

研究成果報告書の概要

講座等名	モデル動物部門	事業推進者名	李 成一
所属部門	がん部門		
分担研究課題	病態モデル遺伝子改変マウスの作製および維持、保存に関する研究		
キーワード	遺伝子改変マウス、ES 細胞、CRISPR/Cas9、体外成熟卵子		
講座内の本プロジェクト参加研究者数			2 名
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）</p> <p>李成一（准教授）遺伝子改変マウスの作製および解析 西村愛美（助教）遺伝子改変マウスの作製および解析</p>			
<p>研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）</p> <p>様々な病態モデルに対応するために、多くの遺伝子改変マウスが作成され、研究に使用されている。遺伝子改変マウスの使用には、内在性タンパクの動態を探るためのマーカー遺伝子を付随するものや、遺伝子の KO によりその分子動態の制御機構を探るなど、様々である。現在までに、本部門では、リンパ球のインテグリン活性化の制御に関わる分子について解析を行う為の遺伝子改変マウスの作成を主に行ってきた。特に、ES 細胞を用いた遺伝子改変マウスの作成では、Rap1 の活性化因子である C3G や RasGRP2 を部位特異的にノックアウトするキメラマウスの作成および生殖系列への寄与に成功し、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いた KO マウスの作成にも着手し、Sipa1 の KO マウス作製を行ってきた。</p> <p>平成 29・30 年度は、現在までに作出してきたマウスの保存と再生に注力してきた。限られた飼育室において、通常の交配を用いて実験に使用できるだけの動物を作成するにはスペースも時間も足りない。必要な時期に必要な匹数の実験動物を供給する手段として、胚・配偶子の凍結保存と、それを生体に戻す作業は必須となっている。本部門では、体外受精などの生殖工学技術を使用して、凍結胚では、のべ 58 系統・3869 個、凍結精子は、のべ 35 系統・223 本のストローを作成し、のべ 49 系統 660 匹の産子を作成した。また、遠方より輸送された冷蔵精子を用いたクリーン化においても 2 系統行った。</p> <p>また、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術によって 1 系統 2 種類を作成している。CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術は PX330 plasmid を用いた前核注入法を採用し、前核注入後の生存成績は 59/78 (76%)、生存前核卵子と 2 細胞期まで発生した胚を移植した結果、7/43 (16%) が産子として得られ、そのマウスの尾から、ダイレクトシーケンスによって塩基配列を解析した。その結果、得られた産子の内、2 匹で 1 塩基と 4 塩基の欠損を認め、他部門へと供給した。さらに、多様な疾患モデルマウスの中には、排卵障害を持つものも存在しており、卵巣からの未成熟卵子を体外で受精可能な卵子まで発生させる体外成熟技術を用いた体外受精に関しても研究を進めている。しかしながら、体外成熟培地の確立が不完全な上、体外成熟由来の胚は、胚盤胞期胚および産子への発生成績が未だ低率であることから、体外成熟培地の調整による発生成績の改善を行っており、L-carnitine の添加により胚盤胞期への発生成績の向上が確認された。</p>			