

## 遺伝子の精密な発現制御や改変ができる Cre-loxP 生物を ワンステップで作出可能な技術を発明

組み換え酵素（Cre）の遺伝子と Cre 酵素の作用対象となる特定の DNA 配列（loxP）を一体化したベクターを開発しました。このベクターを使えば、特定の遺伝子の機能解析などに広く利用されている Cre-loxP 生物をワンステップで作出でき、作出時間や費用の大幅な削減が可能となると期待されます。

特定の遺伝子の機能を調べたりする目的で、生命科学の分野で広く用いられているのが Cre-loxP システムを導入した生物（Cre-loxP 生物）です。Cre は DNA 組換え酵素の一種で、34 塩基対の短い DNA 配列（loxP）に結合し、部位特異的な組換えを起こします。例えば、ある DNA 配列を二つの loxP で挟むと、Cre によりその DNA 配列を除去（ノックアウト）することができます。また、loxP の向きや配置を変えることによって、特定の DNA 配列の向きをひっくり返したり、特定の DNA 配列をゲノム中の他の場所に転移させたりすることもできます。

Cre-loxP 生物は一般に、ゲノム中に Cre 遺伝子を含む Cre 系統の個体と、ゲノム中に loxP を含む loxP 系統の個体を別々に作り、交配することで作出します。そのため、作出には多大な時間と費用がかかっています。もしも、Cre 遺伝子と loxP の両方を含むベクター（Cre-loxP 一体型ベクター）を開発できれば、このベクターを受精卵のゲノムに導入するワンステップで Cre-loxP 生物を作出できます。交配が不要となるため、時間と費用の大幅な削減が可能となります。ところが、その実現は困難でした。ベクターの合成に用いる大腸菌の中で、ベクター内の Cre 遺伝子が自発的に発現し、同じベクター内の loxP 領域に組換えが起こってしまうためです。

本研究では、Cre 遺伝子を発現させるプロモーター領域の直前に、TAx9 と名付けた短い DNA を配置することで、大腸菌内での Cre 発現を阻止し、Cre-loxP 一体型ベクターを合成することに成功しました。また、イモリとマウスにこの技術が適用可能であることを実証しました。

本研究チームは、イモリの再生研究を続ける中で、偶然にも Cre-loxP 一体型ベクターの作出に成功していました。TAx9 技術はその仕組みを解明する過程で生まれました。生命科学の広範な研究に利用されるものと期待されます。筑波大学は本技術について、特許を出願中です。

筑波大学生命環境系

千葉 親文 教授

Casco Robles, Martin Miguel 助教

## 研究の背景

Cre-loxP<sup>注1)</sup> 生物は、特定の細胞を標識したり遺伝子の機能を調べたりする目的で、生命科学の研究で広く用いられています。Cre は DNA 組換え酵素の一種で、34 塩基対の短い DNA 配列 (loxP) に結合し、部位特異的な組換えを起こします。例えば、ある DNA 配列を二つの loxP で挟むと、Cre によりその DNA 配列を除去 (ノックアウト) することができます。また、loxP の向きや配置を変えることによって、特定の DNA 配列の向きをひっくり返したり、特定の DNA 配列をゲノム中の他の場所に転移させることもできます。また、Cre 遺伝子を細胞特異的あるいは組織特異的プロモーター<sup>注2)</sup> の後ろに配置すると、Cre を目的の細胞や組織に特異的に発現させることができます。これにより、DNA 組換え反応を細胞特異的あるいは組織特異的に起こさせることができます (図 1)。さらに、CreER という誘導型 Cre を用いると、タモキシフェンと呼ばれる物質を投与することで、細胞質内に留まっていた CreER を核膜を越えて核内に移動させることができます。これにより、DNA 組換え反応を狙った時期に誘導できます。研究者は、これらの原理を組み合わせた Cre-loxP 生物を用いて、特定の細胞を標識したり、細胞の種類や発生段階などに依存した遺伝子の機能を調べたりしています。

Cre-loxP 生物は一般に、ゲノム中に Cre 遺伝子を含み Cre を発現する Cre 系統の個体と、ゲノム中に loxP を含む loxP 系統の個体を別々に作り、それらを交配することで作出します。そのため、Cre-loxP 生物の作出には多大な時間と費用がかかります (図 2)。もしも、Cre 遺伝子と loxP の両方を含むベクター (Cre-loxP 一体型ベクター) を作り、これを受精卵のゲノムに導入することができれば、一回の導入 (ワンステップ) で Cre-loxP 生物を作出することができます。これにより、時間と費用を大幅に削減できるはずですが (図 3)。しかし、実際には、Cre-loxP 一体型ベクターを作製することは困難でした。その理由は、ベクターの合成に用いる大腸菌の中で、ベクター内の Cre 遺伝子が自発的に発現し、同じベクター内の loxP 領域が組換えを起こしてしまうためです (図 4)。

## 研究内容と成果

アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) は臓器自己再生のモデルとして研究されていますが、性成熟まで 1 年以上かかります。このため、従来の手法で Cre-loxP 個体を作出するには、年単位の時間がかかっていました。ワンステップで Cre-loxP 個体を作出できれば、研究サイクルが短縮でき、再生の分子メカニズム研究が加速します。

本研究チームはこれまで、Cre-loxP 一体型ベクターの作製に何度となくチャレンジしてきました。成体アカハライモリの網膜再生の研究において、眼球内の網膜色素上皮細胞を追跡するためです。しかし、Cre による大腸菌内での自発的な DNA 組換え反応を抑制できず、成功には至っていませんでした (Casco-Robles et al., *Scientific Reports* 6: 33761, 2016)。ところが、同時並行で進めていた肢再生の研究において、骨格筋細胞追跡用の Cre-loxP 一体型ベクターが、偶然にもできてしまいました (Tanaka et al., *Nature Communications* 7: 11069, 2016)。この当時はなぜ網膜色素上皮細胞ではうまくいかず、骨格筋細胞ではうまくいくのか、その理由は分かりませんでした。違いは、異なる組織特異的プロモーターを用いているという点だけでした。

それに続く研究において、骨格筋細胞追跡用の Cre-loxP 一体型ベクターに用いた組織特異的プロモーター (アフリカツメガエル由来の筋線維細胞特異的プロモーター) の何が成功の鍵になったのかを、詳細に分析しました。その結果、遺伝子の転写活性に関わる基本プロモーターの上流に存在する AT/TA という配列に富む機能不明の DNA 領域が、大腸菌内での自発的な DNA 組換え反応を阻止することを見出しました。また、この領域が、大腸菌の SOS 反応<sup>注3)</sup> において LexA リプレッサー (遺伝子の転写を抑制するタンパク質) が結合する DNA 配列、いわゆる SOS ボックスとよく似ていることを見出しました。

これらの結果をもとに、Cre-loxP 一体型ベクターの作製に最適な AT/TA 配列をスクリーニングし、最終的に TATATATATATATATATA が最も有効であることを発見しました。本研究チームはこれを TAx9 と名付けました。本研究グループは、TAx9 配列を Cre 遺伝子の発現を駆動するプロモーター領域の直前に配置することにより、大腸菌内での自発的な Cre 発現と DNA 組換え反応を阻止し、Cre-loxP 一体型ベクターを効率よく合成することに成功しました（図 5）。

本研究ではさらに、この技術をアカハライモリの高効率トランスジェニック技術<sup>注 4)</sup>とマウスの CRISPR-Cas9 ノックイン技術<sup>注 5)</sup>と組み合わせることで、これまでに成功してこなかった網膜色素上皮細胞を特異的に蛍光標識する Cre-loxP イモリと、骨格筋細胞を特異的に蛍光標識する Cre-loxP マウスを、ワンステップで作出することに成功しました（図 6）。また、マウスにおいては、Cre-loxP が同一のゲノム領域に組み込まれているため、ゲノム PCR による個体のスクリーニングが容易で、系統が効率的に確立できることも示しました。これらの結果から、TAx9 技術を適用すれば、Cre-loxP 生物の作出にかかる時間と費用を大幅な削減できることを実証しました。

### 今後の展開

TAx9 のような TA の繰り返し配列は、あらゆる生物のゲノムに元から存在しています。今回の研究で、イモリやマウスの発生や生存に影響しないことが確認できました。このため、TAx9 技術は、遺伝子機能を操作する他のさまざまなシステムと組み合わせるだけでなく、多様な生物種に適用可能であると考えられます。生殖齢に達するまでの期間が長い生物や、世代あたりの個体数が少ない生物の場合には特に有効で、今後、生命科学の広範な研究に利用されることが期待されます。

本研究チームは、イモリの高い再生能力が外傷性の疾患（外傷などが原因で生じる線維症や硬化症などの疾患）と共通のメカニズムから進化したとの仮説を持っています。今後、この技術をイモリの再生研究とマウスによる疾患研究に適用し、イモリが疾患から再生能力を進化させたように、疾患を再生に転換するための研究開発を加速させていきます。

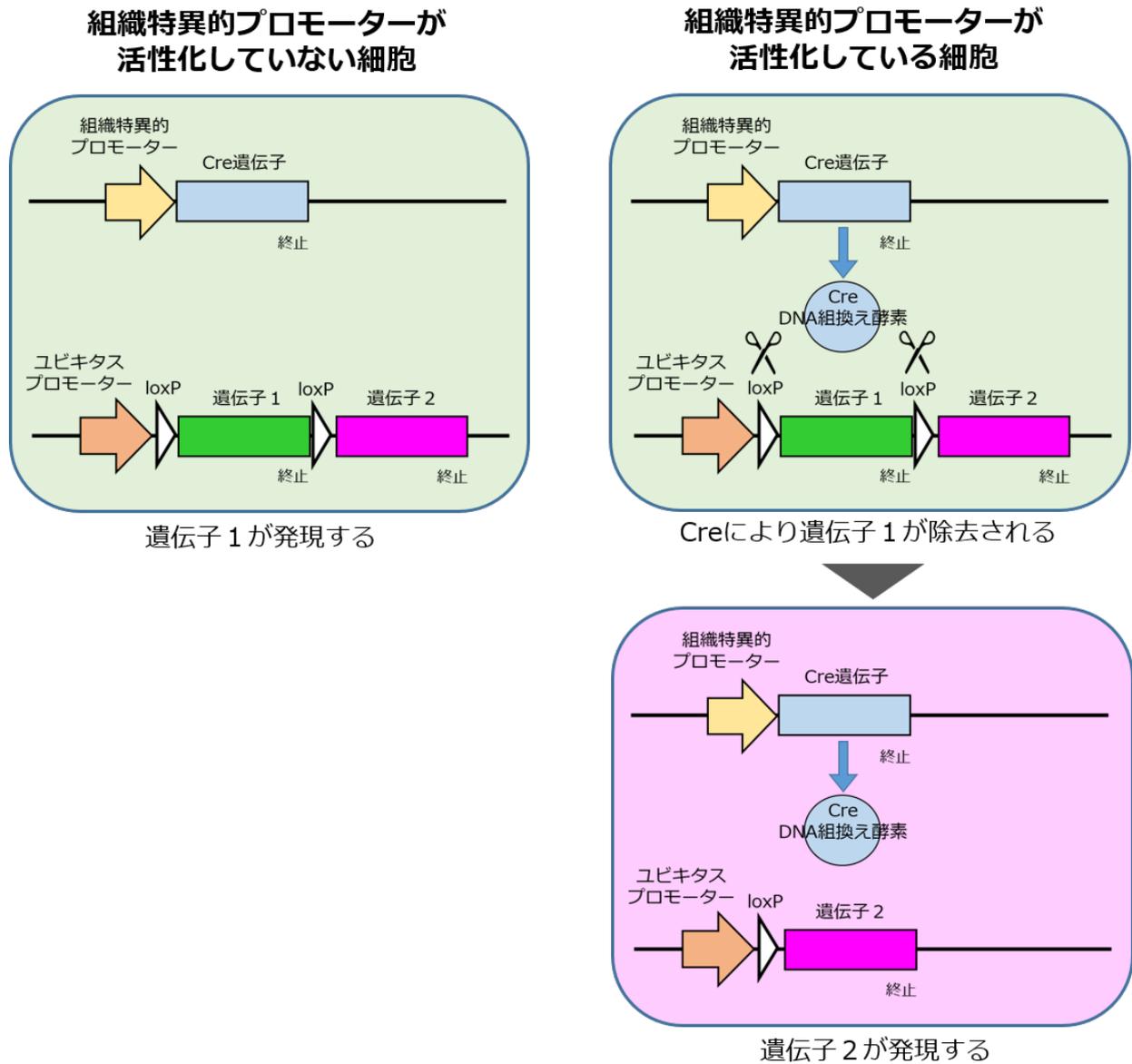


図1 Cre-loxPシステムの概要。ここでは組織特異的プロモーターの後ろにCre遺伝子を配置している。組織特異的プロモーターが活性化していない細胞（左上）では、Creは発現していない。細胞種にかかわらず活性化するユビキタスプロモーターによって遺伝子1が発現している。一方、組織特異的プロモーターが活性化している細胞（右上）では、Creが発現し、二つのloxPで挟まれた遺伝子1が除去される。これにより、ユビキタスプロモーターによって遺伝子2が発現するようになる。本研究では、細胞を赤色蛍光タンパク質 mCherry で標識するための遺伝子を遺伝子2に用いた。

## 従来のCre-loxP生物作出法（例：マウス）

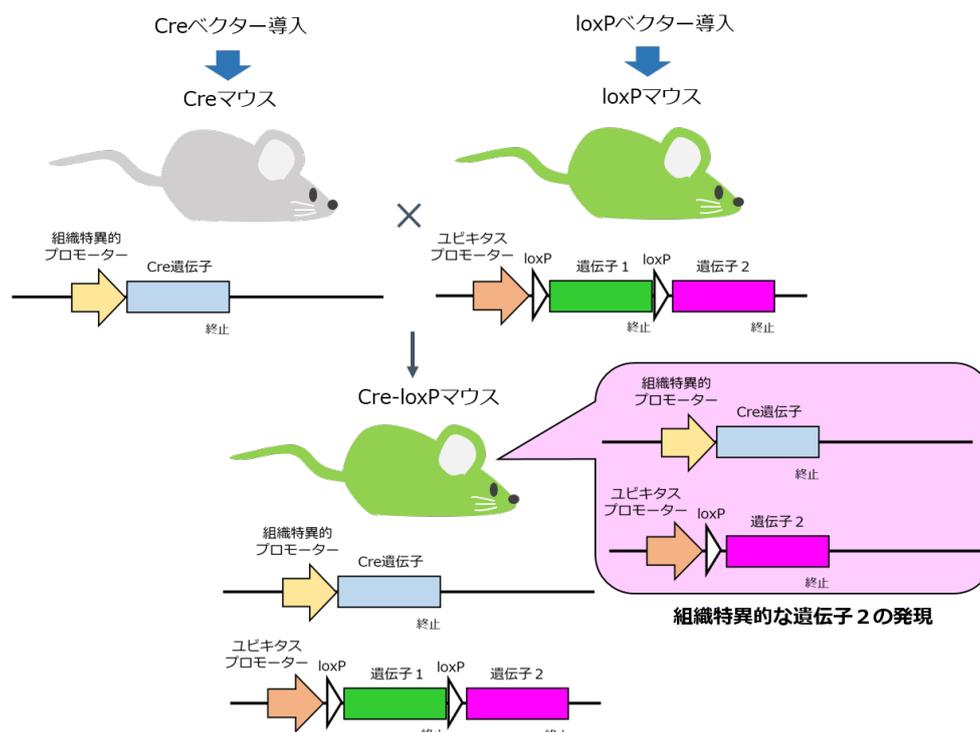


図2 従来の Cre-loxP 生物の作出法。ここではマウスを例に示している。Cre-loxP マウスは、まず Cre マウスと loxP マウスの 2 系統を作成し、次いでこれらを交配することで作出される。組織特異的プロモーターが活性される細胞では、Cre が発現し、遺伝子 1 が除去されることで、遺伝子 2 が発現する（図 1 左の原理）。

## ワンステップ Cre-loxP 生物作出の構想（例：マウス）

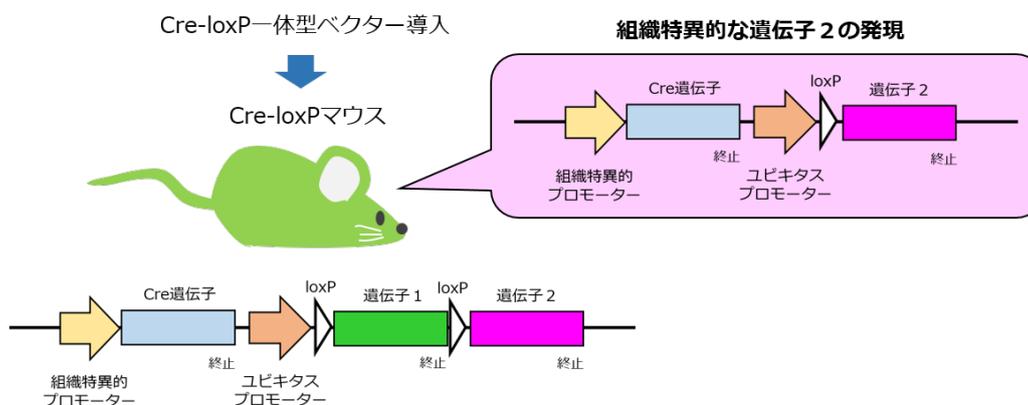


図3 ワンステップ Cre-loxP 生物作出の構想。もし、Cre ベクターと loxP ベクターを一つのベクターとして一体化できれば、一回の導入（ワンステップ）で Cre-loxP 生物が作出できるはずである。ここではマウスを例に示している。組織特異的プロモーターが活性される細胞では、従来法と同様に Cre が発現し、遺伝子 1 が除去されることで、遺伝子 2 が発現するはずである（図 2 参照）。

## 従来のベクター合成

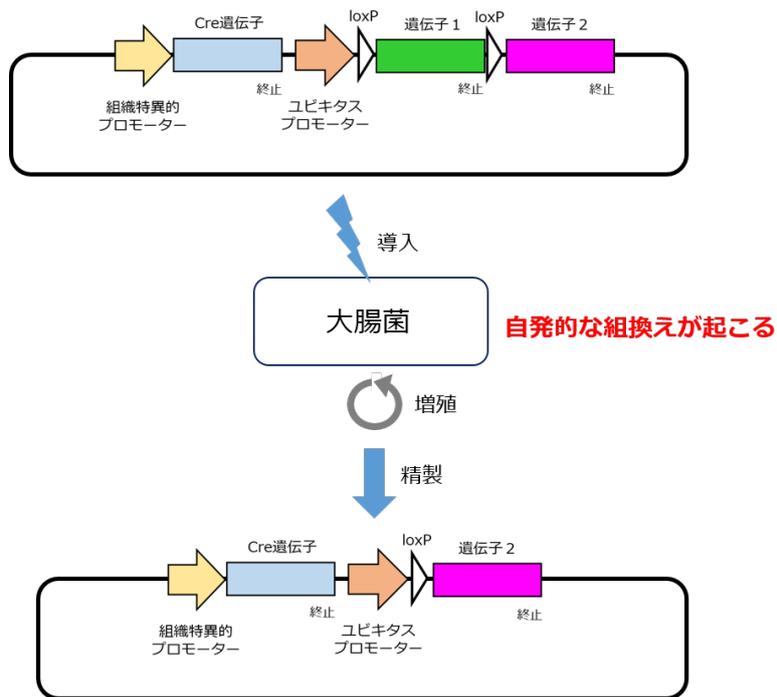


図4 従来法による Cre-loxP 一体型ベクターの合成。大腸菌内で Cre が自発的に発現し、二つの loxP の間で組換えが起こってしまうため、遺伝子1が除去されたベクターが合成される。

## TAx9技術によるベクター合成

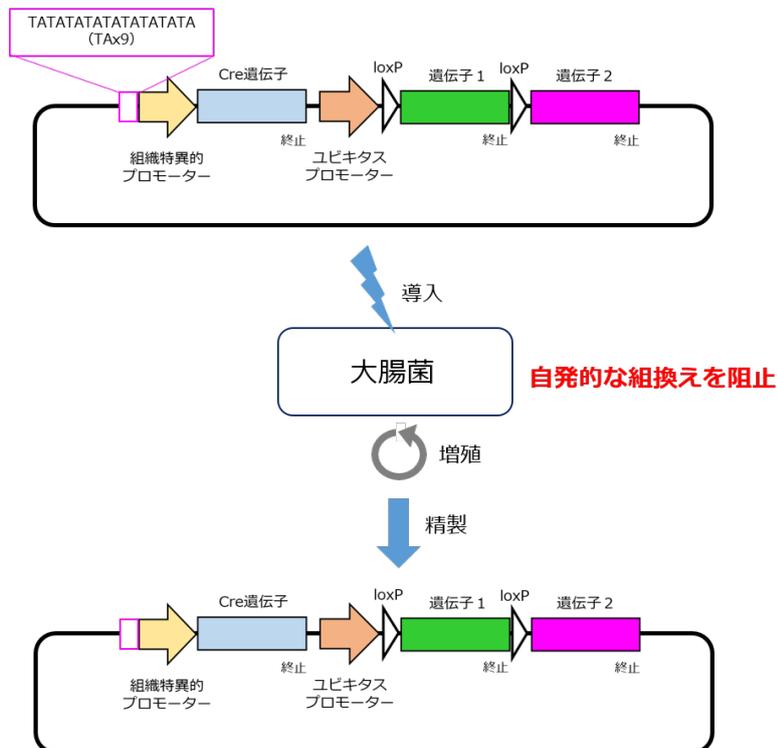


図5 TAx9 技術による Cre-loxP 一体型ベクターの合成。組織特異的プロモーターの直前に置かれた TAx9 が、大腸菌での Cre 発現を阻止するため、正常なベクターが合成される。

## TAx9技術によるワンステップCre-loxP生物作出

Cre-loxP一体型ベクター導入



Cre-loxPマウス/イモリ

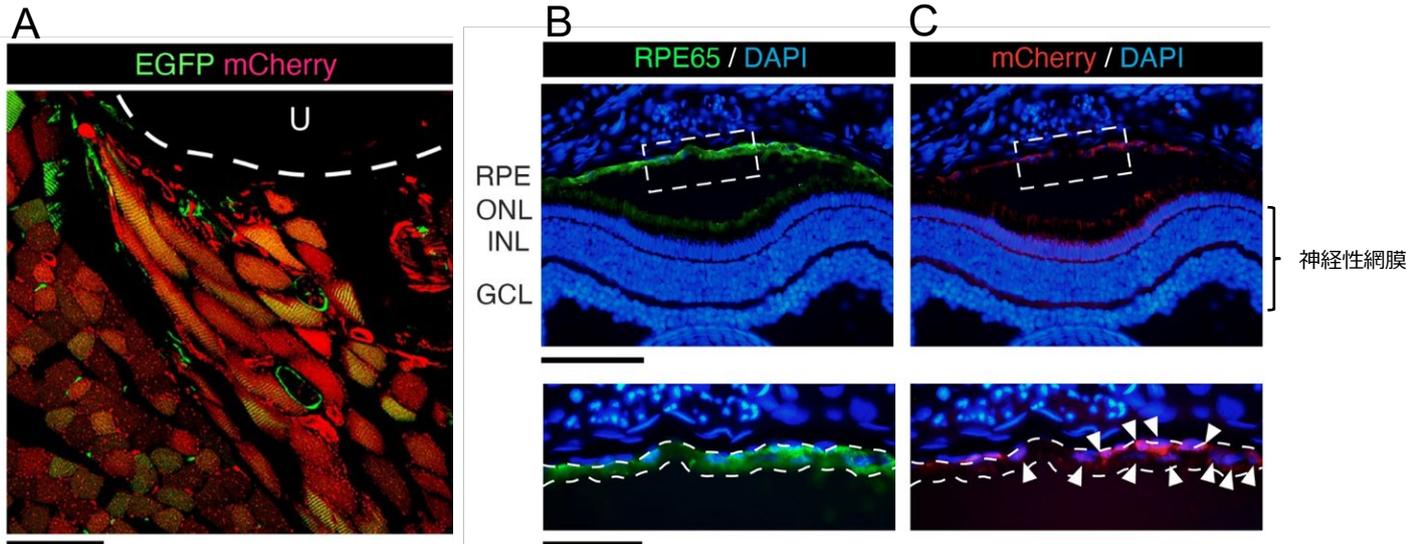


図6 TAx9 技術によるワンステップ Cre-loxP 生物作出。TAx9 技術で合成した Cre-loxP 一体型ベクターを用いて、Cre-loxP マウスと Cre-loxP イモリを作出した。マウスの場合 (A) は、骨格筋細胞特異的に DNA 組換え反応が起こり、赤色蛍光タンパク質 mCherry が発現するようになる Cre-loxP 一体型ベクターを作製し、CRISPR-Cas9 ノックイン法により受精卵に導入した。写真は、F1 世代 (受精卵から成長した個体 (F0 世代) の次の世代) の成体マウスの前肢骨格筋の横断切片である。mCherry の赤色蛍光が骨格筋特異的に観察された。U: 尺骨。スケールバー: 100  $\mu\text{m}$ 。他方、イモリの場合 (B、C) は、眼球内の網膜色素上皮細胞特異的に DNA 組換え反応が起こり、mCherry が発現するようになる Cre-loxP 一体型ベクターを作製し、I-SceI トランスジェニック法により受精卵に導入した。写真は、幼生イモリ (F0 世代) の眼球中央部の切片である。下のパネルは上の画像の点線で囲った領域を拡大したものである。左の列 (B) は、網膜色素上皮 (RPE) 細胞のマーカ分子である RPE65 に対する抗体の反応を緑で示している。右の列 (C) は、mCherry に対する抗体の反応を赤で示している。細胞の核は DAPI で青く染色されている。層状の組織は神経性網膜である。矢頭で示すように、RPE 細胞特異的に mCherry が発現した。ONL: 外顆粒層、INL: 内網状層、GCL: 神経節細胞層。スケールバー: 200  $\mu\text{m}$  (上)、100  $\mu\text{m}$  (下)。

### 用語解説

#### 注1) Cre-loxP

Cre-loxP システムは、DNA 組換え酵素 Cre が、loxP と名付けられた特定の DNA 配列 (Cre の基質) に作用することで生じる部位特異的組換えを利用した遺伝子組換え実験系である。1987 年に Brian Sauer が酵母の研究で報告 (Sauer, *Mol. Cell. Biol.*, 7: 2087-2096, 1987) して以来、さまざまな生物種で使用されている。同様の実験系として、Flp-frt システムや Dre-rox システムがある。

#### 注2) 細胞特異的あるいは組織特異的プロモーター

特定の細胞種あるいは特定の組織の細胞においてのみ活性化する、遺伝子の転写開始に関わる DNA 領域のこと。

#### 注3) SOS 反応 (SOS response)

大腸菌は、紫外線などによるゲノム DNA の損傷に対して、細胞分裂を停止し DNA を修復するなどの反応を示す。ゲノム DNA が損傷すると、RacA タンパク質が活性化し、DNA の修復に関わる遺伝子群 (SOS 遺伝子) の発現を開始させる。DNA 修復に関わる遺伝子群の上流部には AT/TA に富む領域 (SOS ボックス) が存在し、通常の状態では LexA タンパク質が結合して SOS 遺伝子の転写を阻害している。活性化した RacA タンパク質は LexA タンパク質を分解することで、転写を開始させる。

#### 注4) 高効率トランスジェニック技術

I-SceI と呼ばれる制限酵素を利用したイモリの遺伝子組換え技術で、本研究グループがアカハライモリを用いて開発したものである (Casco-Robles et al., *Nat. Protoc.*, 6: 600-608, 2011)。導入遺伝子を含むプラスミッドベクターと I-SceI を受精卵にいっしょに注入することで、導入遺伝子を効率よく受精卵のゲノムに組み込むことができる。

#### 注5) CRISPR-Cas9 ノックイン技術

ガイド RNA と Cas9 核酸分解酵素によってゲノム中の特定部位に二本鎖 DNA 切断を起こさせた際に、導入遺伝子を含むドナーベクターを共存させることで、切断部位に導入遺伝子を組み込む技術である。ここでは、本研究グループがマウスにおいて開発した技術 (Tanimoto et al., *J. Vis. Exp.*, (184): e64161, 2022) を適用した。

### 研究資金

本研究は、科研費による研究プロジェクト (24240062、18H04061、23H05483) および筑波大学医学医療系トランスポーター医学研究センター (TMRC) 共同研究プログラム (TB22-04、TB23-01) の一環として実施されました。

### 掲載論文

【題名】 One-step Cre-*loxP* organism creation by TAx9.

(Tax9 によるワンステップ Cre-*loxP* 生物作出)

【著者名】 M. M. Casco-Robles, T. Echigoya, T. Shimazaki, Y. Murakami, M. Hirano, F. Maruo, S. Mizuno, S. Takahashi, C. Chiba.

【掲載誌】 *Communications Biology*

【掲載日】 2025 年 3 月 6 日

【DOI】 10.1038/s42003-025-07759-9

### 問い合わせ先

【研究に関すること】

千葉 親文 (ちば ちかふみ)

筑波大学 生命環境系 教授

URL: <https://www.biol.tsukuba.ac.jp/~chichiba/>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報局

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp