

# ゲノム編集技術を用いたモザイク変異 マウス個体作製の検討

三寶 誠（生理学研究所 技術課）

SANBO Makoto : Consideration of generation of mosaic mutant mice using the genome editing

As one of the methods to elucidate a specific gene function, generation of genetically modified mice and the analysis are carried out widely. The development of the genome editing technology with the CRISPR/Cas9 system allowed the generation of the mouse which modified an efficiently objective gene at will in a short term.

There are the case having very low probability that the founder mouse is created or the case that most founder mice are born, and dies immediately while we manufacture mutant mouse for various target genes. As a main cause, it is thought that homozygous mutation of recessive lethal gene occurs with high probability by cutting of the target sequence.

The making of mosaic mutant mice that variant cells and wild type cells were mixed as a method avoiding causing death by homozygous mutation is thought about.

## 1. CRISPR Cas9 システムによるゲノム編集

CRISPR Cas9 システムによるゲノム編集では、切断したいゲノムDNAと相補的なガイドRNAを、二本鎖DNAを切断する酵素であるCas9タンパクと共に発現させることにより、ガイドRNAは標的ゲノムDNAと結合し、Cas9タンパクを呼び込み、目的の部位でゲノムDNAを切断する。切断された二本鎖DNAは修復されるが、そのDNA修復機構として非相同末端結合か、相同組換えによる修復が起こる。非相同末端結合の場合は塩基の挿入や欠失が起こるため、標的遺伝子の目的部位に変異を導入できる。また、切断領域と相同な領域を含む配列を導入して、相同組換えによる目的の部位への特定配列の挿入が可能である。これらのことから、マウス受精卵へのRNP（Ribonucleoprotein: Cas9タンパクとガイドRNAの複合体）導入により、ノックインマウス、ノックアウトマウスを効率よく作製できる（図1）。

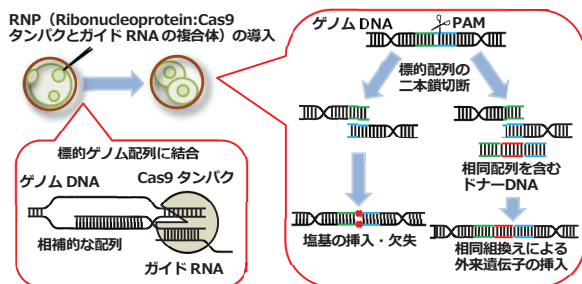


図1. CRISPR Cas9 システムによるゲノム編集

## 2. 目的

様々な標的遺伝子を対象とした多くのノックインマウス、ノックアウトマウスを作製している中で、ファウンダーマウスの発生率・出生率が非常に低い場合や、出生直後にほとんどのファウンダーマウスが死亡する場合がある（図2）。発生率・出生率の低下や出生直後に致死となる主な原因として、Cas9タンパクによる標的配列の切断により、潜性致死遺伝子の変異が高確率で生じることが考えられる。

今回は、ゲノム編集時の標的配列の切断による変異体の致死を回避するための方法を検討した。



図2. 出生直後に致死となる胎児の様子

## 3. 方法

ゲノムの切断による変異導入細胞や相同組換えを起こした細胞と野生型の細胞が混在するマウス個体を作製することにより、ゲノム編集時の標的配列の切断による変異体の致死を回避する。

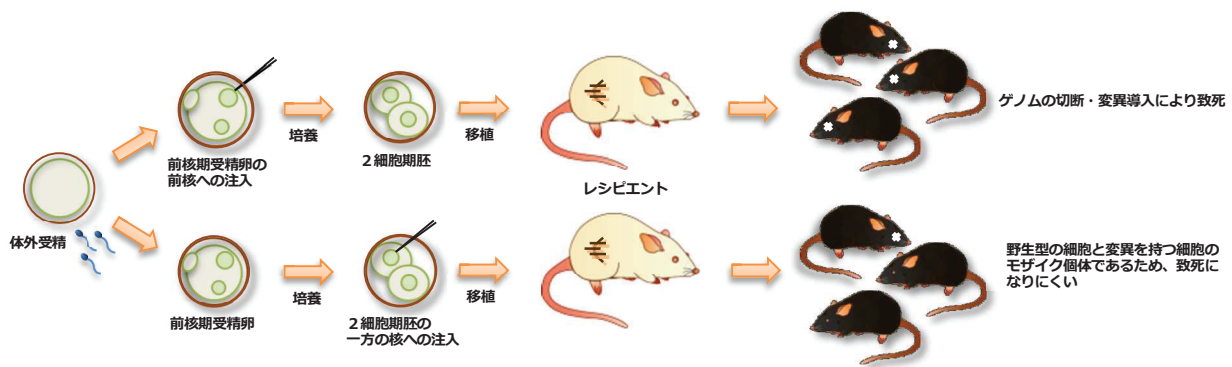


図3. モザイク変異マウス個体の作製

2細胞期胚の片方の細胞の核のみに RNP と相同組換えのための配列を導入してファウンダーマウスを作製する。RNP と相同組換えのための配列を導入した細胞では標的遺伝子への変異の導入や相同組換えが起こるが、もう片方の細胞は野生型であるためモザイク状の変異マウスを作製できる(図3)。モザイク変異マウス個体では、致死になる変異があっても野生型の細胞が混在するためマウス個体は生存する可能性が高くなる。モザイク変異マウス個体が性成熟するまで生存することにより、次世代で目的のマウスの作製が可能となる。

#### 4. 結果

RNP と相同組換えのための配列を前核期受精卵の前核に注入した場合と2細胞期胚の片方の細胞の核のみに注入した場合を比較して、実験例1では出生率・生存率に大きな差が見られない結果が得られた(表1)。また、それぞれの変異導入個体から次世代でヘテロ個体が得られた。

同様の比較で実験例2では出生率・生存率に大きな差が見られる結果が得られた(表2)。

表1. モザイク変異マウス個体作製(例1)

	移植数	出生数(%)	生存数	解析 個体数	変異導入 個体数(%)
one-cell	40	12(30.0)	11	11	5(45.5)
two-cell	55	30(54.5)	30	30	9(30.0)

One-cell: 前核期受精卵の前核への注入  
Two-cell: 2細胞期胚の一方の核への注入

表2. モザイク変異マウス個体作製(例2)

	移植数	出生数(%)	生存数	解析 個体数	変異導入 個体数(%)
one-cell	47	2(4.3)	0	—	—
two-cell	143	48(33.6)	48	48	8(16.7)

One-cell: 前核期受精卵の前核への注入  
Two-cell: 2細胞期胚の一方の核への注入

#### 5. 考察

ゲノム編集する対象遺伝子に変異を導入することによりファウンダーマウスが致死になる場合、前核期受精卵へRNPを導入する方法では、標的遺伝子の切断が原因で出生率・生存率が大きく低下したが、2細胞期胚の片方の細胞のみゲノム編集を行う方法では、出生率・生存率の低下は起こらず、ゲノム編集効率を維持したままファウンダーマウスが得られた。これらのことから2細胞期胚の片方の細胞のみゲノム編集を行う方法は、ゲノム編集による致死を回避し、次世代で目的のマウスを獲得する有効な手段と期待できる。