

老化促進モデルマウス (SAM) におけるゲノム編集

和泉 宏謙¹、吉田 知之¹、今井 彩子¹、黒澤 信幸²、磯部 正治²、森 寿¹
(富山大学¹ 医学部 分子神経科学、²工学部 遺伝情報工学)

IZUMI Hironori, YOSHIDA Tomoyuki, KUROSAWA Nobuyuki, ISOBE Masaharu, MORI Hisashi :
Genome editing on Senescence-Accelerated Mouse (SAM)

Genome-editing technique has been widely applied to variety of cell types and model organisms to knockout and manipulate the functions of target genes. Application of the technique to the senescence-accelerated mouse (SAM) would help to clarify the causal linkages between its senescence-related phenotypes and genetic elements. Here, we report the procedures to establish point mutation knock-in mice in the SAMR1 and SAMP8 strains by CRISPR/Cas9 system.

1. 目的

老化促進モデルマウス (SAM) は、老化関連病態を研究する疾患モデルとして樹立された。最近、磯部・黒澤らのグループは、学習・記憶障害を呈する SAMP8 系統マウスの *Serpina3n* の遺伝子多型がアルツハイマー病の原因となるアミロイドβオリゴマーの維持に寄与することを報告したり。そこで今回、*Serpina3n* の変異と学習・記憶障害の関連を明らかにするため、標的遺伝子配列を改変する CRISPR/Cas9 システムを応用し、SAMP8 系統と正常老化を示す SAMR1 系統との間で相互に置換した点変異体を作成したので報告する。

エレクトロポレーション法²⁾により CRISPR/Cas9 システム (図 1) を前核期胚へ導入し、翌日、正常に発生した 2 細胞期胚を ICR 系統偽妊娠雌マウスへ移植した。得られた産仔のゲノム DNA を精製し、遺伝子検査を行った。変異型で CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence) を生み出すプライマーセットを用いた PCR 反応によりターゲット領域を増幅した後、制限酵素切断の有・無から遺伝子型を判定した (図 2)。なお、本研究は富山大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

3. 結果

(1) SAM での体外受精成績

各系統の雌マウスに対して、過排卵処理により得られた卵子の数を表 1 に示す。我々の研究室でマウス作製に汎用している C57BL/6 系統での採卵数と比べて半分以下であった。媒精後、極体放出ならびに雄性前核を確認できた受精卵の割合から受精率を算出したところ、C57BL/6 系統では 73 %となるのに対し、SAM では 50%前後と低い受精率となった。前核期胚にエレクトロポレーション法で CRISPR/Cas9 システム (SAMR1 系統では R1-sgRNA1、SAMP8 系統では P8-sgRNA2) を導入し、翌日まで培養した。2 細胞期への発生率は、SAMP8 系統では 75 %、SAMR1 系統では 59%となり、C57BL/6 系統での 95 %よりも低い結果となった。



図 1. *Serpina3n* 遺伝子座のゲノム編集デザイン

2. 方法

日本エスエルシー社より SAMP8 系統ならびに SAMR1 系統を購入し、実験に供した。過排卵誘起法を用いて体外受精を行い、各系統の前核期胚を準備した。

表 1. C57BL/6 系統と SAM の各系統の体外受精成績

Strain	No. of females	No. of eggs per donor (total)	No. of fertilized eggs (%)	No. of 2-cell eggs (%)
C57BL/6N	14	75 (1050)	766 (73)	728 (95)
SAMR1	43	27 (1156)	506 (43)	302 (59)
SAMP8	39	23 (904)	468 (51)	352 (75)

(2) CAPS を利用した遺伝子検査

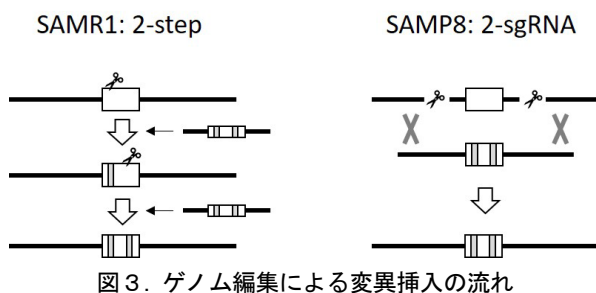
SAMR1 系統と SAMP8 系統で多型を示す領域に対して制限酵素サイトを導入するプライマーをデザインした。*Serpina3n* 遺伝子多型のうち、3'側の変異箇所に対するデザインを図 2 上段に示した。ゲノム DNA を用いてターゲット領域を増幅した後、制限酵素処理 (SAMR1 型では BglIII、SAMP8 型では BamHI) を行ったところ、各系統に対応した遺伝子型の判定が可能であった (図 2 下段)。また、5'側の変異箇所についても同様に CAPS を利用した遺伝子型判定は可能であることも確認できた。



図 2. CAPS を用いた *Serpina3n* 多型 (3'側) の判定

(3) 点変異置換マウス系統の作製

ゲノム編集後、正常に発生した 2 細胞期胚を偽妊娠 ICR 雌マウス (妊娠 0.5 日) の卵管膨大部へ移植した。妊娠 19.5 日にて帝王切開により胎児を摘出した。バイオプシー (指または尾) を採取し、遺伝子検査を行った結果、ゲノム編集による切断部位から近位の変異箇所 (SAMR1 系統では 5'側の 2 塩基、SAMP8 系統では 3'側の 1 塩基) において、それぞれ 14 匹中 1 匹、23 匹中 10 匹で点変異置換を確認できた。一方、切断部位から遠位の変異箇所ではいずれの系統においても点変異置換は生じていなかった。そこで、SAMR1 系統にて 5'側の点変異置換を確認できた個体の交配から F2



世代にてホモ型の受精卵を準備し、3'側に対する sgRNA (R1-sgRNA2) を用いたゲノム編集を行った (図 3 左)。その結果、8 匹中 1 匹にて 3'側の点変異置換を確認できた。一方、SAMP8 系統では、5'側と 3'側に対する 2 種類の sgRNA を用いたゲノム編集を行い、10 匹中 1 匹で両側の点変異置換を確認できた (図 3 右)。

4. 考察

SAM の 2 系統に対するゲノム編集を行い、*Serpina3n* の遺伝子多型を相互に置換したマウスを作製できた。

(1) C57BL/6 系統と比較すると、SAM では採卵数が少なく、発生率も低い結果となった。この理由の一つとして、C57BL/6 系統に適した実験条件 (過排卵処理やエレクトロポレーション、培養液の組成など) を用いたことが考えられる。これらの条件を SAM に対して最適化できれば成績を改善できる可能性がある。

(2) これまでゲノム編集の遺伝子検査には In-del assay や Direct Sequencing を用いてきたが、時間と労力を要することが欠点であった。そこで、新たに CAPS を利用した遺伝子検査を試みた。その結果、短時間で、正確かつ簡便に点変異置換の有・無を判定できたことから、これまでよりも汎用性が高い方法と考えられる。

(3) 今回のゲノム編集効率、SAMR1 系統で 7%であったのに対し、SAMP8 系統では 43%と非常に高かった。SAMP8 系統ではゲノム修復に関連した遺伝子に多型が報告されており³⁾、ゲノム編集効率が高くなる原因と関係しているかもしれない。一方、1 種類の sgRNA を用いた場合、いずれの系統においても切断部位から遠位における点変異置換は生じなかった。これは、切断部位と変異箇所までの距離とノックイン効率との間には逆相関関係があるとの報告⁴⁾と合致する。そして、不完全な結果に対しても、図 3 に示すように目的のマウスを作製する上で様々な対応策を組めることはゲノム編集技術の大きなメリットと言える。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導くださいました富山大学・医学部・分子神経科学講座のスタッフの皆様様に深謝いたします。本研究の一部は、JSPS 科研費 JP23K09644 の助成を受けたものです。

参考文献

- 1) Akbor et al., PloS One, 2021, 16:e0248027.
- 2) Wakita et al., Nat Commun., 2020, 11:649.
- 3) Tanisawa et al., BMC Genomics, 2013, 14:248.
- 4) Paquet et al., Nature, 2016, 533:125-129.