

令和4年10月13日
国立大学法人 浜松医科大学

簡便な *i*-GONAD 法による Flag (DYKDDDDK) タグを 挿入したマウスの作製法の確立 ～特異抗体のない標的タンパク質の解析に有効～

<研究成果のポイント>

- 変異マウス作製にあたり、タンパク立体構造予想プログラム AlphaFold2 (DeepMind 社) により、Flag (DYKDDDDK) エピトープタグ挿入部位の適正を予想しました。
- CRISPR-Cas9 ゲノム編集法とエレクトロポレーション法を組み合わせたマウス作製法 (*i*-GONAD 法) を用いて、脳神経系で発現の多い *CaMKIIα* と *CaMKIIβ* 遺伝子の Flag (DYKDDDDK) ノックインマウスを作製しました。
- 作製した2種類のマウスでは、Flag 抗体を用いて、免疫組織染色、ウェスタンブロッティング、免疫沈降法を行うことができました。
- 浜松医科大学で確立されたこのマウス作製法は、標的タンパク質に対する特異抗体のない場合、ヒト疾患原因遺伝子の解析を促進することが期待されます。

※本研究成果は、国際学術誌「**International Journal of Molecular Science**」オンライン版に日本時間 10 月 7 日に公表されました。

<概要>

浜松医科大学医化学講座の青戸一司助教・武藤弘樹助教・才津浩智教授、光先端医学教育研究センター医用動物資源支援部の高林秀次准教授らの研究グループは、タンパク質構造予想ツールである AlphaFold2 (DeepMind 社)^{*1} を用いてエピトープタグ^{*2} の付加する位置を評価して、安価で簡便な *i*-GONAD 法^{*3} によるノックインマウスを作製する方法を開発しました。今回の方法は、これまでヒト疾患の原因遺伝子の解析には標的タンパク質に対する特異抗体が必要でしたが、簡単にエピトープタグを標的ゲノムに挿入することによって、市販のエピトープタグに対する抗体で解析が可能になりました。この方法の開発により、これまで標的に対する特異抗体が存在していない場合の代替法として行えるため、モデルマウスを用いたヒト疾患の発症機序の究明を加速させることが期待されます。この成果はスイス MDPI 社の国際学術誌「**International Journal of Molecular Science**」オンライン版に、10 月 7 日に公表されました。

<研究の背景>

これまで研究において、標的タンパク質の組織発現を観察するための免疫組織染色、細胞内局在を観察するための免疫細胞染色、生化学的手法のためのウェスタンブロッティング法、免疫沈降法による結合タンパク質の単離・同定を行うプロテオーム解析、クロマチン免疫沈降シーケンシング (ChIP-seq) など多くの実験手法において標的に対する特異抗体が必要でした。

2020 年にノーベル化学賞を受賞した第 3 世代のゲノム編集法である CRISPR-Cas9 の登場により、容易に標的遺伝子の破壊 (ノックアウトマウス)、その遺伝子座への遺伝子断片の挿入 (ノックインマウス) が可能になりました。これまで我々は、CRISPR-Cas9 ゲノム編集法とエレクトロポレーション法を組み合わせたマウス作製法 (*i*-GONAD 法) を用いて、35 遺伝子、50 系統を超えるヒト疾患モデルマウスおよびラットを作製し、ヒト疾患原因遺伝子の解

析を行ってきました (Takabayashi, *Sci. Rep.* 2018, Aoto, *Nature Communications*, 2021, Mutoh, *J. Neurosci. Res.* 2022)。この *i-GONAD* 法は短い遺伝子断片の挿入を非常に得意としています。細胞を中心とした解析では、標的タンパク質の機能や局在を調べるために、数アミノ酸から数十アミノ酸のポリペプチド鎖のエピトープタグを標的タンパク質の発現ベクターへ挿入して用いられています。我々はこのエピトープタグの方法を *i-GONAD* によるノックインマウス作製に応用しました。

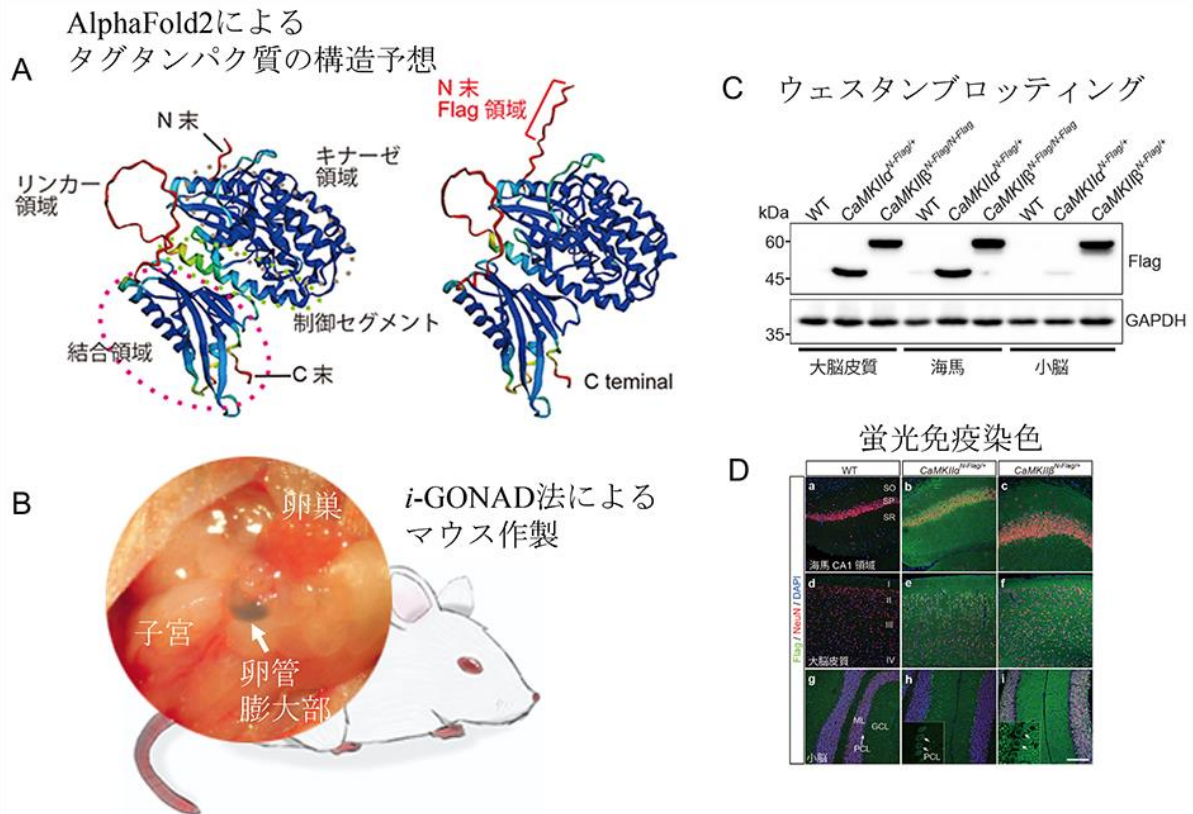


図 1 ; 本研究のまとめ

<研究手法・成果>

脳の海馬シナプス伝達の可塑性による記憶・学習に関わるセリン・スレオニンタンパク質リン酸化酵素である II 型カルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素 (CaMKII α , CaMKII β) は、ホモ・ヘテロの 12 量体を形成し、脳の海馬の神経細胞に多く発現しています。以前我々は知的障害と発達遅滞を呈する患者において *CAMKII α* , *CAMKII β* の *de novo* 変異を同定しました (Akita*, Aoto*, et al., *Ann. Cli. Transl. Neurol.* 2018)。今回我々はこの *CAMKII α* , *CAMKII β* に対して *i-GONAD* 法を用いて、Flag (DYKDDDDK) のエピトープタグの挿入を行いました。

Flag タグをどの位置につけるのかはとても重要です。付ける位置によってはタンパク質の機能阻害をする可能性があります。そこで、作製前に AlphaFold2 (DeepMind 社) によるタンパク質構造予想を行いました。*CAMKII* は N 末、C 末ともにタンパク質の表面にフリーな状態で露出しているため、N 末への Flag を付加したタンパク質構造でも抗体が障害なく結合できると考えられます (図 1 A)。

i-GONAD 法にて、CRISPR-Cas9 試薬である Off-target の少ない HiFiCas9 タンパク質、crRNA、tracrRNA、ssODN を妊娠確定した雌マウスの卵管膨大部へ注入し、電気穿孔して、受精卵のゲノム編集を行いました。その後、*CAMKII α* と *CAMKII β* 遺伝子の転写開始点の直後に Flag (DYKDDDDK) を挿入したマウスを得ることができました (図 1 B)。

作製したマウスでは、Flag (DYKDDDDK) に対する市販の抗体で免疫組織染色による、ウェスタンブロッティング、免疫沈降法が行えました (図 1 C、D)。

<今後の展開>

今回の *i*-GONAD 法によるエピトープタグ挿入方法の開発により、マウス個体中の標的タンパク質に対する特異的抗体がなくても、市販のエピトープタグ抗体を利用して標的タンパク質の細胞・組織局在の観察、結合タンパク質の単離・同定、プロテオーム解析等への応用が可能になりました。今後は、*i*-GONAD 法の改良によって、蛍光遺伝子、リポーター遺伝子などのもっと長い遺伝子断片を高効率で挿入できれば（図2の黄色）、更なるヒト疾患モデルマウスによる発症機序の解明が可能になると期待されます。

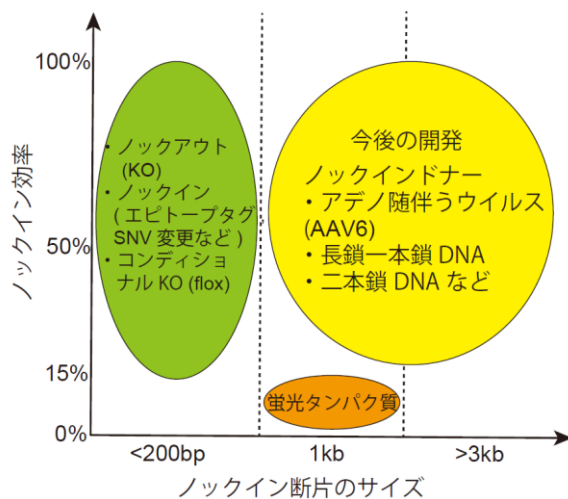


図2；ノックイン効率と断片サイズの関係

<用語解説>

*1 AlphaFold2 (DeepMind 社)：2021年7月に無償公開された人工知能プログラムで、アミノ酸配列からタンパク質の立体構造を予想するツール。

*2 エピトープタグ：アフィニティータグとも呼ばれ、標的タンパク質に付加する短鎖ポリペプチド、タンパク質です。

*3 *i*-GONAD 法：これまでの技術を必要とした ES 細胞への遺伝子ターゲティング法や、採卵した受精卵へのマイクロインジェクション法で変異マウス作製が行われていました。今回の方法は受精卵の存在する卵管膨大部へ直接ゲノム編集薬液を注入し、電気穿孔法にて作製する方法です。ES 細胞や採卵の必要がない簡便な、安価な、多数のマウスを処分することなく作製できます。

<発表雑誌>

International Journal of Molecular Science (DOI : 10.3390/ijms231911915)

<論文タイトル>

Generation of Flag/DYKDDDDK epitope tag knock-in mice using *i*-GONAD enables detection of endogenous CaMKII α and β proteins

<著者>

Kazushi Aoto*, Shuji Takabayashi, Hiroki Mutoh and Hirotomo Saito* *共同責任著者

<研究グループ>

本研究は、浜松医科大学医化学講座、同大学光先端医学教育研究センター医用動物資源支援部との共同研究です。

<研究支援>

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究(B)20H03641(研究代表者・才津浩智)、基盤研究(C)20K07243(研究代表者・青戸一司)、21K05890(研究代表者・高林秀次)、20K07423(研究代表者・武藤弘樹)の支援によって行われました。

<本件に関するお問い合わせ先>

国立大学法人浜松医科大学 医化学講座 (〒431-3192 浜松市東区半田山 1-20-1)

助教 青戸 一司

Tel/Fax: 053-435-2327

E-mail: kaz@hama-med.ac.jp