

2023 年度
創発的研究支援事業 年次報告書

研究担当者	水野 聖哉
研究機関名	筑波大学
所属部署名	医学医療系
役職名	教授
研究課題名	ミニマル染色体コンソミックマウスの創出
研究実施期間	2023 年 4 月 1 日～2024 年 3 月 31 日

研究成果の概要

複数遺伝子による形質の制御機構を、マウスをモデルとする人為的な遺伝子改変で解き明かすことを目的とする研究である。

2023 年度は候補となる標的遺伝子(およそ 100 種類)に対する sgRNA 配列をデザインした。通常の Cas9 による複数遺伝子破壊では意図しない大規模な染色体構造変異が生じてしまう可能性が考えられるため、塩基編集により遺伝子破壊をする計画としている。そこで、塩基編集にて標的遺伝子の機能を欠失させることができる sgRNA デザインとした。各標的遺伝子に対して、少なくとも 2 種類以上の sgRNA を設定した。上述のいくつかの sgRNA にてマウス受精卵での塩基編集の効率を確認した。化学合成した sgRNA および塩基編集酵素をコードする mRNA を C57BL/6J マウスの受精卵にエレクトロポレーション法にて導入し、その受精卵が胚盤胞期もしくは胎齢 10.5 日まで発生した段階でサンプルリングし標的遺伝子における変異を PCR 法およびサンガーシーケンス法で確認した。条件および標的遺伝子を変更しながら、複数回の実験を行ったが目的の変異はほとんど検出されず、検出された変異もかなり低モザイクであることが判明した。

そこで、別の手法にて多遺伝子塩基編集を実施することにした。より強度な塩基編集条件となるように設定した系にて、上述の sgRNA による塩基編集を行った。その結果、複数の遺伝子座において高効率で遺伝子座の塩基編集が生じることがアンプリコンシーケンスにて確認することができた。更に、複数の sgRNA を同時的に処理することで、10 以上の遺伝子座を同時的に変異させることも可能であった。その一方で、意図しない変異が誘導されることやその変異様式が sgRNA の配列に依存している可能性も示された。