actb locus への迅速なノックイン技術を組み合わせて、青色光/細胞種特異的な DNA 組換え反応を可能とする遺伝子改変マウス(TRE-PA-Cre マウス)の作製に成功しました。成果は3月20日、国際科学誌「*Biochem. Biophys. Res. Commun.*」の Research Article として掲載されました。今回作製したマウスが、これまで不可能であった「細胞種特異的」かつ「光照射時/部位特異的」な生体内遺伝子研究に利用されることが期待されます。

◆研究者からのひとこと

Tet 誘導性の不活化 Cre recombinase が光依存的に活性化する遺伝子改変マウスの作製に成功しました。これまで知り得なかった細胞種特異的かつ時空間的な遺伝子解析が可能になると期待しています。今後はこのマウスを用いて病因や疾患に関わる遺伝子機能の解明へつながる研究を進めていきたいと考えています。



高尾助教



PRESS RELEASE

■発表内容

<現状>

Cre recombinase(Cre)-loxP 部位特異的 DNA 組換え酵素反応^[1]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います。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す。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ますが、薬剤投与は生体の生理的環境を模倣できないことが問題点です。現在まで Cre システムを用いた非侵襲的かつ時空間的な *in vivo* ゲノム編集マウスについては報告されていませんでした。2016 年に *Nature Chem Biol.*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^[2]が報告されました。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、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ます。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ました。

<研究成果の内容>

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^[3]を組み合わせたベクター(TRE-PA-Cre ベクター；図 1A)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ました。生まれてきたマウスをゲノム DNA シークエンス解析により、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ました(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(図 1B)ROSA26-loxP-stop-loxP-tdTomato(Rosa26-tdTomato)マウスと交配しました。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^[5]法により尾静脈注射を行いました。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 の発現観察を行いました。蛍光灯下においたマウスの肝臓では tdTomato を発現しませんでした。青色 LED 光下においたマウスの肝臓では tdTomato が強く発現しました(図 1C)。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ました。

<社会的な意義>

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ましたが、光応答性遺伝子改変マウスの報告はこれまでありませんでした。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



PRESS RELEASE

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ます。

■論文情報

論文名：Establishment of a tTA-dependent photoactivatable Cre recombinase knock-in mouse model for optogenetic genome engineering.

掲載紙：Biochem. Biophys. Res. Commun. in press.

著者：Tomoka Takao, Yuichi Hiraoka, Kenji Kawabe, Daisuke Yamada, Lu Ming, Kohichi Tanaka, Moritoshi Sato, Takeshi Takarada.

DOI：10.1016/j.bbrc.2020.03.015

URL：https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.015

■研究資金

本研究は、科学研究費補助金の支援を受けて実施しました（基盤研究B(17H04399)）

■補足・用語説明

[1] Cre-loxP 部位特異的 DNA 組換え酵素反応

loxP 配列と呼ばれる 34 塩基の DNA 配列に対し Cre と呼ばれる DNA 組換え酵素が働くことにより生じる部位特異的 DNA 組換え酵素反応。Cre を発現させると、loxP に挟まれた DNA 領域が不可逆的に除去される。

[2] PA-Cre (photoactivatable-Cre-loxP system)

2 分割にして一時的に不活化させた Cre に光スイッチ蛋白質を連結させて、青色光照射により光スイッチが結合することにより分割していた Cre が活性化型 Cre として働くようになるシステム。

[3] テトラサイクリン誘導発現系(Tet-On/Off)システム

テトラサイクリン(Tet)誘導発現系システムとは抗生物質テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン (DOX) 投与により可逆的に目的遺伝子の発現を調節することができる。このシステムは大腸菌テトラサイクリン耐性オペロンで働く Tet リプレッサー (TetR) と Tet オペレーター配列 (TetO 配列)により、TetR はテトラサイクリン非存在下で TetO 配列に結合するが、テトラサイクリン結合により TetO 配列に結合できないという性質を利用する。DOX 存在下で目的遺伝子を発現するものを Tet-On システム、逆に DOX 非存在下で目的遺伝子が発現するものを Tet-Off システムと呼ぶ。

[4] tTA (tetracycline Transactivator)

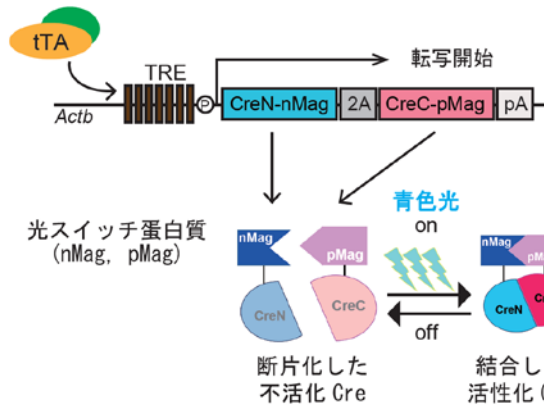
TetR とヘルペスウイルス由来の VP16 転写活性ドメイン (VP16AD)との融合タンパク質であり TetO 配列に結合すると下流のプロモーターを活性化する。

[5] HTV(hydrodynamic tail vein)法

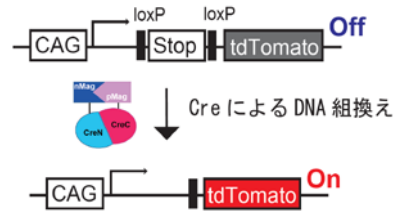
標的遺伝子を肝臓に効率的に到達する尾静脈投与法。

PRESS RELEASE

図 1 (A)



(B)



(C)

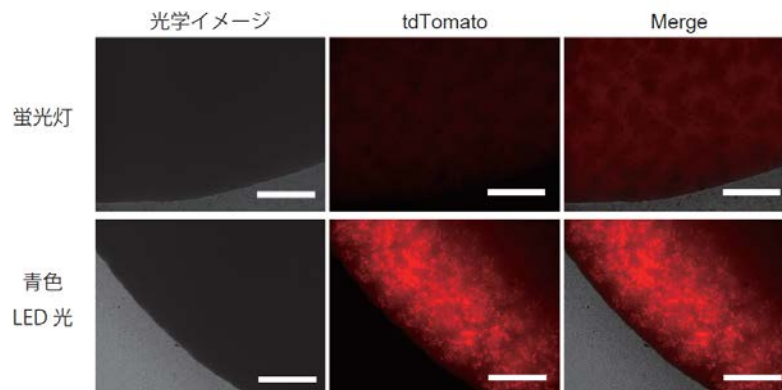


図 1

(A) TRE-PA-Cre ベクターから活性化型 Cre ができるまでの流れ。

(B) Cre により tdTomato を発現できるシステム。

(C) TRE-PA-Cre マウスと Rosa26-tdTomato マウスを交配してできた TRE-PA-Cre: Rosa26-tdTomato マウスを用いて tTA 導入後、蛍光灯下または青色 LED 光下で 18 時間照射し、肝臓における tdTomato の発現を青色光照射時でのみ検出した。

<お問い合わせ>

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 (医)
組織機能修復学分野 研究教授 宝田 剛志
(電話番号) 086-235-7407
(FAX) 086-235-7412