



東海大学大学院 医学研究科

教員紹介

領域(医学部組織)
分子生命科学

専門分野キーワード

教員氏名	大塚 正人
取得学位	博士(理学)
現在の身分 (役職名)	教授
専門分野	遺伝子工学、マウス発生工学、ゲノム編集
現在の研究課題	マウス遺伝子改変新技術の開発と疾患モデルマウス作製への応用、ゲノム編集技術を応用した遺伝子改変と遺伝子治療、遺伝子デリバリー法の開発と改良、RNAi 法や CRISPR 系を利用した遺伝子発現量調節法の開発
所属学会	日本実験動物学会、日本分子生物学会、日本繁殖生物学会、International Society for Transgenic Technologies (ISTT)、American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT)、日本ゲノム編集学会

研究内容

ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスなどの遺伝子改変マウスは、個体レベルでの遺伝子機能解析やヒト疾患のモデルマウスとして、世界中で広く使用されています。我々の研究室では、主に実験用マウスを用いて、これらの遺伝子改変マウスを作製するための方法論の開発を行っています。

例えば、Cre-loxP 部位特異的組換え系などを利用して、Rosa26 と呼ばれる遺伝子座位に1コピーの目的遺伝子を挿入することにより、安定した遺伝子発現を示すトランスジェニックマウスが再現性良く得られる方法である pronuclear injection-based targeted transgenesis (PITT)法を開発してきました。最近、遺伝子挿入効率改善と遺伝的背景の統一化を図り、複数系統のトランスジェニックマウスを一度に作製可能な改良型 PITT 法(i-PITT 法)の開発にも成功しています(図1)。

また、Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery (GONAD)法と呼ばれる、受精卵の単離、顕微注入、移植を要しない新規遺伝子改変マウス作製法を開発し、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法への応用などを行っています(図2)。具体的には、妊娠雌マウスの卵管に RNA を注入して電気穿孔(エレクトロポレーション)を付し、卵管内に存在する受精卵に RNA を導入してゲノム編集を行うものです。これは、体外に胚を取り出すことなく遺伝子改変マウスを作製可能な世界初の技術であり、顕微注入法などの熟練した技術や高価な装置を持たない多くの研究者に個体レベルでの遺伝子改変を手軽に試みる機会を提供するものとして、画期的な技術であると考えられます。

さらに、CRISPR/Cas9 系を利用して目的 DNA 断片を効率良くゲノムへ挿入(ノックイン)可能な独自の技術(Easi-CRISPR 法)も開発しました。目的 DNA 配列の両端に、CRISPR による切断領域に相同な塩基配列が付加された一本鎖 DNA (ssDNA)を同時に供給することで、目的 DNA を効率良くノックインできることが知られていましたが、これまでは入手可能な ssDNA 長の上限は 200 塩基でした。私の研究室では、200 塩基以上の長い ssDNA を合成する新しい方法(ivTRT 法)を開発し、それを用いた高効率ノックインシステム(Easi-CRISPR 法)の確立に成功しました。これはノックインマウス作製のみならず、遺伝子治療等を含めた様々な研究分野への応用が可能な汎用性の高い手法となると期待されます。

今後は、CRISPR/Cas9 系を用いて、より洗練されたゲノム改変技術の開発、遺伝子治療法開発、合成生物学への応用などを進めていきたいと考えています。



図1: i-PITT法で作製されたマウス

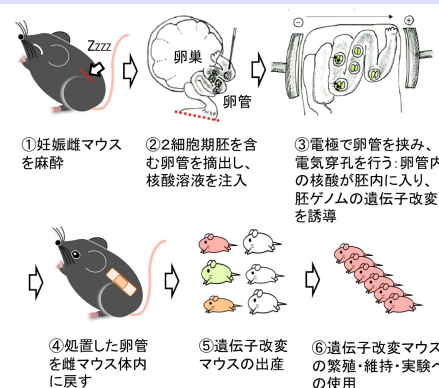


図2: Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery (GONAD)法

主要論文

1. Gurumurthy CB., Sato M., Nakamura A., Inui M., Kawano N., Islam MA., Ogiwara S., Takabayashi S., Matsuyama M., Nakagawa S., Miura H. and Ohtsuka M. Creation of CRISPR-based germline-genome-engineered mice without ex vivo handling of zygotes by i-GONAD. *Nat Protoc.* 14: 2452–2482. (2019)
2. Ohtsuka M., Sato M., Miura H., Takabayashi S., Matsuyama M., Koyano T., Arifin N., Nakamura S., Wada K. and Gurumurthy CB. i-GONAD: a robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases. *Genome Biol.* 19: 25 (2018)
3. Miura H., Quadros RM., Gurumurthy CB. and Ohtsuka M. Easi-CRISPR for creating knock-in and conditional knockout mouse models using long ssDNA donors. *Nat Protoc.*, 13: 195–215 (2018)
4. Miura H., Inoko H., Tanaka M., Nakaoka H., Kimura M., Gurumurthy C. B., Sato M. and Ohtsuka M. Assessment of artificial miRNA architectures for higher knockdown efficiencies without the undesired effects in mice. *PLoS ONE* 10: e0135919 (2015)
5. Ohtsuka M., Miura H., Mochida K., Hirose M., Hasegawa A., Ogura A., Mizutani R., Kimura M., Isotani A., Ikawa M., Sato M. and Gurumurthy C. B. One-step generation of multiple transgenic mouse lines using an improved Pronuclear Injection-based Targeted Transgenesis (i-PITT). *BMC Genomics* 16:274 (2015)

ホームページ URL

<https://masato2.wixsite.com/ohtsuka-lab>