

新潟大学脳研究所
「病理リソースを活用した脳神経病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

接合子の体外操作を必要としない高効率ノックインマウス作製法の開発

研究代表者 米原 圭祐¹⁾
研究分担者 笹岡 俊邦²⁾, 阿部 学²⁾

1) 国立遺伝学研究所 遺伝形質研究系・多階層感覚構造研究室
2) 新潟大学脳研究所 動物資源開発研究分野

研究要旨

近年のゲノム編集法の急速な進化により、遺伝子改変動物の作成効率と利用応用が飛躍的に高くなってきた。しかしながら、大きな DNA 配列のノックイン動物作製は依然として非効率であり、実験者の大きな労力が負担となっている。本研究ではこれらの問題を克服するために、新奇の遺伝子改変動物作出法の開発を行う。

A. 研究目的

共同研究者である新潟大学・阿部らのグループは近年アデノ随伴ウイルスおよび CRISPR-RNP を卵管にエレクトロポレーションすることで効率よくノックイン動物を作製する手法を開発した (Abe et al., Sci Rep 2023)。本研究ではこの手法を更に効率化するために、double-strand DNA をゲノムに持つ scAAV をドナー配列として供給し、NHEJ と HDR を組み合わせたノックイン手法である Combi-CRISPR 法や SATI 法を適用することで、新奇の高効率遺伝子改変マウス作製法の開発を行う。更に、確立した高効率ノックインマウス作製法を利用して、顔面や鼻腔を支配する三叉神経に発現する TRPM8, Piezo2, Trpv1 などのチャンネルが潜水反応における浸水センサーとして機能するという仮説を検証する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

三叉神経において侵害受容器として TRPM8, Piezo2, Trpv1 などのチャンネルが発現しており、これらチャンネルが潜水などの顔面感覚情報の検

知を行うと考えられているが、その神経生理学の実態は不明である。本研究ではこれらのチャンネルを Cre と置換したノックインマウスを作製することにより、顔面感覚情報処理におけるチャンネルの分子機能を調べたり、チャンネルが発現する三叉神経サブタイプの可視化を行う。TRPM8, Piezo2, Trpv1 などの各種チャンネルの開始コドン直下にインフレームで Cre-WPRE-polyA をノックインすることを目指す。このために、まずドナー配列として Self-complementary (sc) AAV-Cre-WPRE-polyA ベクターの作製を新潟大学及び遺伝研にて行う。scAAV 中にプロモーター配列は含めないことで、ドナー配列を入れるために十分なスペースを確保する。ドナー配列中の Cre の片側のみの (WPRE-polyA の後ろ) に大きなサイズ (≈0.7 kb) のゲノムとの相同配列を入れる (Yoshimi et al., Human Genetics 2021; Suzuki et al., Cell Res 2019)。ドナー配列中のノックインを行う近隣の領域を 2 つの gRNA (gRNA1, gRNA2) で切断できるように設計する。そのうちの gRNA1 はゲノム配列中のイントロン、および scAAV-Cre-WPRE-polyA 中の相同配列が無い側を切断するように設計す

ることで、発生しうる *indel* の遺伝子機能への影響を最小限に止める。新潟大学において、作製した *scAAV-Cre-WPRE-polyA* と *CRISPR-RNP* をメス *C57BL/6J* マウスの卵管にエレクトロポレーションにより導入する。エレクトロポレーションの印加電圧波形の条件検討を行う。その後、生まれてきた動物の遺伝型を判別し、遺伝子導入の効率を定量的に評価する。作製したマウスを遺伝研へ搬送する。遺伝研においてヘテロマウスを *R26-LSL-GCaMP6s* マウスと交配し、チャネル発現三叉神経細胞を可視化する。ホモマウスから心拍数を測定しながら自発的潜水課題を行い、潜水反応に対するチャネルノックアウトの影響を評価する。

C. 研究結果

TRPM8 ノックアウトマウスの鼻腔への水注入実験を行い、潜水反応への影響を調べた。野生型マウスでは低温の水を用いた場合に心拍数が著しく低下したが、*TRPM8* ノックアウトマウスでは心拍数の低下がマイルドである様子が観察されている ($n = 2$ mice)。引き続き実験個体数を増やすとともに、*Piezo2* や *Trpv1* ノックアウトマウスでも検討を行う。*TRPM8* 遺伝子座への *Cre* ノックインコンストラクトのデザインを行なっている。また、申請者の研究室の若手研究者が、阿部学研分担者から卵管へのエレクトロポレーションを1泊の脳研究所への滞在で習ってきたので、現在遺伝研で手技を練習しているところである。

D. 考察

TRPM8 遺伝子は低温センサーとして知られ、潜水反応は低温水で応答が増強することが知られているため、鼻腔を支配する三叉神経の枝に発現する *TRPM8* が潜水反応における水温検出に関与することが示唆された。

E. 結論

潜水反応における *TRPM8* 遺伝子の機能をより詳細に調べる必要性が高まってきたため、高効率ノックインマウス作製法をいち早く確立し、各種ノ

ックインマウス系統を作出する必要がある。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. 該当なし

2. 学会発表

1. 該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし