

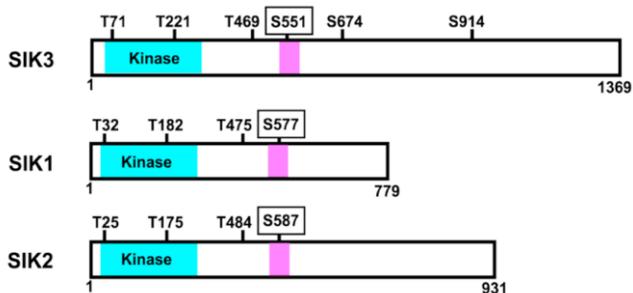
Sik1, Sik2 点変異マウスの作製

Park Minjeong (筑波大学 生物学類) 指導教員: 柳沢 正史 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

本研究では、新規睡眠制御遺伝子の同定を目指して、ランダム点突然変異マウスの睡眠異常スクリーニングにもとづくフォワード・ジェネティクス研究に取り組んでいる。この研究によって睡眠量の多い家系を樹立し、さらに責任遺伝子変異を *Sik3* 遺伝子に同定した。遺伝子変異はスプライス変異であり、*Sik3* 遺伝子のエクソンスキップを生じる。*SIK3* タンパク質はリン酸化酵素であるが、遺伝子変異があると一部が欠失した変異型 *SIK3* タンパク質になる。変異型 *SIK3* タンパク質で欠失する部位にはプロテインキナーゼ A に認識されるリン酸化部位 S551 が含まれている (図 1)。このプロテインキナーゼ A 認識部位は、ショウジョウバエや線虫の *Sik3* オルソログにも保存されている。ショウジョウバエにおいて、このプロテインキナーゼ A 認識部位をアラニン置換した *SIK3* を過剰発現させると、睡眠時間が大きく増加することから、このリン酸化部位が無脊椎動物の睡眠様行動の制御に関与していることが示唆される。脊椎動物において、*SIK* ファミリーは *SIK1*、*SIK2*、*SIK3* からなり、図 1 に示すように *SIK3* S551 に相当するプロテインキナーゼ A リン酸化部位は *SIK1* および *SIK2* にも保存されていることから、このリン酸化部位が睡眠覚醒行動を含め様々な行動制御に関与している可能性がある。

本研究は、*SIK3* のタンパク質ファミリーである *SIK1* と *SIK2* のプロテインキナーゼ A リン酸化部位をアラニン置換させる点変異マウスを作製し、*SIK1* と *SIK2* のプロテインキナーゼ A 認識部位を欠損させたマウスでも *SIK3* と同様に睡眠に影響を及ぼすのかを調べることを目的とする。

図 1. *SIK* ファミリーの構造とプロテインキナーゼ A の認識部位

【方法】

(1) CRISPR/Cas9 システムによる点変異マウスの作製

CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子変異マウスを作製するためには、標的配列に対する gRNA、Cas9 タンパク質、およびノックインの場合にはドナーDNA を野生型受精卵にインジェクションする必要がある。本研究では、点変異マウスを作製するため、まず gRNA とドナーDNA の配列を設計した。まず、ドナーDNA 設計の段階で候補となる配列をいくつか選び、一番適切なドナーDNA 配列を選択した。次に、標的とする 20 塩基の後ろに PAM 配列を含むことを確認し、GeneArt を用いて gRNA を作製した。ドナーDNA は設計した配列を発注し、Cas9 タンパク質は市販のものを利用した。

(2) 点変異マウスのシーケンス確認

gRNA、Cas9 タンパク質、およびドナーDNA を野生型受精卵にインジェクションすると、受精卵内で標的遺伝子が直接改変され、約 3 週間後に遺伝子改変マウスが産まれる。作製されたマウスの標的遺伝子の部位に設計通りに変異が入っていることを確認するため、まずマウスの遺伝子型を調べ、最終的にはシーケンスを読み取る必要がある。マウスの遺伝子型を調べるため、標的配列からゲノム上で約 200 塩基離れた部位にフォワードとリバースプライマー、および変異が入った標的配列を認識するプライマーの計 3 種類のプライマーを設計した。最初に 3 種類のプライマーを利用してマウスの遺伝子型を同定し、次に変異の入っているヘテロ型やホモ型と予想されるマウスのシーケンスを確認した。

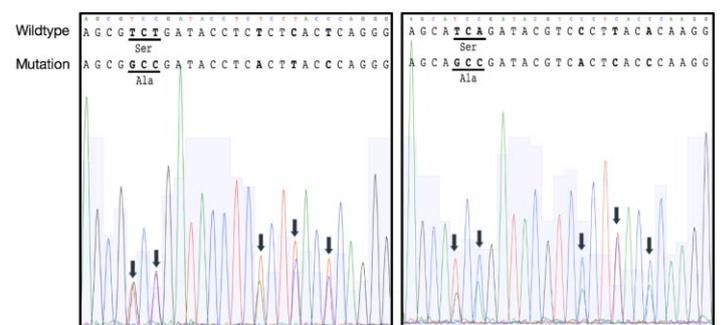
【結果】

(1) 作製されたマウスの結果

Sik1 点変異マウスについては、約 100 個の受精卵を 5 匹の偽妊娠マウスに移植し、そのうち 10 匹が個体として産まれた。遺伝子型を制限酵素処理により調べた結果、10 匹のうち野生型が 6 匹、ヘテロ型が 3 匹、ホモ型が 1 匹だった。*Sik2* 点変異マウスは、約 120 個の受精卵を 6 匹のマウスに移植し、そのうち 19 匹が個体として産まれた。遺伝子型は 19 匹のうち、野生型が 7 匹、ヘテロ型が 7 匹、ホモ型が 5 匹だった。

(2) 作製されたマウスのシーケンス結果

制限酵素処理によりヘテロ型やホモ型と判定されたマウスについては、DNA シーケンシングを行い、標的部位に変異が入っていることを確認した。また、標的部位以降にシーケンスのずれや欠損、挿入なども無いことを確認した。ヘテロ型 *Sik1*、*Sik2* 点変異マウスのシーケンス結果を図 2 に示す。

図 2. *Sik1*、*Sik2* (左、右) 点変異マウスのシーケンス結果

【考察・展望】

最初に産まれた G_0 世代のマウスはモザイクの可能性が高く、そのままでは遺伝子改変マウスとして使用することができない。そのため、 G_0 世代のマウスを C57BL/6N 野生型のマウスと交配させ、 F_1 世代のマウスを作製した。現在、 F_1 世代のヘテロ型マウスから F_2 世代のマウスを作製中である。今後、 F_2 世代のマウスを用いて脳波を計る電極手術を行い、睡眠の測定と解析を行う予定である。